

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik B
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke -**

**Charakterisierung der Assoziation von Lymphozytensubpopulationen
und der Kinetik der M-Zell Formation im Follikel-assoziierten Epithel
bei Ratten mit Indomethazin-induzierter Ileitis**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des doctor medicinae
der medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster**

**vorgelegt von
Werner Martin Floer
aus Hannover**

Promotion 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T. Kucharzik

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Heidenreich

Tag der mündlichen Prüfung: 5.8.2003 und 6.8.2003

Zusammenfassung

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik B
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c.W. Domschke-

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. T. Kucharzik

Koreferent: Prof. Dr. med. S. Heidenreich

ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung der Assoziation von Lymphozytensubpopulationen und der Kinetik der M-Zell Formation im Follikel-assoziierten Epithel bei Ratten mit Indomethazin-induzierter Ileitis

Floer, Werner Martin

M-Zellen sind spezialisierte Epithelzellen im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) der Peyer'schen Plaques. Die Mechanismen der M-Zell -Entstehung und -Funktion sind bis heute unzureichend verstanden. Ziel dieser Untersuchung war es, die Kinetik der M-Zell Formation unter den Bedingungen der akuten Darmentzündung darzustellen und die M-Zell assoziierten Lymphozyten zu charakterisieren. Zur Untersuchung diente ein Tiermodell mit Wistarratten, die durch die Gabe von Indomethazin eine Ileitis entwickeln. M-Zellen wurden durch das Fehlen der Alkalischen Phosphatase identifiziert, Lymphozytensubpopulation wurden immunhistochemisch anhand ihrer Oberflächenmoleküle dargestellt. Die Expression von IL-4 wurde durch *In Situ* Hybridisierung untersucht. Die Induktion von M-Zellen bei akuter Ileitis stellte sich nach 12 h dar und bleibt bis zu 72 h konstant, nach einer Woche fand sich keine weitere Zunahme mehr. Es wurde eine signifikante Vermehrung der $TCR\alpha\beta^+$, $CD4^+$ T-Zellen und B-Zellen entdeckt; keine Unterschiede fanden sich für die Marker CD8, CD11b und CD25. Im Rahmen einer chronischen Ileitis konnte ebenfalls eine signifikante Vermehrung von assoziierten $TCR\alpha\beta^+$, $CD4^+$ T-Zellen und B-Zellen gezeigt werden. *In Situ* Hybridisierungsversuche ergaben eine erhöhte IL-4 Expression durch Zellpopulationen im Innern des Peyer'schen Plaques im Rahmen der Ileitis. Die Bildung von M-Zellen im FAE ist unter den Konditionen der Entzündung deutlich vermehrt und geht offensichtlich mit der Assoziation bestimmter Lymphozytenpopulation einher. M-Zellen scheint daher eine Rolle bei der Pathogenese der Indomethazin-induzierten Ileitis zuzukommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 <i>Das Immunsystem</i>	10
1.2 <i>Das Immunsystem des Darms</i>	13
1.3 <i>Peyer´sche Plaques</i>	17
1.4 <i>M-Zellen</i>	19
1.5 <i>Mukosale Antigenaufnahme über M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel</i>	23
1.6 <i>M-Zellen als Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen</i>	24
1.7 <i>Die Rolle der M-Zellen bei akut und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i>	26
1.8 <i>Problemstellung</i>	28
2. Material	29
2.1 <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	29
2.2 <i>Verwendete Antikörper</i>	30
2.3 <i>Versuchstiere</i>	32
2.4 <i>Puffer und Lösungen</i>	32
2.4.1 <i>PBS (Phosphatpuffer)</i>	32
2.4.2 <i>AP-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer)</i>	32
2.4.3 <i>0,1 % BSA in PBS/10%ZS („bovine serum albumine“ in Phosphatpuffer mit Ziegenserum)</i>	33
2.4.4 <i>0,3 % H₂O₂ in PBS</i>	33
2.4.5 <i>DEPC H₂O</i>	33
2.4.6 <i>1 M Glycin/PBS DEPC behandelt</i>	33
2.4.7 <i>4% PFA/PBS pH 7,0 (Paraformaldehyd)</i>	34
2.4.8 <i>Proteinase K Stammlösung (Konzentration 40mg/ml)</i>	34
2.4.9 <i>0,1 M TEA-Puffer pH 8,0 (Triethanolamin)</i>	34
2.4.10 <i>20x SSC (Standart Saline Citrate)</i>	34
2.4.11 <i>RNase A</i>	35
2.4.12 <i>DEPC PBS</i>	35
2.4.13 <i>20% Sucrose Lösung</i>	35
2.4.14 <i>0,3 % Triton X 100 Lösung</i>	35
2.4.15 <i>TE Puffer (Trizma/EDTA Puffer für Proteinase A Verdaulösung)</i>	36
2.4.16 <i>NTE Puffer (NaCl/Trizma/EDTA Puffer)</i>	36

2.4.17 Eindeckmedium Moviol/DABCO (nach HARLOW/LANE 1988).....	36
3. Methoden.....	37
3.1 Induktion einer akuten oder chronischen Ileitis bei der Ratte mit Indomethazin	37
3.2 Anfertigung von histologischen Schnitten des Rattendarmes.....	37
3.2.1 Präparation der Peyer´schen Plaques für immunhistochemische Zwecke	37
3.2.2 Anfertigung von Gefriergewebsschnitten zur immunhistochemischen Aufarbeitung.....	38
3.2.3 Fixierung der Gewebsschnitte	38
3.3 Cytologische Färbungen	39
3.3.1 Übersichtsfärbung mit Methylenblau	39
3.3.2 Übersichtsfärbung mit Hämalaun nach Meyer.....	39
3.3.3 Alkalische Phosphataseaktivität	40
3.4 Immunhistochemie mit indirekter Signalverstärkung.....	40
3.4.1 Immunhistochemie mit FITC-Signaltechnik	41
3.4.2 Immunhistochemie mit Peroxidasetechnik.....	42
3.4.3 Doppelfärbungen mit FITC und Alkalischer Phosphatase	42
3.5 In Situ Hybridisierung Teil 1: Herstellung einer RNA Sonde	43
3.5.1 RNA-Isolierung	43
3.5.2 cDNA-Synthese	44
3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion	44
3.5.4 TA-Klonierung der IL-4 Bande.....	46
3.5.5 DNA-Sequenzierung	48
3.5.6 RNA-Sondensynthese.....	48
3.6 In Situ Hybridisierung Teil 2: Präparation der Peyer´schen Plaques für In Situ Hybridisierungsversuche.....	49
3.6.1 Anfertigung von Gefriergewebsschnitten zur In Situ Hybridisierung.....	50
3.6.2 Prehybridisierung (nach KOMMINOTH 1996).....	50
3.6.3 In Situ Hybridisierung	51
3.6.4 Post-Hybridisierung.....	51
3.7 Methode zur Ermittlung des prozentualen Anteils von M-Zellen im FAE: Immunhistochemie mit dem Ratten-M-Zell spezifischen Anticytokeratin 8 Antikörper (Klon 4.1.18).....	52
3.8 Auswertung mit einem computergestützten konfokalen Laserfluoreszenz- mikroskop	52
3.9 Ermittlung der statistischen Signifikanz der Unterschiede in der Kinetik der M- Zellen mit Hilfe des zweiseitigen t-Testes.....	53
3.10 Methode zur statistischen Charakterisierung der Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen	54
4. Ergebnisse	56
4.1 Untersuchung der Kinetik der M-Zell Induktion im akuten Ileitismodell der Ratte	56

4.2	<i>Statistische Auswertung der Daten zur Kinetik der M-Zell Formation.....</i>	59
4.3	<i>Beobachtungen zur Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen am chronischen Indomethazin-induzierten Ileitismodell der Ratte</i>	60
4.4	<i>Beobachtungen zur Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen am akuten Ileitismodell.....</i>	64
4.5	<i>Statistische Auswertung der Daten zur Assoziation von Zellen des Immunsystems an M-Zellen bei akuter und chronischer Indomethazin-induzierter Ileitis der Ratte.</i>	65
4.6	<i>In Situ Hybridisierung von Peyer´schen Plaques mit einer FITC markierten pIL4-Sonde</i>	67
5.	Diskussion.....	71
5.1	<i>Einleitung</i>	71
5.2	<i>Das Indomethazin-induzierte Ileitismodell.....</i>	71
5.3	<i>Induktion von M-Zellen</i>	73
5.4	<i>Assoziierte Lymphozyten</i>	75
5.5	<i>Interleukin 4 Produktion durch Zellen im Peyer´schen Plaque bei Entzündung .</i>	77
6.	Zusammenfassung	79
7.	Literaturverzeichnis	80
8.	Abbildungsverzeichnis	91
9.	Lebenslauf	92
10.	Danksagung.....	94
Anhang:	Tierversuchsgenehmigung	95

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Bidestilliertes Wasser
A. dest.	Destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ad	auf
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tag(e)
CCLx	Cytocineligand x
CCRx	Cytocinereceptor x
CDx	Cluster of Differentiation x
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-PBS	Dulbeccos-Phosphatpuffer
DAB	3,3-Diaminobenzidin Tetrachlorid
DABCO	1,4-Diazobicyclo(2,2,2)octan
DNA	Desoxyribonucleinacid
et al.	et alii
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAE	Follikel -assoziiertes Epithel
g	Gramm
GALT	Gut associated lymphatic tissue
h	Stunde(n)
HEV	High endothelial venules
HIV	Human immunodeficiency virus
i.v.	intra venös
l	Liter
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LT α	Lymphotoxin α
M	molar (mol/l)
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M cells	Membranous cells
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonucleinacid
Na Acetat	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxyd
PAMP	Pathogen associated microbial Patterns
PCR	Polymerase chain reaction
PP	Peyer's patch
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SCID	Severe common immunodeficiency
S-Peptid	Secretory peptide
TCR	T Cell Receptor
Tab.	Tabelle
TGF β	Transforming Growth Factor β
Th1/2 cell	T helper 1/2 cell
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
WHO	World Health Organisation
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Fähigkeit des Körpers sich sowohl den äußeren als auch inneren Feinden zu erwehren wird als Immunität bezeichnet. Die dabei im Körper ablaufenden Prozesse, die zur Ausbildung einer Immunität führen, werden Immunantwort genannt.

Die wissenschaftliche Erforschung der Immunität in Europa begann im 18. Jahrhundert mit dem britischen Arzt Edward Jenner. In einem Menschenversuch wies er nach, daß mit Kuhpocken (Vacciniaviren) geimpfte Personen sich nicht mit dem humanpathogenen Variolavirus ansteckten, der die Pockenkrankheit auslöste. Diese Krankheit gilt heute durch die weltweit durchgeführte Impfung seit 1977 als ausgerottet.

Heute weiß man, daß bestimmte Moleküle eine gegen sie gerichtete spezifische Immunantwort des Körpers herbeiführen. Sie werden als Antigene oder Immunogene bezeichnet. Die sie neutralisierenden körpereigenen Stoffe werden Antikörper genannt und wurden durch den deutschen Arzt Behring zu Beginn des 20. Jahrhunderts erstmalig beschrieben.

Der Körper des Menschen besitzt spezifische Organe, die von bestimmten Zellen und Molekülen des Immunsystems gebildet werden. Sie werden unterteilt in primäre und sekundäre lymphatische Organe. Erstere sind beim erwachsenen Menschen das Knochenmark und der Thymus. Sekundäre Organe sind die Milz, Nodi lymphatici mit Lymphgefäßen, die Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenringes, die Appendix vermiformis und die Peyer'schen Plaques des Dünndarmes. In den primären lymphatischen Organen spielt sich die Lymphopoese ab, d.h. die Generierung von Abwehrzellen des Körpers und ihre Selektion. Dabei wird sowohl eine positive Selektion wirksam, die ausreichend mit Fremdstoffen reagierende Zellen fördert, als auch eine negative Selektion, die Zellen, die mit körpereigenem Material reagieren, durch Apoptose entfernt (ZINKERNAGEL et al.1998). In den sekundären lymphatischen Organen kommt es zur Speicherung von reifen, immunkompetenten Zellen. Außerdem findet hier die Auseinandersetzung mit antigenem Material statt. Die so organisierten Zellen überwachen durch an Anschluß an das Lymphgefäßsystem/ Blutgefäßsystem den Pharynx, den Gastrointestinaltrakt, den Urogenitaltrakt und die respiratorischen Organe (SCHIEBLER et al.1997).

Das Immunsystem läßt sich weiter in ein unspezifisches und ein spezifisches System gliedern, die durch humorale und zelluläre Komponenten miteinander kommunizieren.

Das unspezifische Immunsystem schaltet sich bei Erstkontakt von Antigenen mit dem Körper ein. Zu ihm gehören Macrophagen, die unspezifisches antigenes Material phagozytieren und verdauen. Dazu kommen Granulozyten und natürliche Killerzellen. Als humorale unspezifische Abwehr steht dem Körper der alternative Weg des Komplementsystems zur Verfügung. Das unspezifische Immunsystem wird auch als angeborenes Immunsystem bezeichnet. Es ist in der Lage auf eingedrungene Pathogene prompt und flexibel zu reagieren.

Im weiteren Verlauf einer Immunantwort spielen Macrophagen und dendritische Zellen eine wichtige Rolle. Die aufgenommenen Antigene werden zu Fragmenten verdaut und mit MHC-Molekülen der Klasse II (Major Histocompatibility Complex) zusammen auf der Oberfläche dieser Zellen angeboten. Durch Stoffe, die chemotaktisch wirken, werden weitere Macrophagen angelockt. Der weitere Verlauf einer Immunantwort beinhaltet die Wanderung der dendritischen Zelle mit dem präsentierten Antigen in den drainierenden Lymphknoten. Hier bildet sich die Schnittstelle zum spezifischen Anteil des Immunsystems.

Zum spezifischen Immunsystem gehören die T-Lymphozyten (T steht für Thymus, also ihrem Bildungsort) und die B-Lymphozyten („bone marrow“, also aus dem Knochenmark stammend).

Aus den B-Lymphozyten bilden sich spezifisch humorale Komponenten des Immunsystems. Als ausgereifte Plasmazellen sind sie in der Lage Antikörper, sog. Immunglobuline, zu produzieren. Durch genetische Rekombination bei ihrer Differenzierung im Knochenmark können sie eine Vielzahl von unterschiedlichen Antikörpern bilden. Antikörper sind Eiweiße, die sich y-förmig aus zwei schweren und zwei leichten Peptidketten bilden. Trifft eine B-Zelle auf einen Macrophagen, der am Ende einer unspezifischen Immunabwehr antigenes Material im Lymphknoten präsentiert, und paßt der von dieser Zelle gebildete Antikörper zum Antigen, so wird die klonale Vermehrung und Differenzierung zur Plasmazelle angeregt. Am Ende einer spezifischen humoralen Immunantwort bleiben sog. B-Gedächtniszellen über. Diese B-Zellen können durch die Bindung membranständiger Antikörper an Epitope wieder aktiviert werden. Häufig benötigen B-Zellen jedoch co-stimulierende Signale und

Cytokine, die von T-Zellen gebildet werden, um den oben beschriebenen Prozeß in Gang zu setzen.

Das T-Zellsystem der spezifischen Immunabwehr gliedert sich in T-Helferzellen, T-Killerzellen, T-Supressorzellen und T-Gedächtniszellen. Diese Subpopulationen lassen sich durch bestimmte Oberflächenmarker differenzieren. Diesen Markern kommt eine funktionelle Bedeutung zu. T-Zellen exprimieren einen T-Zell-Rezeptor, der durch genetisches Rearrangement eine extrem große Vielfalt an Möglichkeiten hat, präsentierte Moleküle auf MHC I oder II Komplexen zu erkennen. Jeder T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei transmembranösen Peptidketten, die ein Heterodimer bilden ($\alpha\beta$ bzw. $\gamma\delta$). T-Zellen mit T-Zell-Rezeptor $\gamma\delta$ werden überwiegend in den Schleimhäuten des Darmes angetroffen, während T-Zellen mit dem T-Zell-Rezeptor $\alpha\beta$ überwiegend die typischen peripheren T-Zellen sind (ZINKERNAGEL et al. 1998). Der T-Zell-Rezeptor ist mit dem CD3 Molekül assoziiert und je nach Art mit dem CD4 oder CD8 Molekül verbunden, was funktionelle Bedeutung hat.

Dadurch ist dem Immunsystem die Möglichkeit gegeben, fremdes und körpereigenes Material zu unterscheiden. Jede Körperzelle exprimiert den MHC I Komplex, mit dem zelleigene Produkte den T-Zellen präsentiert werden. Dieser Peptid/MHC I Komplex wird von CD8 (ein Korezeptor zur Erkennung von MHC I) positiven T-Zellen erkannt. Zellen, die kein körpereigenes Material präsentieren, da sie z.B. zur Tumorzelle mutiert oder mit einem Virus infiziert sind, werden durch CD8 positive Zellen eliminiert. Dabei werden diese T-Zellen nach Aktivierung durch Co-stimulierende Signale zur T-Killer Zelle (oder T8 cytotoxische Zelle) und können durch den Angriff der Zellmembran mit Effektormolekülen deren Untergang bewirken. Co-stimulierende Signale werden nur durch APZ an T8 Helferzellen gegeben.

T-Helferzellen haben das Oberflächenmerkmal CD4 (ein Korezeptor für MHC II Komplexe). Hier kann es nach Kontakt einer nativen CD4 positiven Zelle mit einem MHC II Komplex zu unterschiedlichen Effektorzellen kommen. Diese Differenzierung unterliegt der Kontrolle durch Cytokine. Man kann anhand ihres Cytokinmusters unterscheiden zwischen Th1 CD4 positiven Zellen und Th2 CD4 positiven Zellen. Infektionen im allgemeinen und im besonderen virale und intrazelluläre bakterielle Infekte induzieren eine starke Th1 Antwort. Diese ist charakterisiert durch eine frühe

Interferon gamma (IFN γ) Produktion, die sowohl eine erhöhte Phagozytosebereitschaft der Macrophagen als auch eine durch T/B-Zell Interaktion erhöhte Produktion von IgG induziert. Th1-Zellen werden durch Interferon gamma und Interleukin 12 aktiviert und durch Interleukin 4 gehemmt. Th2-Helferzellen bilden sich vor allem durch den Kontakt des Organismus mit Allergenen und Parasiten. Sie werden durch Interleukin 4 aktiviert (ZINKERNAGEL et al. 1998). T-Helferzellen stellen ein zentrales Instrument der Immunabwehr des Organismus dar. Nach Erstkontakt bilden sie T-Gedächtniszellen, die bei erneuten Kontakt sofort reagieren und eine Infektion verhindern.

1.2 Das Immunsystem des Darms

Die Oberfläche des Darms ist die größte Kontaktfläche des Organismus zur Außenwelt. Deshalb ist der Darm auch eines der wichtigsten lymphatischen Organe. Morphologische Korrelate des Immunsystems im Darm sind in organisierter Form aggregierte Lymphfollikel des Darmes, die nach ihrem Entdecker, dem schweizer Arzt PEYER, als Peyer'sche Plaques bezeichnet werden. Weitere organisierte Komponenten sind solitäre Lymphfollikel (ILFs="isolated lymphfollicles"), Cryptopatches und die mesenterialen Lymphknoten. Die Organe der Immunabwehr des Darmes werden als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe zusammengefaßt (GALT = „gut associated lymphatic tissue“). In der Darmmukosa finden sich diffus verteilt intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und Lamina propria Lymphozyten (LPL) sowie Macrophagen, dendritische Zellen, T-Zellen oder Plasmazellen, die hier Immunglobulin A synthetisieren. Der größte Teil der immunglobulinproduzierenden Plasmazellen sind in der Darmmukosa zu finden (FIOCCHI 1989).

Die Schleimhäute des Körpers sind die Hauptangriffstellen für Antigene. Die erste Linie der Immunabwehr im Darm bildet das intestinale Epithel. Durch die „Tight junctions“ der Enterozyten können nicht einmal sehr kleine Moleküle penetrieren (MADRA 1998). Zusätzlich bildet das intestinale Epithel protektive Substanzen wie anti-microbielle Peptide, sog. Defensine (AYABE et al. 2000). Es transportiert sekretorisches IgA, (MACPHERSON et al. 2000) und bildet Mukus und Trefoil Peptide (PODOLSKI 1999). An keiner Stelle des Immunsystems hat die unmittelbare Umwelt so viel Einfluß auf die Immunabwehr wie im Darm assoziierten lymphatischen Gewebe (NAGLER-

ANDERSON 2001). Das GALT kann weiterhin in Induktions- und Effektorgebiete getrennt werden. Zu den Induktionsgebiet zählt vor allem der Peyer'sche Plaque mit seinen spezialisierten M-Zellen. Diese Plaques sind Aggregationen von Lymphfollikeln, die hauptsächlich im distalen Ileum des Dünndarmes zu finden sind. Sie haben eine Kuppel-(Dom-)förmige Struktur mit einem besonderen Follikel-assoziierten Epithel, in denen M Zellen die Aufgabe eines transepithelialen Transportes von luminalen Antigenen zukommt (KRAEHENBUHL & NEUTRA 2000).

Das nicht nur M-Zellen für den Transport von Antigenen zum Immunsystem verantwortlich sind, sondern auch spezialisierte dendritische Zellen, die ihre Fortsätze durch die „Tight junctions“ hindurch führen können, wurde kürzlich beschrieben (RESCIGNO et al. 2001). Dendritische Zellen bilden dabei selbst „Tight junction“ Proteine aus, die mit den „Tight junctions“ der Epithelzellen interagieren und hierdurch die Integrität der epithelialen Barriere Gewähr leisten. Über die Signifikanz dieses zusätzlichen Wegs zur Induktion von Immunantworten ist noch nicht viel bekannt.

Zu dem diffus organisierten GALT zählt auch die Lamina propria der intestinalen Villi. Die dort gefundenen Lymphozyten sind in der Mehrzahl IgA sezernierende B-Zellen und Effektor T-Gedächtniszellen (FARSTAD et al. 2000). Immunglobulin A als ein Hauptbestandteil des Immunsystems des Darmes ist ein sekretorisches Immunglobulin. Angesichts der Menge, in der es gebildet wird, wird es kaum systemisch wirksam, da es hauptsächlich auf die mukosalen Flächen übergeht. Es wird nämlich als Dimer über einen Polymerischen Immunglobulin Rezeptor (pIgR) an der basolateralen Seite von Enterozyten in das Darmlumen transportiert. Dort wird es durch Opsonierung von Antigenen im Darm wirksam. Es ist auch beschrieben, daß antigenbeladenes IgA von der Lamina propria durch den gleichen pIgR Mechanismus eingedrungene Antigene wieder in das Darmlumen zurückschleust, so daß nicht nur luminale Antigene, sondern auch bereits eingedrungene Antigene aus dem Organismus entfernt werden (ROBINSON et al. 2001).

Die diffus in der Lamina propria verteilten T-Zellen haben eine wichtige Funktion für das Immunsystem des Darmes. Sie sind T-Gedächtniszellen, zumeist CD4 positive Zellen, die im Villus auf erneuten Antigenkontakt warten (FARSTAD et al. 2001).

Eine Besonderheit des Darms besteht darin, daß dort der anatomisch einzig bekannte Ort einer extrathymischen Reifung von T-Zellen ist. An Mäusen konnte gezeigt werden, daß sich im gesamten Darmtrakt kleine Nester von unreifen Vorläufer-T-Zellen in den Krypten der Lamina propria befinden (SUZUKI et al. 2000). Diese als Cryptopatches bezeichneten Bereiche sind für die Thymus unabhängige Entwicklung von bestimmten intraepithelialen Lymphozyten (IEL) notwendig. IEL bestehen aus peripheren T-Gedächtniszellen und einer besonderen Population, die sich durch die Expression von 2 α Homodimern im CD8-Komplex (anstatt wie üblich CD8 $\alpha\beta$) als solche identifizieren lassen. Diese Subpopulation befindet sich in einem teilweise aktivierten Status und ist abhängig von der normalen intestinalen Flora hinsichtlich ihrer Expansion und Aktivierung. Über die Funktion dieser Subpopulation ist wenig bekannt. Sie scheint einen protektiven Effekt im Rahmen intestinaler Entzündungen zu besitzen. Sie unterstützt die Wiederherstellung der Epithelbarriere nach Verletzung des Epithels. Zudem sollen sie eine Überwachungsfunktion hinsichtlich transformierter Epithelzellen besitzen. Schließlich wird ihnen eine Rolle bei der oralen Toleranz hinsichtlich Antigenen aus Nahrung und Kommensalen zugeschrieben.

Damit T-Zellen im GALT akkumulieren können, muß eine gewebespezifische Migration stattfinden und gesteuert werden. Dadurch können diese Effektor-T-Gedächtniszellen schneller und effektiver an der mukosalen Barriere agieren.

Eine weitere Besonderheit des Immunsystems im Darm ist es, zwischen den ca. 400 harmlosen Mikroben und gefährlichen Pathogenen zu unterscheiden (MCCRACKEN & LORENZ 2001). Dazu bedient sich der Körper eines evolutionsbiologisch alten Systems, das als Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Macrophagen zu finden ist. Diese Rezeptoren können Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) identifizieren (AKIRA et al. 2001). Hierzu sind Macrophagen und dendritische Zellen im Peyer'schen Plaque günstig verteilt, sie sitzen unter M-Zellen, die bevorzugt Pathogene unter die epitheliale Barriere einschleusen (HOPKINS et al. 2000). Durch die Bindung dieser PAMPs an TLRs werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die zur Hochregulierung von co-stimulierenden Signalen führen, die wiederum das nötige Signal für die Aktivierung von nativen T-Zellen sind (JANEWAY 2001). Harmlose als auch für den Organismus gefährliche Mikroben besitzen PAMPs. Zudem führen gerade Kommensalen zu einer T-Zell

unabhängigen Aktivierung von IgA produzierenden B-Zellen, möglicherweise über TGF- β . Allerdings ist das Gros der Kommensalen durch den Mukus von direktem Kontakt mit dem FAE abgeschirmt. Zudem schützt die bloße Anwesenheit von nicht pathogenen Keimen durch Kolonisierung vor pathogenen Keimen (BEATTY & SANSONETTI 1997). Wenn harmlose nicht pathogene Mikroben sich in dendritischen Zellen befinden, dann werden diese Zellen nicht an tiefer gelegenen Stellen im intestinalen Vlies angetroffen, was ein Zeichen für die Nichtaktivierung dieser Zellen ist (GEWIRTZ & MADARA 2001). Es scheint also in dendritischen Zellen die Möglichkeit zu geben, daß nicht invasive, harmlose Keime solche Zellen nicht aktivieren und zur Migration zwingen. Es wird daher angenommen, daß dendritische Zellen verschiedene Gruppen von Toll like Rezeptoren haben und so maßgeschneiderte Cytokinantworten auf die jeweiligen Keime generieren (OZYNSKI et al. 2000).

Dieser komplexe Aufbau des gastrointestinalen Immunsystems ist anfällig für geringe Störungen der Regulation der Immunantwort. So konnten viele Tiermodelle vorgestellt werden, bei denen es durch die Veränderung eines einzelnen immunregulatorischen Cytokins zu einer chronischen Darmentzündung kommt (STROBER et al. 2001). Es wird angenommen, daß auch bei der Crohn'schen Erkrankung eine dysregulierte chronische T-Zell vermittelte Entzündung vorliegt, bei der die o.g. Mechanismen zur Unterscheidung von Pathogen und Nicht-Pathogen außer Kraft gesetzt sind, d.h., daß an sich nicht pathogene Keime eine entzündliche Immunzellantwort provozieren (SARTOR 2000).

Ein anderer Aspekt der intestinalen Immunabwehr ist die Fähigkeit des Immunsystems auf harmlose Antigene keine Immunantwort zu generieren. Diese Fähigkeit wird als orale Toleranz bezeichnet, und die Mechanismen, die zur oralen Toleranz führen, werden im intestinalen Immunsystem vermutet (NAGLER-ANDERSON et al. 2001). M-Zellen scheinen keine Rolle für die Induktion von oraler Toleranz zu spielen, da in Mausmodellen, in denen die Bildung von Peyer'schen Plaques gehemmt und damit die Bildung von M-Zellen ausbleibt, trotzdem orale Toleranz gegenüber löslichen Proteinen induziert werden kann (ALPAN et al. 2001, SPAHN et al. 2001). Im Immunsystems des Darms werden besondere regulatorische T-Zellen generiert, die durch die Sekretion antiinflammatorischer Cytokine eine Entzündung des Darms verhindern. Dazu zählen

CD4 und CD25 doppelt positive T-Zellen (SHEVAHH 2001, THORSTENSEN et al. 2001). Interessanterweise spielen diese T-Zellen eine wichtige Rolle bei einem Darmentzündungsmodell der Maus, wo sie immunregulatorische Eigenschaften zur Limitierung der Entzündung aufweisen (READ et al. 2000).

1.3 Peyer´sche Plaques

An der Außenseite des Rattendünndarms sind Peyer´sche Plaques als kleine 1-5 mm durchmessende, weißliche Erhebungen sichtbar. Sie liegen typischerweise an dem Mesenterium entgegengesetzten Darmende. Am Rattendünndarm lassen sich ungefähr 15 bis 20 solcher von außen sichtbarer Plaques finden. Ein solcher Plaque wiederum besteht mikroskopisch aus ungefähr 3 bis 20 Lymphfollikeln. Dabei ist die genaue Anzahl sowohl vom Alter der Tiere als auch vom Immunstatus abhängig. Der Darm des Menschen weist ungefähr 100 bis 240 solcher Strukturen auf (LAISSURE et al. 1993).

Ein Peyer´scher Plaque läßt sich mikroskopisch in verschiedene Anteile gliedern. Im Zentrum des Follikels findet man überwiegend IgA pos. B-Zellen. Um dieses Zentrum herum findet man eine Mantelzone, in der sich überwiegend T-Zellen und einzelne B-Zellen finden. Auf der Mantelzone zum Darmlumen hin findet man den Dom. Er sitzt der gesamten Struktur wie eine Kappe auf. Hier befinden sich B-Zellen (Plasmazellen), T-Zellen (CD4 pos. Helferzellen), myeloide CD11b positive dendritische Zellen und Macrophagen (COOK et al. 2000, IWASAKI&KESALL 2000). Zu benachbarten Follikeln findet sich eine so genannte interfollikuläre Zone. Dort sind unterschiedliche Subpopulationen von T-Zellen zu finden. Im Peyer´schen Plaque sind auch Blutgefäße. Es sind kleine Venen mit hohem Endothel. Diese spezialisierten Venen (HEV= „high endothelial venules“) ermöglichen Lymphozyten die Wanderung vom Blut in die Plaques (NEUTRA et al. 1996). Der Peyer´sche Plaque besitzt zum Darmlumen hin ein spezialisiertes Epithel, das Follikel-assoziierte Epithel (FAE). Es besteht aus Enterozyten, vereinzelt Becherzellen und den M-Zellen („microfold cells“).

Peyer´sche Plaques entwickeln sich schon genetisch determiniert im Embryo unter sterilen Bedingungen und ohne Stimulation durch Antigene. Die molekularen Mechanismen dieser Genese sind noch schlecht verstanden (KRAEHENBUHL & NEUTRA 2000). Die Bildung der Peyer´schen Plaques kann in drei Phasen eingeteilt werden. Der Beginn der Bildung der ersten Peyer´schen Plaques beim Menschen ist um

die 16. Gestationswoche beschrieben worden, in der 19. Woche finden sich bereits adult organisierte Plaques (BRAEGER et al. 1992). Zuerst unterscheidet man eine Phase der Genese der Lymphgefäße von einer Phase des Einwachsens von Blutgefäßen und Besiedlung mit primitiven lymphatischen Vorläuferzellen. Danach schließt sich eine Phase der zellulären Organisation in bestimmte strukturelle Bereiche des Peyer'schen Plaques an. Die Ausschaltung bestimmter Gene kann die Formation der Peyer'schen Plaques verhindern, nicht jedoch den regulären Aufbau der peripheren Lymphknoten und umgekehrt (FÖRSTER et al. 1996, KONG et al. 1999).

Für die Histogenese der Peyer'schen Plaques als unentbehrlich konnten TNF, die TNF Rezeptor Familie und der Interleukin 7 Rezeptor beschrieben werden (FU et al. 1999). So konnte gezeigt werden, das IL7-Rezeptor Knockout Mäuse keine Peyer'schen Plaques bilden können (ADACHI et al. 1998). Ein wichtiger Ligand für die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie ist Lymphotoxin α ($LT\alpha$) (KORNER et al. 1996). Die meisten $LT\alpha$ Rezeptor und alle Lymphotoxin β ($LT\beta$) Rezeptor Knockout Mäuse haben überhaupt keine Peyer'schen Plaques oder periphere Lymphknoten (DE TOGNI et al. 1994). Interessanterweise bilden jedoch Mäuse, die kein $LT\beta$ produzieren können, Lymphknoten im Mesenterium (KONI et al. 1998).

Die Bildung der Peyer'schen Plaques ist jedoch nicht auf das fetale Leben beschränkt. In einem SCID-Maus Modell, bei denen sich keine Peyer'schen Plaques bilden, konnte nach intravenöser Injektion von Lymphzellen der Peyer'schen Plaques gesunder Mäuse die Bildung von Peyer'schen Plaques erzielt werden (SAVIDGE et al. 1995). Zudem wurde beobachtet, daß Mäuse, die zunächst keimfrei und anschließend in einer normalen Umwelt gehalten wurden, mehr Peyer'sche Plaques aufwiesen als vorher (SMITH et al. 1987).

Ein weiterer Mechanismus der Bildung von Peyer'schen Plaques wurde kürzlich an CXCR5 defizienten Mäusen gezeigt. Durch das Chemokin CXCL13 wird auf $CD4^+CD3^-CD45^+$ Lymphozyten ein Integrin aktiviert. Im weiteren Verlauf interagieren diese Zellen mit intestinalen Stromazellen, die über Lymphotoxine die Bildung von Peyer'schen Plaques ermöglichen. CXCR5 defiziente Mäuse bilden daher keine Peyer'schen Plaques (FINKE et al. 2002).



Abbildung 1: Querschnitt durch das Ileum mit Schleimhautzotten und Lymphfollikeln, welche in der Submucosa als organisierte Peyer'sche Plaques auftreten. In der Schleimhaut über den Peyer'schen Plaques fehlen die Zotten. Auf der Mantelzone sitzt wie eine Kappe der Dom, der aus B-Zellen, T-Zellen, Macrophagen und Plasmazellen besteht. (Abb. entnommen aus „Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie“ von W. Kühnel, Thieme-Verlag, 9.Auflage 1995.)

1.4 M-Zellen

M-Zellen wurden erstmals in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben (OWEN et al. 1974). Da sie lichtmikroskopisch nicht von Enterozyten des FAE zu unterscheiden sind, wurden sie zuerst elektronenmikroskopisch beschrieben. Dazu gehört u.a. die apikale Ausbildung von zytoplasmatischen Ausstülpungen („microfolds“) und die Bildung einer Zytoplasmaeinstülpung, in der sich Zellen des Immunsystems befinden. Im Darmtrakt der Ratte findet man unter normalen Bedingungen im Follikel-assoziierten Epithel ungefähr 4% M-Zellen (TRIER 1991). M-Zellen sind keine besondere Entität des Darms, sie kommen vielmehr an allen MALT-Systemen des Körpers vor, so auch in den mukosalen Lymphfollikeln der Lunge und der Nasenschleimhaut (GEBERT 1995, PABST 1995, VAN DER VEN&SMINIA 1993, BIENENSTOCK&CLANY 1994).

M-Zellen besitzen im Gegensatz zu Enterozyten keinen geordneten Bürstensaum, sie haben nur vereinzelt Mikrovilli-ähnliche Strukturen. M-Zellen haben keine ausgeprägte Glykokalix. Dies ermöglicht Mikroorganismen und anderen Antigenen anscheinend die Adhärenz an M-Zellen (OWEN 1994). Ihre Zellkerne befinden sich an der basolateralen Seite. Die Natrium-Kalium-ATPase Aktivität scheint geringer zu sein als die der Enterozyten. Dies deutet darauf hin, daß M-Zellen keine Nährstoffe aufnehmen. Im

Vergleich zu Enterozyten haben M-Zellen apikal eine reduzierte alkalische Phosphatase Aktivität, was durch das Fehlen der Bürstensaummembran bedingt ist (OWEN u. BHALLA 1983, HOGENESCH u. FELSBURG 1990, GEBERT et al.1996).

Über dem Follikel-assoziierten Epithel ist, bedingt durch die sporadisch dort vorkommenden Becherzellen, weniger Schleim zu finden. Dies ermöglicht einen schnelleren Kontakt von antigenen Material mit dem Epithel (BHALLA u. OWEN 1982). Zur Aufgabe der M-Zellen gehört es, antigenes Material durch Endozytose aufzunehmen und es durch Transzytose an die immunkompetenten Zellen in den Peyer'schen Plaques weiter zu leiten. Die Auswanderung immunkompetenter Zellen im Bereich der M-Zell-Tasche führt zu einer Einstülpung, die einen schmalen Zytoplasmasaum der M-Zelle bedingt. Dadurch wird eine erheblich verkürzte Transzytose-Strecke erreicht. Im apikalen Zytoplasma sind viele Microvesikel und Mitochondrien beschrieben, Lysosomen sind hier rar anzutreffen (KATO u. OWEN 1994). Allerdings konnten an Rattendarmzellen endosomale-lysosomale Kompartimente identifiziert werden (ALLAN et al. 1993). Es wird angenommen, daß die verringerte Anzahl von Lysosomen dazu beiträgt, daß die aufgenommenen Partikel bei der Transzytose nicht verdaut werden und so authentisch dem Immunsystem dargeboten werden können.

Nach Aufnahme der Antigene über M-Zellen wird die mukosale Immunantwort gestartet.

Basolateral bilden M-Zellen eine Einstülpung zum Lumen hin. Diese M-Zell-Tasche beherbergt verschiedene Zellen des Immunsystems wie sporadische Macrophagen, dendritische Zellen, T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten. Dabei gehören 60% dieser B-Zellen zur Gruppe der B-Gedächtniszellen (sIgD negativ und CD20 positiv) und fast alle angetroffenen T- Zellen sind T- Gedächtniszellen (CD45RO und CD4 positiv) (FARSTAD et al. 1994). Die anderen 40 % der B-Zellen sind reife, noch nicht mit Antigenen in Kontakt getretene B-Zellen (sIgD positiv, CD20 positiv). Sie erhalten durch die Transzytose der M-Zellen antigenes Material. Plasmazellen werden hier nicht angetroffen.

Die M-Zell-Tasche ist ein besonderer Ort der B/T-Zell Interaktion, bei der es zur Formierung von B-Gedächtniszellen und zur Klonierung dieser Zellen kommt. Durch die große Zahl von B-Zellen in der M-Zell-Tasche sind sie die wichtigsten

antigenpräsentierenden Zellen dort. Die in der M-Zell-Tasche vertretenen T-Gedächtniszellen interagieren über das CD40/CD40L System mit den B-Gedächtniszellen, die CD80/86 exprimieren. Zudem exprimieren die B-Gedächtniszellen dort CD27 und Bcl-2, welche antiapoptotisch wirken. Durch dieses besondere Mikroklima wird die M-Zell-Tasche zu einem an die Epithelbarriere vorgeschobenen Keimzentrum (YAMANAKA et al. 2001).

Die Ontogenese der M-Zellen wird kontrovers diskutiert. Eine Hypothese besagt, daß M-Zellen, wie andere Epithelzellen, sich aus Stammzellen entwickeln. Diese These wurde hauptsächlich am Darm erforscht, wo alle Epithelzellen aus Stammzellen, die in den Krypten lokalisiert sind, generiert werden. Jede Krypte hat einen ringförmig angeordneten Pool von Stammzellen, die jeweils Vorläuferzellen bilden, die erst beim Aufwandern auf den Dom des Peyer'schen Plaques oder des Villus sich zu den jeweiligen ausdifferenzierten Epithelzellen wandeln (SCHMIDT et al. 1985). Der Lebenszyklus der Epithelzellen im FAE endet, wenn sie das Zentrum des FAE der Peyer'schen Plaques (BYE et al. 1984 und GEBERT et al. 1999) oder die Spitze eines Villus erreicht haben (GAVRIELI et al. 1992). Dort schillfern sie in das Darmlumen ab oder werden phagozytiert durch dendritische Zellen, die zum dränierenden mesenterialen Lymphknoten wandern (HUANG et al. 2000). Das Differenzierungsprogramm von Stammzellen in den Krypten der Peyer'schen Plaques beinhaltet also auch die Differenzierung der nur hier vorkommenden M-Zellen. Daß diese Faktoren sehr früh in die Differenzierung der Epithelzellen hin zu M-Zellen eingreifen, wird aus morphologischen und immunhistochemischen Studien geschlossen (BYE et al. 1984, GEBERT & HACH 1993, GIANNASCA et al. 1994, GEBERT & PABST 1999).

Eine zweite Hypothese zur Ontogenese besagt, daß es eine Entwicklung durch Konversion aus bereits differenzierten Enterozyten gibt.

Es gibt Hinweise, daß Zell-Zell-Kontakte oder lösliche Faktoren bei der Differenzierung der M-Zellen eine Rolle spielen (SAVIDGE et al. 1992). Zudem wurde beobachtet, daß die Anzahl der M-Zellen im FAE innerhalb von Stunden ansteigt, wenn der Darm einem normalerweise nicht-intestinalen Bakterium ausgesetzt wird (BORGHESI et al. 1999), so daß vermutet werden kann, daß einige Enterozyten im FAE in der Lage sind,

sich zu M-Zellen zu differenzieren. Eine weitere Beobachtung stützt die These von der Plastizität der Epithelzellen im Darm. In Rattendarm und humanem Darm finden sich M-Zellen gehäuft an den Flanken des Domes und selten an der Spitze (FUJIMURA et al. 1986, SIERRO et al. 2000). Es wurde daher vorgeschlagen, daß M-Zellen auch wieder in Enterozyten zurückkonvertieren könnten (KERNEIS et al. 1996). Bei Maus-Peyer'schen Plaques wurden entsprechende Zwischenstufen im FAE beobachtet, nicht jedoch bei Peyer'schen Plaques von Kaninchen und im Appendix (BORGHESI et al. 1999). Das Vorhandensein von M-Zellen nur in Verbindung mit Lymphfollikeln deutet auf eine Rolle von Lymphozyten bei der Differenzierung von M-Zellen hin (HEIN 1999). Dabei scheint den B-Zellen eine besondere Rolle zuzukommen. Die Größe und Anzahl von M-Zellen ist stark reduziert bei bestimmten B-Zell defizienten Mäusen (GOLOVKINA et al. 1999, KRAEHENBUHL & NEUTRA 2000). Nach transgener Expression von membranständigem IgM konnten sich FAE und M-Zellen beim Igh-6 Mausstamm in normaler Größe und Zahl bilden, der per se nicht dazu in der Lage ist (GOLOVKINA et al. 1999). Daraus schließt man, daß B-Zellen bei der Formation und Bildung von M-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Vermehrung von M-Zellen im FAE nach mikrobiellem Milieu Wechsel mit einer Vermehrung von intraepithelialen B-Zellen einhergeht (BORGHESI et al. 1999). Ein *in vitro* Modell von B-Zellen und Enterozyten der Caco-2 Linie in Co-Kultur zeigte die Umwandlung der Enterozyten in M-Zell-artige Zellen (KERNEIS et al. 1997). Diese Zellen zeigten einen Umbau ihrer Microvilli und konnten temperaturabhängig *V. cholera* und *Y. enterocolica* Bakterien transportieren (SCHULTE et al. 2000). Die Möglichkeit, daß Lymphozyten des Peyer'schen Plaques FAE und M-Zellen induzieren könnten wurde durch ein Experiment bestätigt, bei dem de novo neue Lymphfollikel mit FAE und typischen M-Zellen entstanden sind. Dafür wurden SCID-Mäusen Lymphozyten von Peyer'schen Plaques gesunder Mäuse i.v. gegeben (SAVIDGE & SMITH 1995).

Beide Hypothesen zur Ontogenese der M-Zellen werden durch ein kürzlich vorgestelltes Modell der Plastizität der Epithelzellen ergänzt. Dabei sollen sich M-Zellen aus Stammzellen generieren. Die zunächst phänotypischen Enterozyten sollen sich dann unter dem Einfluß des besonderen Umfeldes im FAE, wie z.B. der Basalmembran, zu M-Zellen differenzieren (SIERRO et al. 2000).

1.5 Mukosale Antigenaufnahme über M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel

M-Zellen besitzen die Fähigkeit zur Transzytose von antigenem Material. Diese Transzytose zu den lymphatischen Zellen in der M-Zell-Tasche der basolateralen Membran geschieht in kurzer Zeit (10-15 Minuten) (NEUTRA et al. 1996, TRIER 1991). Über die M-Zell vermittelte Aufnahme von Molekülen, Partikeln, Bakterien, Viren oder Parasiten besteht kein Zweifel mehr. In Tabelle 1 wird eine Übersicht über die bisher beschriebenen Substanzen und Mikroorganismen gegeben.

Partikel und Makromoleküle	Bakterien
Natives Ferritin	Brucella abortus
positiv ionisiertes Ferritin	Campylobacter jejuni
Meerrettichperoxidase	Escherichia coli O:124 K:72
Agglutinin I und II aus Ricinus communis	Escherichia coli RDEC-1
Agglutinin aus Weizenkeimlingen	Mycobacterium paratuberculosis
Cholera Toxin	Salmonella enteritidis
Latexpartikel (600 u. 750 nm)	Salmonella typhi
Rußpartikel	Shigella flexneri
Liposomen	Streptococcus pyogenes u. pneumoniae
Lektine	Vibrio cholerae
Hydroxylapatit	Yersinia enterocolica
	Yersinia pseudotuberculosis
Viren	Parasiten u.a.
Reovirus Typ 1 und 3	Cryptosporidium
Poliovirus Typ 1	Giardia muris
Human Immunodeficiency Virus Typ 1	
Mouse mammary tumor virus (MMTV)	

Tabelle 1: Substanzen und Mikroorganismen, die von M-Zellen aufgenommen werden

(nach KATO u. OWEN 1994, GEBERT et. al. 2000)

Die Vielzahl der unterschiedlichen Antigene, die durch M-Zellen aufgenommen werden, deuten auf eine eher unspezifische Aufnahme durch Endozytose hin. Die so in

Vesikel aufgenommenen Antigene werden nicht, wie normalerweise üblich, mit Lysosomen gekoppelt, sondern werden durch die M-Zelle durchgeschleust. So erreichen Bakterien und Viren aufgrund der herabgesetzten lysosomalen Aktivität recht unverändert die in der M-Zell-Tasche liegenden Lymphozyten. Man nimmt an, daß auch Makromoleküle die Lymphozyten unverändert erreichen können.

In der M-Zell-Tasche werden die Antigene nun durch mononukleäre Zellen aufgenommen und prozessiert. Durch den frühen Kontakt mit dem Immunsystem kann nun eine Immunantwort bereits in der M-Zell-Tasche induziert werden.

Im gesamten Dombereich befinden sich ebenfalls Macrophagen, folliculäre dendritische Zellen, B-Zellen und T-Helferzellen (NEUTRA et al. 1996). Im Keimzentrum kann es nun zur Generierung von Plasmazellen kommen, die IgA produzieren. Sie wandern über afferente Lymphgefäße aus und gelangen in den Blutkreislauf. Auf diese Weise erreichen sie auch die entfernteren mukosalen Oberflächen und sorgen dort für eine spezifische humorale Immunabwehr des zuvor durch M-Zellen aufgenommenen Antigens. Schädliche Makromoleküle (z.B. Enterotoxine) können auf diesem Weg neutralisiert werden (ZINKERNAGEL et al. 1998, MESTECKY et al. 1991).

1.6 M-Zellen als Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen

Wie eingangs erwähnt, können verschiedene Mikroorganismen sich bevorzugt an M-Zellen binden. Einige haben sogar eine spezielle Methode entwickelt, um die Epithelbarriere zu überwinden, indem sie M-Zellen als Eintrittspforte nutzen. Somit ist das Organ der mukosalen Immunabwehr, der Peyer'sche Plaque, auch gleichzeitig ein Schwachpunkt in der körpereigenen Abwehr.

Viele Untersuchungen zur Invasion von Bakterien wie z.B. Salmonellen, Yersinien, Shigellen und Listerien sowie enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) wurden an Tiermodellen vorgenommen, dennoch tragen diese Ergebnisse zum Verständnis des Infektionsablaufes beim Menschen bei (HANSKI et al. 1998). Als initialer Schritt wird die Adhärenz des Bakteriums an die M-Zelle beschrieben. In der Zytoplasmamembran der M-Zelle befinden sich bestimmte Rezeptoren wie Integrine und Cadherine, die den Bakterien als Zielstruktur dienen. Da M-Zellen Antigene im Wesentlichen unverändert unter die Epithelschicht transportieren, gelangen so Bakterien unter die Basalmembran. Durch ihre speziellen Eigenschaften der jeweiligen Bakterien wie Virulenz- und

Pathogenitätsfaktoren kommt es nun zu einer Infektion des Wirtes. Kann die körpereigene Abwehr nicht mehr rechtzeitig eingreifen, ist es den Bakterien möglich, in die Blutbahn einzudringen. Diese allgemeine Beschreibung wird von den unterschiedlichen Bakterien im Speziellen modifiziert.

So konnte für Salmonellen ein entsprechendes Infektionsprinzip gezeigt werden. Durch die bevorzugte Anhaftung an M-Zellen können sie schnell unter das Epithel gelangen. Sie lösen lokal eine Membranveränderung („membrane ruffling“) aus, bei der es zur Reorganisation von Aktin-Filamenten kommt. Nun werden sie von der M-Zelle in eine membrangebundene Vakuole aufgenommen. Nach kurzer Transzytosezeit erreichen die Salmonellen unverändert die M-Zell-Tasche. Dort werden sie von mononukleären Zellen phagozytiert. Durch die Verhinderung des „oxidative burst“ und andere Virulenzfaktoren überleben die Salmonellen die Phagozytose durch mononukleäre Zellen und gelangen so in den Kreislauf. Auf diesem Weg ist die Barriere des Epithels geöffnet für Salmonellen (FINNALY u. FALKOW 1997, JONES et al. 1995, HANSKI et al. 1989).

Ein weiteres Konzept konnte am Mausmodell erforscht werden. Yersinien können wie Salmonellen an M-Zellen anhaften und aufgenommen werden. Sind die Yersinien unter dem Epithel angelangt, bilden sie ein Protein auf ihrer Außenseite, das Invasin. Dieses Protein interagiert mit $\beta 1$ Integrienen der benachbarten Zellen. Auch Yersinien haben bestimmte Pathogenitätsfaktoren, wie die Verhinderung der Phagozytose durch mononukleäre Zellen, mit dem sie eine Immunantwort verhindern. Nach ca. 24 Stunden lassen sich Mikroabszesse im Dombereich des Peyer'schen Plaques beobachten, der Plaque wird im Verlauf von 5 bis 7 Tagen zerstört. Die Entzündung breitet sich nun auf die angrenzenden Zotten aus (AUTENRIETH & FIRSCHING 1996).

Bei Shigellen greift ein modifiziertes Konzept. *Shigella flexneri* ist nicht in der Lage, den Darm von der apikalen Seite aus zu infizieren. Erst nach Passage durch M-Zellen greifen sie von der basolateralen Seite benachbarte Enterozyten an. Hier beobachtet man wieder das „membrane ruffling“, ähnlich wie bei Salmonellen. Es kommt zu einer Ausbildung von Pseudopodien des Enterozyten durch die umschriebene Polymerisation von Aktin. Jetzt folgt die Internalisierung des Bakteriums. Zur Invasion des Enterozyten bedient sich *Shigella flexneri* eines besonderen Mechanismus. Die Bakterien bilden an einem ihrer Pole einen Aktinschweif. Trifft das Bakterium wiederum auf eine

Membran, so bilden sich erneut Pseudopodien, die weit in das Zytoplasma der benachbarten Zelle reichen. Nun wird ein Vesikel eingeschnürt, aus dem *Shigella flexneri* freigesetzt wird. So erfolgt eine Invasion von Zelle zu Zelle (NEUTRA et al. 1996, SIEBERS&FINNALY 1996).

Enteropathogene *E. coli* O:124 (EPEC) und RDEC-1 und ihre Interaktion mit M-Zellen sind am Kaninchenmodell gezeigt worden. Ihre Adhärenz wird über Pilli vermittelt (NEUTRA 1996). Direkt unterhalb des Bakteriums kommt es zu einer Aktinansammlung, die als „pedestal“ bezeichnet wird (FINNALY&FALKOW 1997). Interessanterweise wird die Aufnahme des Bakteriums in die Zelle durch ein „pedestal“ verhindert. Seine Funktion im Infektionsgeschehen bleibt noch ungeklärt.

1.7 Die Rolle der M-Zellen bei akut und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Neben den spezifischen, d.h. durch bekannte Erreger ausgelösten Darmerkrankungen sind zwei Formen unspezifischer entzündlicher Darmerkrankungen bekannt. Zum einen gibt es den Morbus Crohn (Ileitis terminalis Crohn) und zum anderen die Colitis ulcerosa. Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine chronische rezidivierende, alle Wandschichten betreffende Entzündung, die grundsätzlich den gesamten gastrointestinalen Trakt betreffen kann. Die Colitis ulcerosa ist eine chronisch rezidivierende, nur die Schleimhaut betreffende Entzündung, die auf den Dickdarm begrenzt ist. Obwohl eindeutige Unterschiede im morphologischen Erscheinungsbild dieser Erkrankungen existieren, gibt es doch ein ähnliches klinisches Bild. Die Patienten berichten über Gewichtsverlust, Schwäche und Fieber. Hinzu kommen mitunter sehr quälende Bauchschmerzen. Ist der Dickdarm betroffen, kommt Durchfall hinzu, der oft blutig-schleimig ist. Der M. Crohn hat häufig als Komplikation die Fistelbildung zwischen dem entzündeten Darm und anderen Strukturen wie z.B. Harnblase, Haut oder benachbarte Darmschlingen. Die Inzidenz beider Erkrankungen liegt bei 5 bis 10 pro 100000 pro Jahr, sie ist seit den 60er Jahren angestiegen. Beide Erkrankungen sind in Industrieländern häufiger anzutreffen als in Entwicklungsländern. Beide Krankheiten sind nicht geschlechtswendig.

Die Ätiologie beider Erkrankungen ist Gegenstand intensiver Forschung. Es zeigt sich, daß genetische Komponenten ebenso wie Umweltfaktoren ätiologisch bedeutsam sind.

Es kommt in der Folge zu einer Entgleisung des Immunsystems im Darm, bei der eine dysregulierte T-Helferzellenantwort und ein Zusammenbruch der Barrierefunktion des Epithels eine Rolle spielt. Einen indirekten Hinweis ergibt die Beobachtung, daß Patienten mit Morbus Crohn, die eine HIV-Infektion erleiden, dann oft eine Remission erreichen, wenn die Fraktion der T-Helferzellen im Blut abfallen (RENZ-POLSTER, BRAUN 2000). Die genaue Pathogenese ist jedoch noch unklar. Die Therapie beim M. Crohn besteht derzeit im Wesentlichen auf der Gabe von Immunsuppressiva.

Über die Rolle der M-Zelle in spezifischen bakteriellen Darmerkrankungen wurde viel publiziert (NEUTRA et al. 1996), während dessen die Rolle der M-Zelle in der chronischen Ileitis bisher wenig verstanden ist. Bei der Pathogenese der chronischen Entzündungen im Darm spielt der Zusammenbruch der Epithelbarriere und eine veränderte Antigenaufnahme eine besondere Rolle. Der Zusammenbruch der Barrierefunktion des Epithels durch Apoptose von Enterozyten wird als möglicher Pathomechanismus für die Induktion einer intestinalen Entzündung angesehen (STRÄTER et al. 1997). Da M-Zellen die ersten Zellen sind, die bei einer Ileitis apoptotisch werden, scheint ihnen hier eine besondere Stellung bei der Initiation einer mukosalen Entzündung zuzukommen (KUCCHARZIK et al. 2000). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, daß M-Zellen vermehrt im FAE anzutreffen sind. Es wurde spekuliert, daß die gezielte Apoptose der M-Zellen im FAE bei Entzündungen der Versuch des Körpers ist, die gestörte Barrierefunktion zu reparieren.

Ein weiterer Hinweis auf die Rolle der M-Zellen im Rahmen chronischer Darmentzündung ist ihre Besonderheit, unspezifisch Antigene aufzunehmen. Eine Hypothese dazu besagt, daß sich die Antigenaufnahme qualitativ und quantitativ unter entzündlichen Bedingungen ändert. Dies wird aus elektronenmikroskopischen Beobachtungen geschlossen (KUCCHARZIK et al. 2000).

Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß auch bei der Spondylarthropathie-assoziierten Darmentzündung eine starke Vermehrung von M-Zellen zu verzeichnen ist (CUVELIER et al. 1994), was ein weiterer Hinweis auf ihre mögliche pathogenetische Bedeutung ist. Auf der anderen Seite wurde ein Verlust von M-Zellen im Epithel von Lymphfollikeln des Colons bei M. Crohn berichtet, der wiederum im Zusammenhang mit der vermehrter Apoptose der M-Zellen erklärt wird (FUJIMURA et al. 1992).

Andere Epithelzellen des FAE scheinen ebenfalls bei der Initiation und Unterhaltung einer mukosalen Entzündung beteiligt, so daß die Rolle der M-Zellen bei chronischen Darmentzündung einer weiteren Klärung bedarf (SCHUERER-MALY et al. 1994, KUCHARZIK et al. 1998).

1.8 Problemstellung

Aus den Vorarbeiten geht hervor, daß M-Zellen eine Bedeutung für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) besitzen. Die Charakterisierung von M-Zellen in der Entzündung gestaltet sich durch ihr geringes Vorkommen im FAE schwierig. Zudem lassen sich M-Zellen nicht durch übliche konventionelle Färbungen lichtmikroskopisch darstellen. Da es keine etablierte Zellkultur von M-Zellen gibt, anhand derer man weitergehende Untersuchungen zu ihrer Rolle in der Entzündung machen könnte, wurde hier auf das Tiermodell zurückgegriffen.

In dieser Arbeit soll auf die Frage eingegangen werden, ob und wie M-Zellen unter den Konditionen der akuten Entzündung zu einer gestörten Barrierefunktion beitragen. Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, ob es zu einer veränderten Antigenaufnahme durch M-Zellen kommt und weshalb hier besonderer Wert auf die Untersuchung der M-Zell-Tasche gelegt wurde. Dies führt wiederum zu der Fragestellung, ob es in weiterer Konsequenz zu einer veränderten Immunantwort kommt. Schließlich ist auch von Interesse, ob die Beobachtung von M-Zellen in der Entzündung Aufschluß geben kann über ihre Entstehungsweise. In diesem Rahmen wurde auf die Frage eingegangen, wie die Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen sowohl im gesunden als auch im chronisch und akut kranken Tier zu charakterisieren ist. Desweiteren sollte die Kinetik der M-Zell-Proliferation und Induktion in der akuten Ileitis beschrieben werden.

Erweiterte Kenntnisse über die Interaktion von Lymphozyten und M-Zellen könnten vielleicht dazu beitragen, daß Verständnis von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu verbessern und mögliche an der Ätiologie orientierte Therapien zu entwickeln.

2. Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie oder Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort, Land
Acetic Anhydride	Sigma, München; BRD
BSA (Rinderserumalbumin, „bovine serum albumine“)	Bimol, Hamburg, BRD
DAB (3,3-Diaminobenzidin Tetrachlorid) „ready to use“	ImmoGenex, San Ramon, USA
DABCO (1,4 Diazobicyclo(2,2,2)octan)	Merck-Schuchart, Hohenbrunn, BRD
DEPC (Diethyl Pyrocarbonat)	Sigma, München, BRD
DMF (Dimethylformamid)	Serva, Heidelberg, BRD
D-PBS (Dulbeccos phosphat buffered saline)	Serva, Heidelberg, BRD
EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)	Sigma, München, BRD
Fast Red TR (4 Chloro-2-Methylbenzen Diazoniumsalz)	Sigma, München, BRD
FITC conjugated Streptavidin	Jackson ImmunoRes., San Diego, USA
HRP conjugated Streptavidin	Jackson ImmunoRes., San Diego, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, BRD
Glycin	Merck, Darmstadt, BRD
Hybridisation Solution	Sigma, München, BRD
Indomethazin	Sigma, München, BRD
Isopentan (2 Methylbutan)	Merk, Darmstadt, BRD
Kaliumdihydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Magnesium Dichlorid*6H ₂ O	Merck, Darmstadt, BRD
Moviol 4.88	Calbiochem, Bad Soden, BRD
Naphthol-ASMX-Phosphat	Sigma, München, BRD
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, BRD
O.C.T. Tissue Tek	Bayer Diagnostics, München, BRD
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, BRD

Pefabloc	Boehringer, Mannheim, BRD
Peroxidase conjugated Streptavidin	Jackson ImmunoRes., San Diego, USA
RNase freie Proteinase K	Sigma, München, BRD
RNase A	Sigma, München, BRD
Sucrose	Sigma, München, BRD
Triethanolamin	Sigma, München, BRD
Triton X-100	Sigma, München, BRD
Trizma-Base (Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma, München, BRD
Trizma-HCL (Tris(Hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)	Sigma, München, BRD
Ziegenserum	Gibco BRL, Eggenstein, BRD

Tabelle 2: Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien (z.B. Salze, Säuren, Laugen und Lösungsmittel) wurden in p.A. Qualität von den Firmen Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Die nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden in Standardqualität von den jeweiligen Herstellern bezogen.

2.2 Verwendete Antikörper

Die verwendeten Antikörper (sowohl primäre als auch sekundäre) sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Dabei steht die Abkürzung „mAb“ für „monoclonal Antibody“ (monoklonaler Antikörper) und „pAb“ für „polyclonal Antibody“ (polyklonaler Antikörper). Bei polyklonalen Antikörpern entfällt die Angabe des Klons. Die immunhistochemische Arbeitsverdünnung (IHC Arbeitsverdünnungen) ist die in dieser Arbeit ermittelte Konzentrationsverdünnung, bei der die besten optischen Resultate erzielt wurden. Verdünnt wurde mit 0,1 % BSA in PBS.

Name	Klon	Hersteller	Konzentration	ICH Arbeits- Verdünnung
Anti-Cytokeratin Nr. 8 mAb	4.1.18	Boehringer Mannheim, BRD	50 µg/ml	1:20
Anti-Rat CD25(IL-2R α chain) mAb	OX-39	Pharmingen, USA	0,5 mg/ml	1:400
Biotin polyclonal anti-mouse Ig (multiple adsorption)	entf.	Pharmingen, USA	0,5 mg/ml	1:100
Anti-Rat CD8a mAb	OX-8	Pharmingen, USA	0,5 mg/ml	1:400
Anti-Rat CD4 mAb	W3/25	Diagnostic International, Karlsdorf, BRD	1 mg/ml	1:400
Anti-Rat αβ T-Cell-Receptor mAb	R73	Diagnostic International, Karlsdorf, BRD	1 mg/ml	1:400
Anti-Rat B Cells mAb	RLN-9D3	Serotec Ltd., UK	0,2 mg/ml	1:500
Anti-Rat CD11b mAb	ED8	Diagnostic International, Karlsdorf, BRD	0,25 mg/ml	1:400

Tabelle 3: Antikörper

2.3 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit als Versuchstiere verwendeten Ratten wurden von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln bezogen. Bei den Ratten handelte es sich um den Inzuchtstamm Wistar Unilever HsdCpd:WU. Diese Tiere waren ausschließlich weiblichen Geschlechts und wogen im Durchschnitt 200 g. Eine Gewöhnungsphase von mindestens einer Woche erlaubte es den Tieren, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentalen Einrichtung (ZTE) der Universität Münster unter nichtsterilen Standardbedingungen mit einem 12-stündigen Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Die Ratten hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter.

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 PBS (Phosphatpuffer)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Aqua dest. ad	1 l
pH = 7,4	

2.4.2 AP-Puffer (Alkalische Phosphatase Puffer)

Tris-HCL	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Aqua dest	1 l
pH auf 9,5 einstellen	

2.4.3 0,1 % BSA in PBS/10%ZS („bovine serum albumine“ in Phosphatpuffer mit Ziegen Serum)

Ziegen Serum	100 ml
BSA	1 g
PBS (1x) ad	900 ml

2.4.4 0,3 % H₂O₂ in PBS

H ₂ O ₂ aus Stammlösung 30 %	1ml
in PBS (1x)	100 ml

2.4.5 DEPC H₂O

DEPC	1 ml
Aqua bidest. ad	1 l
Flaschen zuvor bei 250° über Nacht backen, pH auf 7,2 einstellen, 1 h Inkubation bei RT, dann autoklavieren (121° für 20 min)	

2.4.6 1 M Glycin/PBS DEPC behandelt

für	500 ml
Glycin	37,5 g
in PBS (1x)	
DEPC	0,5 ml
autoklavieren	
pH 7,4 mit NaOH einstellen	
gekühlt aufbewahren	

2.4.7 4% PFA/PBS pH 7,0 (Paraformaldehyd)

für	500 ml
Paraformaldehyd	20 g
in PBS(1x)	500 ml
bei 70° für 4-5 h rühren lassen	
pH 7,0 mit 1 N NaOH einstellen, gekühlt und lichtgeschützt lagern	

mit 0,1 % DEPC behandeln für *In Situ* Hybridisierungsversuche

2.4.8 Proteinase K Stammlösung (Konzentration 40mg/ml)

Proteinase K RNase frei	125 mg
DEPC-H ₂ O ad	3,125 ml
in 312,5 µl Aliquot (12,5mg), 4h bei RT inkubieren	

2.4.9 0,1 M TEA-Puffer pH 8,0 (Triethanolamin)

für	500 ml
Triethanolamin Base	6,65 ml
DEPC H ₂ O	450 ml
pH 8,0 mit 1 N NaOH einstellen, dann auf 500 ml mit DEPC-H ₂ O auffüllen.	

2.4.10 20x SSC (Standart Saline Citrate)

für	1000 ml
NaCl	175 g
Na ₃ Citrat	88 g
Aqua dest. ad	1 l
pH 7,0 einstellen	

2.4.11 RNase A

für	10 mg/ml
RNase A	100 mg
DEPC H ₂ O	10 ml
Aliquot zu 1 ml, 2 min kochen, bei -20° lagern	

2.4.12 DEPC PBS

für	1000 ml
PBS (1x)	1000 ml
DEPC	1 ml
in zuvor gebackenen Flaschen (250° über Nacht) ansetzen, 1 h Inkubation bei RT, autoklavieren	

2.4.13 20% Sucrose Lösung

für	1000 ml
Sucrose	200 g
KCL	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	2,16 g
DEPC H ₂ O, autoklavieren	1000 ml

2.4.14 0,3 % Triton X 100 Lösung

für	1000 ml
Triton X 100	3 ml
DEPC-PBS, autoklavieren	997 ml

2.4.15 TE Puffer (Trizma/EDTA Puffer für Proteinase A Verdauung)

für	1000 ml
Trizma HCl	15,7 g
EDTA	18,6 g
DEPC H ₂ O	ad 1000 ml
pH 8,0 einstellen, autoklavieren	

2.4.16 NTE Puffer (NaCl/Trizma/EDTA Puffer)

für	500 ml
NaCl	14,6 g
Trizma HCl	0,785 g
EDTA	0,186 g
Aqua dest. ad	500 ml
pH 8,0 einstellen	

2.4.17 Eindeckmedium Moviol/DABCO (nach HARLOW/LANE 1988)

Zur Herstellung des Mediums werden 6 g Glycerin und 2,4 g Moviol mit einem Magnetrührer vermischt. Danach 6 ml Aqua dest. zugeben und weiterrühren für 4 bis 5 Stunden bei Raumtemperatur (RT). Anschließend 12 ml 0,2 M Trizma-Base-Puffer pH 8,5 hinzugeben. Vorgang fortsetzen und intermittierend für 10 min auf ca. 50° Celsius erhitzen. Abschließend 2,5 % 1,4 Diazobicyclo(2,2,2)octan (DABCO) hinzufügen. Das so gewonnene Eindeckmedium kann jetzt aliquotiert und bei -20° Celsius eingefroren werden. Aufgetaute Aliquots können mehrere Tage bei dunkler Lagerung benutzt werden.

3. Methoden

3.1 Induktion einer akuten oder chronischen Ileitis bei der Ratte mit Indomethazin

Zur Untersuchung der M Zellen unter entzündlichen Bedingungen wurde ein Tiermodell verwendet.

Nach YAMADA et al. 1993 wird bei der Ratte durch die einmalige subcutane Gabe von Indomethazin in der Konzentration von 7,5 mg/kg Körpergewicht eine akute Ileitis ausgelöst. Dazu wird eine Indomethazindosis in sterilfiltrierter 5% NaHCO₃-Lösung aufgelöst und der Ratte in eine Hautnackenfalte gespritzt. Die Letalität dieser Ileitis liegt nahe 0, das Modell ist gut interindividuell reproduzierbar und nimmt intraindividuell einen gleichförmigen Verlauf. Durch die zweimalige Gabe von Indomethazin in gleicher Konzentration im Abstand von 24 Stunden wird eine chronische Ileitis induziert, die über mehr als 2 Wochen verläuft. Die Entzündung endet nach 6 Wochen langsam und eine zeitlich lange Reparaturphase schließt sich an. In dieser Arbeit wurde in einer Gruppe von 10 Ratten eine chronische Ileitis induziert und bei 5 Ratten nur eine Behandlung mit 5% NaHCO₃-Lösung als Kontrollgruppe durchgeführt. Die Tiere wurden (wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben) nach 14 Tagen getötet und untersucht. Zur Untersuchung am akuten Ileitismodell wurden 10 Ratten mit einer einmaligen Gabe von Indomethazin behandelt. Dabei wurden jeweils 2 Ratten zu den Zeitpunkten 12h, 24h, 48h, 72h und 7 Tage post injectionem seziiert. Als Kontrolle wurden hierbei 4 Ratten nur mit der Trägerlösung behandelt.

3.2 Anfertigung von histologischen Schnitten des Rattendarmes

3.2.1 Präparation der Peyer'schen Plaques für immunhistochemische Zwecke

Die Tötung der Ratten erfolgte durch zervikale Dislokation nach Narkose mit Ether (Diethylether, Fa. Fluka). Es wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xiphoideus bis ins kleine Becken durchgeführt. Es folgte das Auffinden des Magenausgangs und scharfes Absetzen des Duodenum vom Pylorus. Der Dünndarm wurde nun entlang des Mesenteriums abgesetzt. Zum Schluß scharfe Durchtrennung des terminalen Ileums an der Mündung in das Coecum. Das so gewonnene Präparat wurde sofort in eine Petrischale mit eisgekühltem PBS und Pefabloc (1 mM) gelegt. Dadurch

sollte eine frühzeitige Selbstverdauung des Materials verhindert werden. Die Peyer'schen Plaques des Dünndarmes sind auf der Außenseite des Dünndarmes makroskopisch sichtbar. Diese Bereiche wurden nun präpariert und vorsichtig vom Mesenterialansatz befreit. Das Präparat des Peyer'schen Plaques wurde nun ausgiebig von innen und außen mit PBS/Pefabloc-Lösung gespült.

3.2.2 Anfertigung von Gefriergewebsschnitten zur immunhistochemischen

Aufarbeitung

Das gewonnene Material wurde mit Hilfe der Gefrierschnittmethode histologisch untersucht.

Die Gewebstücke wurden nach Einlage in eine Petrischale mit O.C.T. Tissue Tek in Cryomolds, die ebenfalls mit O.C.T. Tissue Teks gefüllt waren, eingebettet. Zur Aushärtung wurden die Formen in eine stickstoffgekühlte, mit Isopentan gefüllte Wanne gelegt. Die so gewonnenen Proben lassen sich anschließend in Alufolie verpackt für mehrere Wochen bei – 80°C lagern.

Die zurechtgetrimmten Gewebelöcke wurden an einem Kryo-Stat HM 500 OM der Firma Microm, Walldorf, bei -25° Celsius mit einer Dicke von ca. 6 µm geschnitten. Die Schnitte wurden daraufhin auf Superfrost Objektträger aufgetragen. Zur Kontrolle der richtigen Schnittlage wurde bei ungefähr jedem 15. Schnitt eine Übersichtsfärbung mit Methylblau durchgeführt. (siehe Kapitel 3.3.1)

3.2.3 Fixierung der Gewebsschnitte

Die Fixierung der Gewebsschnitte diente der Haltbarmachung.

Nachdem die Gewebsschnitte luftgetrocknet waren, wurde eine Fixation mit Aceton durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte bei – 20° Celsius für 10 Minuten in Aceton gelegt. Nach der vollständigen Verdunstung des Acetons wurden sie in frostfeste Objektträgerkästen eingelegt und bei - 80° Celsius gelagert.

3.3 Cytologische Färbungen

Zur Analyse der Zell- und Gewebetypen und zur Qualitätssicherung der Gefriergewebsschnitte wurden sowohl Übersichtsfärbungen, als auch eine histochemische Färbung zur Darstellung der alkalischen Phosphatase im Bürstensaum des Epithels durchgeführt.

3.3.1 Übersichtsfärbung mit Methylenblau

Unfixierte Kyrostatgewebeschnitte wurden direkt für 15 Sekunden mit Methylenblau-Lösung überschichtet. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Leitungswasser und Abdeckeln des Objektträgers. Jetzt konnten die Schnitte auf ihre Qualität hin unter einem Lichtmikroskop überprüft werden.

Methylenblau-Lösung

Methylenblau	1g
Borsäure	2g
Aqua dest. ad	100 ml

Nach Zubereitung wurde die Lösung mit einem Faltenfilter filtriert.

3.3.2 Übersichtsfärbung mit Hämalaun nach Meyer

Diese Methode wurde zum einen als Übersichtsfärbung angewendet, zum anderen als Gegenfärbung für immunhistochemische Versuche, bei dem ein Nachweis durch die Peroxidase-Technik versucht wurde. Die Präparate wurden zunächst in 1x PBS-Lösung für 2 min bei RT gewaschen. Dann wurde der Objektträger mit einer gebrauchsfertigen Hämalaunlösung überschichtet. Nach 5-10 min. wurde der Objektträger mit Leitungswasser gründlich gespült und eingedeckelt.

Hämalaun nach Meyer Lösung (vor Gebrauch filtrieren)

Hämatoxylin	1 g
Natriumjodat	0,2 g
Kalialaun	50 g
Chloralhydrat	5 g
Citrat	0,1 g
Aqua dest. ad	1000ml

3.3.3 Alkalische Phosphataseaktivität

Die alkalische Phosphatase behält auch nach einer Fixierung mit Aceton ihre Aktivität. Sie läßt sich durch eine spezielle histochemische Methode nachweisen.

Die fixierten Schnitte wurden 5 Minuten in AP-Puffer-Lösung bei RT inkubiert. Die Färbelösung setzte sich aus 4,9 ml AP-Puffer (siehe Kapitel 2.4) und 200 µl einer 1% Naphtholstammlösung (siehe unten) zusammen. Nach guter Durchmischung wurde die Lösung mit 5 mg FAST RED TR versetzt. Die so gewonnene Lösung wurde dann für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung über einen Faltenfilter filtriert und sofort verwendet. Die Färbezeit betrug ca. 2 min unter makroskopischer Kontrolle. Im Anschluß an die Färbung wurden die Gewebsschnitte mit 1x PBS-Lösung 5 min bei RT gewaschen und mit Moviol/DABCO eingedeckelt.

Naphtholstammlösung

Naphthol-ASMX-Phosphat	20 mg
in DMF lösen	2 ml
dunkel lagern	

3.4 Immunhistochemie mit indirekter Signalverstärkung

Zur Darstellung der Lymphozyten in der M-Zell-Tasche wurde die Methode der Immunhistochemie gewählt. Sowohl der Nachweis über FITC Signal als auch der Nachweis durch Peroxidasereaktion wurden erprobt. Die FITC Technik erwies sich für die Auswertung als besser geeignet.

3.4.1 Immunhistochemie mit FITC-Signaltechnik

Die immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte erfolgte in indirekter Technik mit Signalverstärkung.

Bei dieser Technik wird ein gegen das zu untersuchende Antigen gerichteter Antikörper verwendet. Diese Antikörper gehören fast immer der IgG-Klasse an. Nach Inkubation wird dann ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der den Fc-Teil des Primärantikörpers erkennt. Dieser sekundäre Antikörper ist mit Biotin gekoppelt. Nun wird ein Konjugat aus einem Glycoprotein Streptavidin und FITC (Fluoreszinsisothiocyant) verwendet. Dadurch erreicht man eine 2- bis 3- fache Signalverstärkung im Gewebe. Als Kontrolle der Spezifität des Signals wird nur der Sekundärantikörper verwendet.

Die Herstellung immunhistochemischer Präparate erfolgte nach folgendem Protokoll:

Die bei - 80° Celsius gelagerten Schnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur für 1 Stunde aufgetaut. Alle Antikörperverdünnungen wurden mit 0,1% BSA in PBS mit 10% Ziegen Serum angesetzt. Die Inkubationen wurden in einer feuchten, dunklen Kammer durchgeführt. Die Gewebsschnitte wurden mit einem Fettstift markiert (Dako-Pen).

Die aufgetauten Schnitte wurden für 2x 10 min in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für 15 min mit einer 10%igen Ziegen Serumlösung in 0,1% BSA in PBS geblockt. Danach wurde die Blockreagenz abgeschlagen und die Primärantikörperlösung appliziert. Auf die Gefriergewebsschnitte wurden ca. 50 µl Antikörperlösung aufgeschichtet.

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° Celsius, eine Mindestinkubationszeit von wenigstens 2 Stunden wurde stets eingehalten. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem nur der Sekundärantikörper aufgetragen wurde. Als nächster Schritt erfolgte ein Waschvorgang für 3x 5 min in PBS. Nun wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte wieder ein Waschschrift für 3x 5 min in PBS. Dann inkubierte man die Gewebsschnitte mit dem Streptavidin-FITC Konjugat für 30 min. Im Anschluß daran wurde ein 1x 5 min Waschvorgang mit PBS angeschlossen. Zum Schluß wurden die Gewebsschnitte mit Moviol/DABCO eingedeckelt. Zum Abdunkeln beim Waschvorgang wurde ein Styroporkasten verwendet.

In Kapitel 2 findet man eine Zusammenstellung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit ihren jeweils eingesetzten Arbeitskonzentrationen.

3.4.2 Immunhistochemie mit Peroxidasetechnik

Zunächst wurden die acetonfixierten Gefriergewebsschnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift markiert (Dako-Pen). Zu Beginn stand ein 5 Minuten langer Wasch-Schritt mit PBS. Danach wurde die endogene Gewebsoxidase mit 0,03% H₂O₂ Lösung geblockt für 15 min bei RT. Nun erfolgte wieder ein 1x 5 min Waschschrift. Daran schloß sich eine Inkubation mit 10 % Ziegen Serum in 0,1% BSA in PBS zum Blocken an. Nach Abschlagen der Lösung wurde nun die Primärantikörperlösung aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° Celsius, mindestens aber über 2 Stunden. Nach einem 3x 5 min in PBS Waschschrift wurde der Sekundärantikörper aufgeschichtet. Dieser inkubierte für 60 Minuten. Darauf folgte wieder ein Waschschrift von 3x5 min mit PBS. Für 30 min wurde nun ein Streptavidin-HRP Konjugat in der Arbeitskonzentration 1:500 verwendet. Jetzt erfolgte ein Waschschrift für 2x3 min in PBS. Nun wurde eine Fertiglösung Diaminobenzidin aufgetragen und für 15 min entwickelt. Danach wurde mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Als Gegenfärbung diente Meyers Hämalaun (siehe Kapitel 3.3).

3.4.3 Doppelfärbungen mit FITC und Alkalischer Phosphatase

Zur Untersuchung der Assoziation von Lymphozyten und M-Zellen wurde eine Doppelfärbung des Gewebes vorgenommen.

Zuerst wurde (wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben) die gesuchte Lymphozytenpopulation immunhistochemisch dargestellt. Zur Kontrolle wurden einige Gefrierschnitte nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anstatt des nun üblicherweise folgenden Eindeckelns des Präparates wurde dieses direkt im Anschluß an den letzten Waschschrift (wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben) zur Darstellung der alkalischen Phosphatase im Epithelbürstensaum gefärbt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop stellten sich dann die Lymphozyten grün und der Bürstensaum der Enterozyten rot dar. M-Zellen, die sich durch das Fehlen von alkalischer Phosphatase an ihrer luminalen Seite erkennen lassen, erschienen als Lücken im Farbsaum des Follikel-assoziierten Epithel.

3.5 *In Situ* Hybridisierung Teil 1: Herstellung einer RNA Sonde

Die *In Situ* Hybridisierungsmethode dient der Darstellung von Nucleinsäuren in histologischen Schnitten. Zunächst wird eine spezifische RNA Sonde hergestellt.

3.5.1 RNA-Isolierung

Zur Amplifikation von IL-4 wurde die Gesamt-RNA aus Milzzellen mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Nach der Homogenisierung des frisch gewonnenen Gewebes in Guanidin-Isothiocyanat Puffer erfolgte eine Aufreinigung über ein Säulensystem.

Durchführung:

Etwa 100 mg einer frisch gewonnenen Milz wurden in 1 ml RLT-Puffer überführt und unmittelbar mit einem Rotor-Homogenisator für 30 Sekunden zerkleinert und homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat für 3 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zu dem separierten Überstand wurde nun ein gleiches Volumen 70% Ethanol gegeben, dieses Gemisch sukzessiv auf eine RNeasy mini Säule gegeben und die Säule für 15s bei $>8000 \times g$ in einem Sammelbehältnis zentrifugiert. Die Säule wurde nun zunächst mit einem 700 μ l RW1 Puffer gewaschen, anschließend zweimal mit einem 500 μ l RPE Puffer. Zu jedem Waschschrift wurde die Säule erneut 15s bei $>8000 \times g$ zentrifugiert. Zum Abschluß erfolgte eine Zentrifugation für 2 min zur Trocknung der Membran. Die so gereinigte RNA kann mit 50 μ l RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert werden. Zur Bestimmung der Gesamtmenge an RNA wurde die OD_{260/280} gemessen.

Benötigte Materialien:

- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- 14,3 M β -Mercaptoethanol
- 70% Ethanol

3.5.2 cDNA-Synthese

Zur Amplifikation der gesuchten mRNA wird die gewonnene Gesamt-RNA zunächst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, um die spezifische Sequenz im Anschluß durch eine Polymerase-Kettenreaktion zu amplifizieren.

Durchführung:

Die Herstellung der cDNA erfolgte unter Verwendung der SuperScript™ II RNaseH⁻ Reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

5 µg der gewonnenen Gesamt RNA wurden zunächst zusammen mit 1 µl eines dNTP-Gemisches (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500µg/ml) auf 12 µl mit sterilen, DEPC-behandeltem Wasser ergänzt, für 5 min bei 65°C denaturiert und unmittelbar auf Eis gebracht. Nach kurzer Zentrifugation wurden 4 µl Erststrang-Puffer (5x), 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl RNase-Inhibitor zugegeben. Der Inhalt wurde gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl des Enzyms (200 U) erfolgte eine Inkubation für 50 min bei 42°C mit abschließender Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation bei 70°C für 15 min.

Benötigte Materialien:

SuperScript™ II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)

5 x Erststrangpuffer

0,1 M DTT

dNTP Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

RNase-Inhibitor: RNAsin

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die millionenfache Amplifikation einer DNA-Sequenz unter Verwendung sequenz-spezifischer Primer sowie einer Polymerase. Die hitzestabile Taq DNA Polymerase ist aus *Thermus aquaticus* YT1 isoliert und synthetisiert DNA bei erhöhter Temperatur ausgehend von Einzelstrang-Vorlagen. Das so amplifizierte Produkt kann für weitere Untersuchungen wie Restriktionsanalysen, Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet werden.

Durchführung:

Zur Durchführung der PCR wurde die HotStar Taq DNA Polymerase von Qiagen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Gen-spezifischen Primer wurden durch Eurogentec, Köln hergestellt bzw. bezogen. Die verwendeten IL-4 Primer wurden anhand der publizierten mRNA Sequenz für Rattus norvegicus IL-4 (Accession-Number X16058) gewählt und flankieren einen 152 Basenpaare langen Abschnitt der Kodierungssequenz (bp 205-356).

IL-4 sense: 5' -ACA-AGG-AAC-ACC-ACG-GAG-AAC-3'

IL-4 antisense: 5' -TTC-AGA-CCG-CTG-ACA-CCT-CTA-C-3'

Reaktionsansatz:

1 µl cDNA

20 pmol Primer IL-4 sense

20 pmol Primer IL-4 antisense

1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

2 µl 10x HotStar PCR Puffer

0,5 µl HotStar Taq Polymerase

ad 20 µl Aqua dest.

Amplifikationsbedingungen:

Initiale Denaturierung: 95°C - 10 min

Cyklen (35) : 95°C - 1 min

72°C - 1 min

Terminale Extension : 72°C - 10 min

Benötigte Materialien:

PCR Cykler Biometra® TRIO Thermoblock

Hot Star PCR Kit (Qiagen, Hilden)

3.5.4 TA-Klonierung der IL-4 Bande

Zur Klonierung von PCR-Produkten können sog. TA-Vektoren verwendet werden. TA-Vektoren liegen linearisiert vor und besitzen überstehende T-Enden, die im Rahmen der Ligation des PCR-Produktes mit den durch die Taq-Polymerase synthetisierten A-Überhängen des PCR-Produktes eine ‚Sticky-End‘ Klonierung ermöglichen. Die Klonierung in den pGEM-T Vektor erfolgt nach Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim) zur Kontrolle der Sequenz und zur RNA-Sondensynthese ausgehend von den im Vektor befindlichen SP6- und T7 RNA-Polymerase Startstellen.

Durchführung:

Nach Amplifikation der IL-4 cDNA wurde das Produkt gelektrophoretisch kontrolliert und anschließend zur Sequenzierung und RNA-Sondensynthese in den pGEM-T Vektor kloniert. Zu diesem Zweck wurde das pGEM-T Vector System (Promega, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Ligationsansatz:

5 µl Rapid Ligation Buffer
1 µl pGEM-T Vektor
3 µl IL-4 PCR-Produkt
1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss Units/µl)

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente *E.coli* JM109 transformiert.

Transformationsansatz:

50 µl kompetente *E.coli* JM109 (Promega, Mannheim)
5 µl Ligationsansatz

Der Ansatz wurde zunächst für 20 min auf Eis inkubiert, danach für 2 min auf 42°C erwärmt und anschließend erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 950 µl SOC Medium wurde der Ansatz bei 37°C für 90 min bei 150 rpm geschüttelt und 100 µl des Ansatzes auf eine LB/Ampicillin Platte mit IPTG (0,4 mM) und X-Gal ausplattiert.

Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden auf das Vorhandensein weißer Kolonien untersucht (ca. 70 %). 10 weiße Kolonien wurden in 5 ml LB/Amp Medium über Nacht erneut zur Plasmidisolation hochgezogen.

Plasmidisolation:

Die Plasmide der durch die Transformation generierten, potentiell positiven Klone wurden mit Hilfe des Plasmid Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurde zunächst die über Nacht gewachsene Bakteriensuspension (5 ml) durch Zentrifugation (3000 rpm, 4°C, 10 min) pelletiert und in 0,3 ml Puffer P1 (+ RNaseA) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Puffer P2 wurde der Ansatz durch wiederholte Inversion vermischt und für 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 0,3 ml eiskaltem Puffer P3 wurde der Ansatz erneut vermischt und anschließend für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die Qiagen-tip 20 Säule mit 1 ml Puffer QBT äquilibriert. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wurde auf die Säule gegeben, anschließend 4x mit 1 ml Puffer QC gewaschen und mit 0,8 ml Puffer QF von der Säule eluiert. Das Eluat wurde abschließend mit 0,56 ml Isopropanol versetzt, bei 14.000 rpm für 30 min präzipitiert, mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl Aqua dest. resuspendiert. Die erhaltenen Plasmide wurden durch Restriktion mit *NcoI* und *PstI* auf das Vorhandensein des korrekten Inserts überprüft.

Benötigte Materialien:

Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden)

70% Ethanol

Isopropanol pro analysi

Aqua dest.

3.5.5 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle der Orientierung des IL-4 Amplifikationsproduktes im pIL4-Konstrukt erfolgte eine Sequenzierung mit einem ALF Sequencer (Pharmacia). Der Versuch wurde freundlicherweise von Frau Elke Weber (GMI) durchgeführt.

3.5.6 RNA-Sondensynthese

In dem Konstrukt pIL-4 befindet sich das amplifizierte IL-4 Fragment zwischen den beiden Promotoren für die T7- bzw. SP6 RNA-Polymerase. Zur Herstellung der sense- bzw. - antisense RNA-Sonde wird das Konstrukt an einer auf der kontralateralen Seite des Inserts befindlichen Restriktionsschnittstelle geschnitten und anschließend mit der jeweiligen RNA-Polymerase transkribiert.

Durchführung:

Zur RNA-Amplifikation des IL-4 Fragmentes mit der T7-Polymerase wurde das Konstrukt pIL-4 mit *SalI* linearisiert, für die SP6-Polymerase mit *NcoI* (NEB Biolabs, Frankfurt).

Restriktionsansatz:

5 µg	pIL-4 Plasmid-DNA
2 µl	Restriktionspuffer (10x)
1 µl	Restriktionsenzym (<i>SalI</i> / <i>NcoI</i>)
ad 20 µl	dH ₂ O

Zunächst erfolgte die Inkubation des Restriktionsansatzes für 2 h bei 37°C, dann eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 15 min bei 70°C. Zur Aufreinigung des verdauten Konstruktes wurde der Ansatz mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde anschließend mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen, zentrifugiert und der Überstand anschließend präzipitiert. Zu diesem Zweck wurden 20 µl der Plasmid-haltigen Lösung mit 50 µl Ethanol (abs.) und 2 µl 3 M Natrium-Acetat versetzt, der Ansatz für 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min präzipitiert. Nach Waschen mit 200 µl Ethanol

(75%) und erneuter Zentrifugation für 5 min wurde das Pellet luftgetrocknet und in 10 µl dH₂O resuspendiert.

Die korrekte und vollständige Restriktion wurde im Anschluß gelelektrophoretisch verifiziert.

Synthese der RNA-Probe:

Nach erfolgreicher kompletter Restriktion des Konstruktes erfolgte die RNA-Sondensynthese mit der SP6 bzw. T7-Polymerase; die Markierung der Sonde wurde mit Hilfe des „Fluorescein RNA Labeling Mix“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) vorgenommen.

Reaktionsansatz:

- 1 µl linearisiertes pIL-4 (=0.5 µg)
- 2 µl Fluorescein RNA labeling mix (10x)
- 2 µl Transkriptionspuffer (10x)
- 13 µl RNase-freies Aqua bidest.
- 2 µl T7- bzw. SP6 RNA Polymerase

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde das eingesetzte DNA-Template durch die RNase-freie DNase RQ1 (Promega, Mannheim) für 15 min verdaut, die RNA-Sonde mit Phenol/Chloroform extrahiert (s.o.) und anschließend mit 0,5 Volumen Ammonium-Acetat (7.5 M) und 2 Volumen Ethanol (100 %) präzipitiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 14.000 rpm / 4°C und Waschen in 70% Ethanol wurde das luftgetrocknete Pellet in 15 µl TE-Puffer (DEPC-behandelt) resuspendiert.

3.6 *In Situ* Hybridisierung Teil 2: Präparation der Peyer'schen Plaques für *In Situ* Hybridisierungsversuche

Zur Untersuchung eines Gewebestückes mit der *In Situ* Hybridisierungsmethode muß dieses besonders gewonnen und behandelt werden.

Die Präparation des Rattendarmes erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Nachdem der Darmabschnitt mit dem Peyer'schen Plaques präpariert wurde, wurde das Gewebestückchen in eine frische DEPC behandelte 4% Paraformalin-Lösung

eingbracht. Diese Stückchen werden bei 4° Celsius für maximal 2 Stunden inkubiert. Danach werden die Gewebeproben über Nacht mit einer 30%igen Sucroselösung (DEPC behandelt) bei 4° Celsius inkubiert. Bei erfolgreicher Inkubation sinken die Gewebestücke zum Boden der Lösung. Ab jetzt konnten die Gewebestücke wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben bei -80 ° Celsius tiefgefroren und zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

3.6.1 Anfertigung von Gefriergewebsschnitten zur *In Situ* Hybridisierung

Zur Verwendung kamen nur Glaswaren, die über Nacht bei 250° Celsius gebacken wurden und in Alufolie verpackt waren. Während des gesamten Vorgangs wurden handelsübliche unsterile Einmalhandschuhe verwendet. Die zurecht getrimmten Geweblöcke wurden bei -25° Celsius an einem Kyoostat HM 500 OM der Firma Microm, Walldorf, in 10 µm dicke Gefrierschnitte geschnitten. Sie wurden dann auf Superfrost plus Objektträger aufgebracht. Um die Gewebeschnitte wurde nun eine Hybridisierungskammer angebracht („Hybridisation chamber“ 50µl, Firma Calbiochem, BRD). Nach der Trocknung bei RT wurden die Gewebeproben sofort prehybridisiert.

3.6.2 Prehybridisierung (nach KOMMINOTH 1996)

Die Prehybridisierung hat die Aufgabe, das Material so zu verändern, daß eine RNA Sonde das Gewebe und die gesuchte RNA für die Sonde zugänglich wird.

Bei der Prehybridisierung werden nur in Alufolie verpackte Glaswaren benutzt, die über Nacht bei 250° Celsius gebacken wurden. Bei jedem Arbeitsschritt werden handelsübliche unsterile Einmaltexhandschuhe verwendet. Alle Lösungen werden wie in Kapitel 2 beschrieben mit DEPC behandelt und autoklaviert.

Zunächst wurden die Gefrierschnitte für 1x 10 min in DEPC behandeltem PBS bei RT inkubiert. Daran schloß sich eine Waschung für 2x 5 min in 100mM Glycin in DEPC-PBS an. Nun wurden die Schnitte 1x 15 min in Triton X-100 0,3% in DEPC-PBS-Lösung gelegt. Daran schloß sich ein Waschvorgang mit DEPC-PBS für 2x 5 min an. Als nächster Schritt wurde eine Gewebeerweichung zur besseren Penetration der RNA-Sonde durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeproben für 30 min bei 37° Celsius mit

einer Lösung aus 200 ml TE-Puffer (DEPC-behandelt) und 200 µl RNA-freier Proteinase K-Lösung (siehe Kapitel 2.4.8) inkubiert (Endkonzentration 4µg/ml Proteinase K). Daran schloß sich eine Post-Fixation mit 4% frisch angesetztem Paraformaldehyd in DEPC-PBS für 5 min bei 4° Celsius an. Nun erfolgte ein Acetylierungsschritt für 1x 10 min bei RT. Die Schnitte wurden mit TEA-Puffer und 0,25% Essigsäureanhydrid behandelt, das erst in diesem Moment zur Lösung hinzugegeben wurde. Während des Vorgangs steht der Versuchsansatz auf einem Rüttler. Als letzter Schritt wurden die Gewebeschnitte für 10 min bei 37 ° Celsius mit einer Hybridisierungslösung (Sigma) inkubiert und mit Parafilm abgedeckt.

3.6.3 *In Situ* Hybridisierung

Zur Verwendung kam eine feuchte Kammer, die im Untergrund mit handelsüblichen Blottingpaper ausgelegt und mit DEPC-PBS getränkt war. Erst ab diesem Schritt wurden die Objektträger mit einem Bleistift auf dem dafür vorgesehenen Feld beschrieben. Als Sonde wurde das Syntheseprodukt (aus Kapitel 3.5.6) benutzt. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Sense-Stränge verwendet. Von der Lösung mit der Sonde wurden 3 µl auf 297 µl Hybridisierungslösung (Sigma) gegeben. Jeweils 50 µl dieser Lösung wurden in die Hybridisierungskammern nach der Prehybridisierung gegeben. Danach wurden die Kammern mit Parafilm abgedeckt. Der ganze Versuchsansatz wurde dann bei 42° Celsius über Nacht in einem Inkubator gelagert.

3.6.4 Post-Hybridisierung

Die Posthybridisierung dient der Vermeidung von unspezifischen Signalen nach *In Situ* Hybridisierung.

Nach erfolgter *In Situ* Hybridisierung wurden die Gewebeproben für 10 min in 2x SSC Lösung bei RT gebadet. Um ein Ausbleichen zu verhindern wurde während dieser Schritte das Glasbecken mit Alufolie abgedeckt. Es lösten sich die Parafilmabdeckungen von den In-Situ-Hybridisierungskammern ab. Sie konnten nun mit einer Pinzette geborgen werden. Daran schloß sich ein weiterer Waschgang für 2x 15 min in 2x SSC Lösung an bei 37°C. Danach erfolgte für 2x 15 min eine weitere Waschung mit 1x SSC Lösung auf einem Rüttler bei 37°C. Nach jedem Waschgang wurden die Positiv- und Negativkontrollen mit einem Fluoreszenzmikroskop

kontrolliert. Sollte sich die Negativkontrolle nicht entfärbt haben folgte nun mit separater Glasware eine Behandlung mit RNase A. Dabei wurden 75 µl RNase A (Konzentration 20 µg/ml) auf 75 ml NTE-Pufferlösung gegeben und bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger auf einem Rüttler für 30 min bei RT mit 1x SSC-Lösung gewaschen. Nun konnten die In-Situ-Hybridisierungskammern mit einer Pinzette abgelöst und der Objektträger mit dem Moviol-Eindeckmedium eingedeckelt werden.

3.7 Methode zur Ermittlung des prozentualen Anteils von M-Zellen im FAE: Immunhistochemie mit dem Ratten-M-Zell spezifischen Anticytokeratin 8 Antikörper (Klon 4.1.18)

Um den Anteil von M-Zellen im FAE zu ermitteln wurden die M-Zellen wie in Kapitel 3.4 mit einem spezifischen Antikörper (Anti-Cytokeratin 8 Klon 4.1.18) mit indirekter immunhistochemischer Technik (Nachweis über FITC) gefärbt. Die Objektträger wurden nun wie in Kapitel 3.8 beschrieben mit einem computerunterstützten konfokalen Lasermikroskop untersucht. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte eine Durchschnittslänge für M Zellen von linkslateral nach rechtslateral von 7 µm ermittelt werden. Durch die Kenntnis der Gesamtlänge eines FAE wurde der prozentuale Anteil von M-Zellen mit Hilfe der Formel $\frac{(m * 7) * 100}{g} = x$ errechnet.

Dabei steht (m) für die Anzahl der M-Zellen, (g) für die Gesamtlänge des FAE in µm und (x) für den prozentualen Anteil der M-Zellen am FAE. Die Ergebnisse wurden für die Zeitpunkte 12h, 24h, 48h und 7d durch Mittelwert und Standardabweichung beschrieben und der Prüfung auf Signifikanz wie in Kapitel 3.9 beschrieben zugeführt.

3.8 Auswertung mit einem computergestützten konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop

Es wurde ein Nikon Diaphot 200 System verwendet, das mit einer hochauflösenden Hamamatsu C 4742-56 Kamera ausgerüstet war. Die Aufnahmen wurden in 400facher Vergrößerung gemacht. Dabei wurde das macintosh/apple Openlab Version 2.0 Programm verwendet. Als Eichung wurden Aufnahmen von einem Mikrom 5/17 Objektträger der Firma Zeiss (Jena, BRD) gemacht. Um die Länge eines FAE des

Peyer'schen Plaques zu messen wurde das NIH Image Programm in der Version 1.62 für macintosh/apple verwendet. Dadurch war es durch die Eichaufnahme möglich, daß Verhältnis von Anzahl der Pixel zu 0,1 mm zu ermitteln. Dabei wurde ein Mittelwert von ca. 151 Pixel pro 0,1 mm errechnet. Mit einer segmentierten Linie wurde dann möglichst genau dem Verlauf des Epithels folgend vermessen. Der Mittelwert aus 3 Messungen wurde statistisch verwendet. Die mit FITC markierten M-Zellen wurden gezählt und wie in Kapitel 3.7 beschrieben mit der Länge des FAE verrechnet zu Prozent-Werten.

3.9 Ermittlung der statistischen Signifikanz der Unterschiede in der Kinetik der M-Zellen mit Hilfe des zweiseitigen t-Testes

Der t-Test ist ein parametrischer Test, mit dem Hypothesen über den Erwartungswert einer Normalverteilung geprüft werden. Dabei werden eine Nullhypothese und eine Alternativhypothese formuliert.

Die Nullhypothese war in dieser Arbeit, daß der Erwartungswert der Ileitisgruppe gleich dem Erwartungswert der Kontrollgruppe ist. Als alternative Hypothese galt die Aussage, daß die beiden Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha < 0,05$ nicht übereinstimmen. Zur Berechnung der Prüfgröße wurde folgende Formel genutzt:

$$t = \frac{|\bar{X}_{Ileitis} - \bar{X}_{Kontrolle}|}{s} * \sqrt{n} .$$

Dabei steht (t) für die Prüfgröße, (\bar{X} -Ileitis) für den

Mittelwert bei der Ileitisgruppe zum Untersuchungszeitpunkt, (\bar{X} -Kontrolle) für den Mittelwert der Kontrollgruppe zum Untersuchungszeitpunkt, (s) für die Standardabweichung der Ileitisgruppe und (n) für die Anzahl der Versuche/Beobachtung des Ereignisses. Die Prüfgröße wurde mit dem Quantil der t-Verteilung mit (f) Freiheitsgraden (Freiheitsgrad $f=n-1$) verglichen. Ist die Prüfgröße größer als das Quantil, so lautete die Testentscheidung Nullhypothese verwerfen. Ist die Prüfgröße kleiner als das Quantil, so lautete die Entscheidung Nullhypothese beibehalten. Die notwendigen Daten für diesen Test wurden wie in Kapitel 3.7 beschrieben generiert.

3.10 Methode zur statistischen Charakterisierung der Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen

Aus Gründen der statistischen Berechnung wurden Kontakte von zwei oder mehr Lymphozyten an M Zellen als ein Kontakt gewertet, wurden also nur als ein Positivergebnis in die Wertung aufgenommen worden. In einer Vier-Feldertafel wurden nun M-Zellen, die keinen Kontakt in ihrer Tasche zu markierten Lymphozyten hatten, als Testnegativ eingestuft. M-Zellen, die Kontakt zu Lymphozyten hatten, wurden als Testpositiv aufgenommen. Es folgte nun in der Vier-Felder-Darstellung der Vergleich von Proben der Kontroll-Tiergruppe mit Proben von der Gruppe der akuten oder chronischen Ileitis-Modell-Ratte.

Im ersten Feld oben links steht die Summe der M-Zellen (n_{11}), in deren Tasche ein bestimmter Lymphozyt zu finden war, und zwar beim nicht entzündeten Darm. Das zweite Feld oben rechts zeigt den gleichen Sachverhalt beim chronisch entzündeten Darm (n_{12}). Im Feld unten links wurden die M-Zellen ermittelt, die nicht mit Lymphozyten assoziiert waren beim nicht entzündeten Darm (n_{21}). Rechts unten sieht man die Anzahl der M-Zellen, die im entzündeten Darm nicht mit den zu untersuchenden Lymphozyten assoziiert waren (n_{22}). Die erste Spaltensumme ergibt die Anzahl ($n_{.1}$) der in der Kontrolle insgesamt untersuchten M-Zellen, die zweite Spaltensumme ergibt die Anzahl ($n_{.2}$) der gesamt untersuchten M-Zellen beim chronisch entzündeten Darm. Die erste Zeilensumme zeigt alle positiven Assoziationen an ($n_{1.}$), die zweite Zeilensumme die Zahl aller M-Zellen ohne die zu untersuchende Lymphozytenpopulation in der M-Zell-Tasche ($n_{2.}$). Der gesamte Untersuchungsumfang, also die Zahl der untersuchten M-Zellen wird in der 3. Zeilen- und Spaltensumme ermittelt (N).

Fragestellung	Spalte 1	Spalte 2	Zeilensumme
Zeile 1	n_{11}	n_{12}	$n_{1.}$
Zeile 2	n_{21}	n_{22}	$n_{2.}$
Spaltensumme	$n_{.1}$	$n_{.2}$	N

Abbildung 2: Beispiel einer Vier-Felder-Tafel

Die so aufgetragenen Untersuchungsergebnisse können nun einem χ^2 Test auf Unabhängigkeit unterzogen werden. Die Prüfgröße des χ^2 Testes ergibt sich aus

folgender Gleichung
$$\chi^2 = \frac{(n_{11} * n_{22} - n_{12} * n_{21})^2 * n}{n_{1.} * n_{2.} * n_{.1} * n_{.2}}$$

Dazu werden eine Nullhypothese, die besagt, daß es keinen Unterschied zwischen Kontrolle und Test gibt, formuliert und eine Alternativhypothese, die besagt, daß es einen Unterschied zwischen Kontrolle und Test gibt.

Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde der χ^2 -Testwert mit den Quantilen einer χ^2 -Funktion verglichen. Ein Java-Applet, das vom Institut für Biomathematik und medizinische Informatik der Universität Münster im Internet angeboten wird, wurde für die Berechnungen verwendet (<http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/bio/inhalt0.html>, HEINECKE et al. 1998). Das Ergebnis wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit (p) angegeben. War die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% (p<0,05), war statistische Signifikanz gegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Kinetik der M-Zell Induktion im akuten Ileitismodell der Ratte

Frühere Arbeiten zur Rolle der M-Zelle in der chronischen Darmentzündung konnten zeigen, daß M-Zellen 14 Tage nach Induktion einer Ileitis vermehrt im FAE des Peyer'schen Plaques angetroffen werden (KUCHARZIK et al. 2000). Aufgrund der bisher nicht abschließend geklärten Ontogenese der M-Zelle erscheint es interessant, ob sich das Phänomen aus einer Konversion intestinaler Epithelzellen zeitlich schnell entwickelt oder ob eine protahierte Entwicklungsphase auf eine de novo Zellsynthese hindeutet.

Zur detaillierten Untersuchung des Phänomens wurde durch die einmalige Gabe von Indomethazin eine akute Ileitis in Ratten ausgelöst. Diese Entzündung betrifft den gesamten Dünndarm des Tieres mit besonderer Betonung des terminalen Jejunums und proximalen Ileums. Die Entzündung ist charakterisiert durch lineare Ulcerationen, die die gesamte Darmwand betreffen. Hinzu kommen Adhäsionen, partielle Verschlüsse und transmurale granulomatöse Entzündungsherde. Dadurch enthält dieses Tiermodell klinische, histologische und pathologische Aspekte einer Crohn'schen Ileitis. Die Entzündung erreicht ihr Maximum nach einem Tag und heilt im Gegensatz zur chronischen Ileitis nach 7 Tagen mit einer Restitutio ad integrum.

Zur Quantifizierung von M-Zellen im FAE wurde ein Antikörper gegen Cytokeratin-8 verwendet, der in der Ratte spezifisch die M-Zellen färbt, während die übrigen Epithelzellen sich negativ darstellen.

Der Anteil von M-Zellen im nicht entzündeten Peyer'schen Plaque von Kontrolltieren (Injektion des Lösungspuffers) wurde entsprechend Literaturangaben mit einem Anteil von ca. 4% bestimmt. Als weitere Messpunkte wurden entsprechende Bestimmungen 12h, 24h, 48h, 72h und 7 Tage nach einmaliger Gabe von Indomethazin vorgenommen (siehe Abbildung 3).

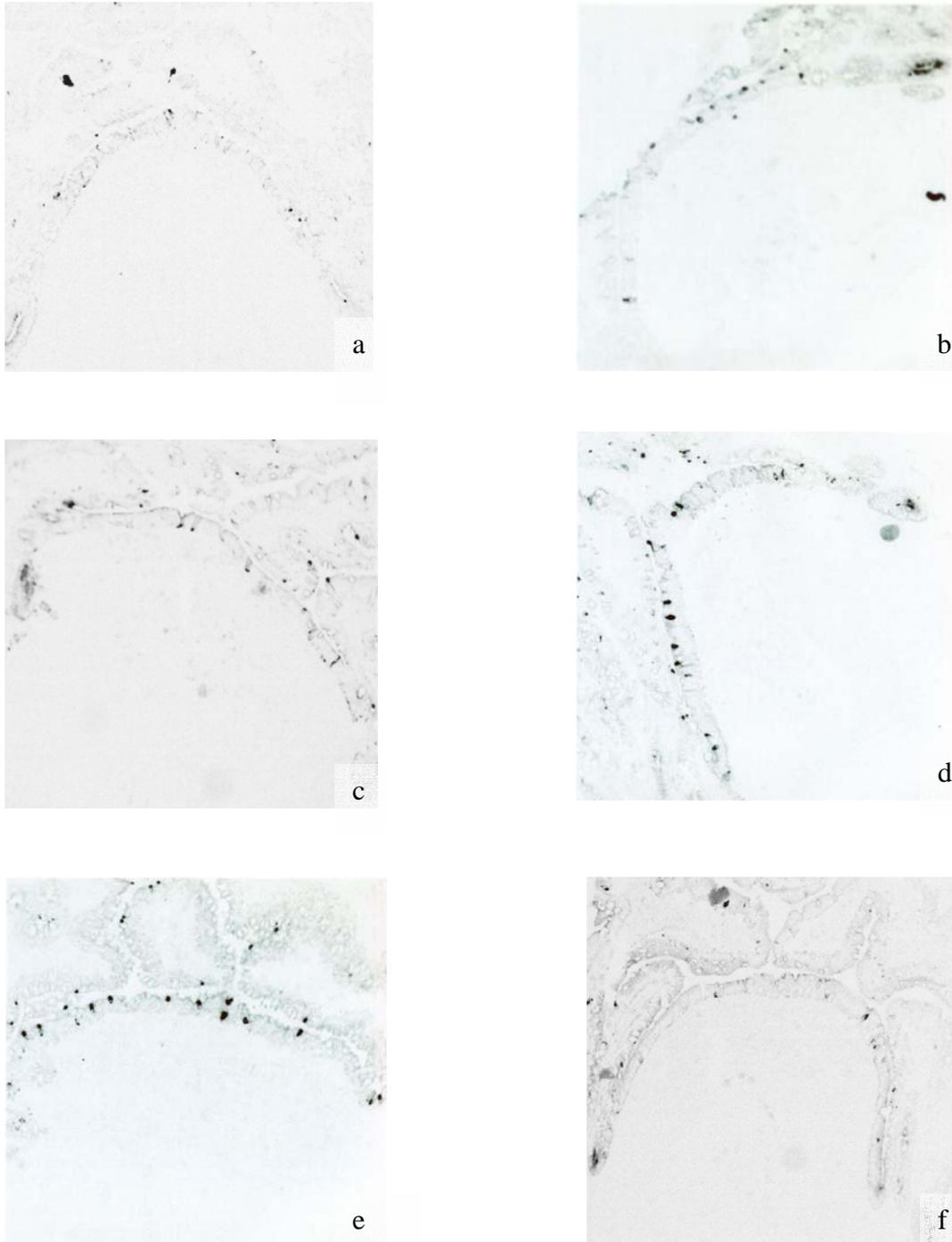


Abbildung 3: Immunhistochemie mit Anti-Cytokeratin-8, Negativbilder. Repräsentative M-Zell Färbungen im FAE zu definierten Zeitpunkten. a) Kontrolle b) 12h c) 24h d) 48h e) 72h f) 7 Tage nach Induktion einer akuten Ileitis.

Bereits nach 12 Stunden zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Anzahl von M-Zellen im FAE im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf schwankte der relative Anteil der M-Zellen im FAE, jedoch erreichte er nie das Niveau der Kontrolle. Das Maximum der M-Zell Induktion ist nach 72 Stunden erreicht. Nach sieben Tagen fand sich kein statistisch relevanter Unterschied in der prozentualen Anzahl der M-Zellen im FAE im Vergleich zur Kontrolle.

Die durchschnittliche Länge eines Follikel-assoziierten Epithels wurde mit ca. 0,7 mm ermittelt. Wie ersichtlich zeigen sich zum Zeitpunkt 12 h post injektionem etwa 10% der Epithelzellen im FAE als Cytokeratin-8 positiv (Maximum 19,25%), während sich 24 h und 48 h post injektionem mit durchschnittlich 5,5% bzw. 7,5% niedrigere Werte nachweisen lassen. Nach 72h Stunden wurden die durchschnittlich meisten M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel gefunden. Sie machen zu diesem Zeitpunkt 10,3% aller Zellen im FAE aus (Maximum 17,6%). Nach einer Woche sind nur noch ca. 5% aller Zellen im FAE M-Zellen, die Kontrollen gesunder Tiere ergeben einen Durchschnittsanteil von 3,9% aller Zellen (Maximum der Kontrollen 6,3%).

Insgesamt zeigt die Untersuchung ein rasches Auftreten von M-Zellen in der akuten Ileitis innerhalb von 12h nach Induktion. Einhergehend mit der Restitutio ad integrum ist 7d nach Induktion der Ileitis der relative Anteil normalisiert. (siehe Abbildung 4).

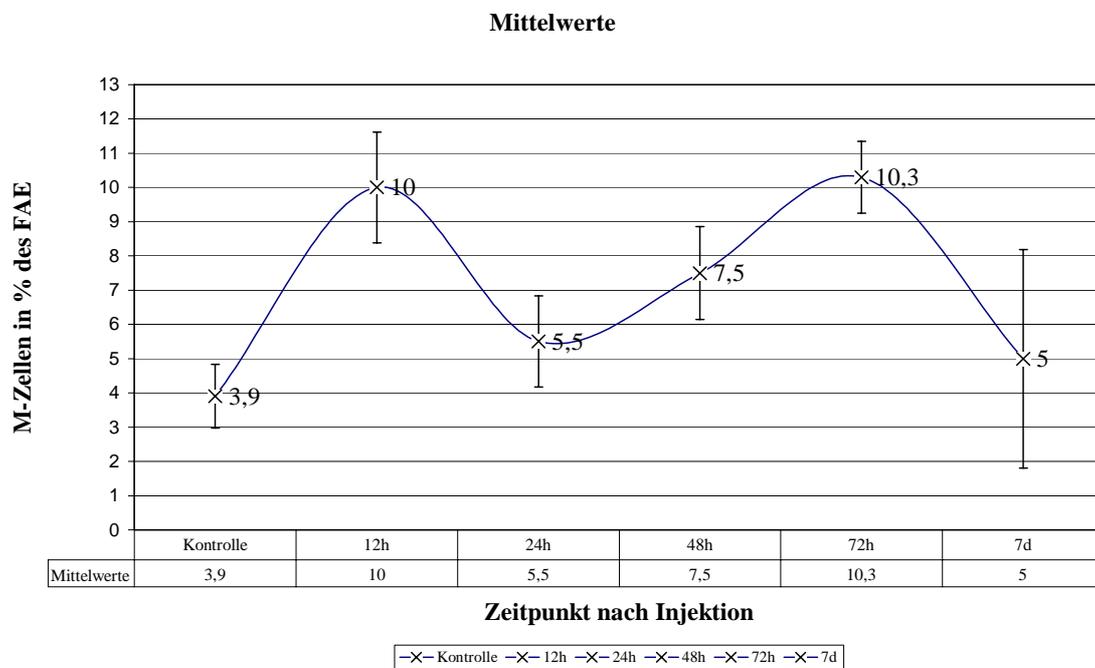


Abbildung 4: Kinetik der M-Zell Formation. Man erkennt den prozentualen Anteil von M-Zellen im FAE im Rahmen einer akuten Entzündung über dem Kontrollwert für die Zeitpunkte 12h, 24h, 48h, 72h.

4.2 Statistische Auswertung der Daten zur Kinetik der M-Zell Formation

Zeitpunkt	Mittelwert M-Zellen in %	Standardab- weichung in %	Grenze des KI Oben	Grenze des KI Unten	Wert des t- Testes	p
Kontrolle	3,9	2,1	2,9	4,8		
12 Stunden	10	4,3	8,3	4,6	7,3644	p<0,05
24 Stunden	5,5	3,1	4,1	6,8	2,3820	p<0,05
48 Stunden	7,5	4,4	6,1	8,8	5,2048	p<0,05
72 Stunden	10,3	3,3	9,2	4,3	11,8020	p<0,05
7 Tage	5	4,6	1,8	8,2	0,7852	*n.s.

Tabelle 4: Überblick über die statistischen Daten zur Kinetik der M-Zell Formation im FAE im Rahmen einer akuten Darmentzündung. Alle Daten wurden bis auf die 1. Dezimalstelle gerundet, t-Test Werte auf die 4. Nullstelle hin gerundet (KI= Konfidenzintervall, *n.s.= nicht signifikant)

Die Tabelle 4 umfasst eine Übersicht über die ermittelten prozentualen Mittelwerte, ihre Standardabweichung, die obere und untere Grenze des Konfidenzintervalls zu diesem Zeitpunkt und den Testwert des zweiseitigen t-Tests, der mit den Quantilen der t-Funktion mit $f = n-1$ Freiheitsgraden abgeglichen wurde (nach HEINEKE et al. 1998). Aufgrund dieses Wertes wird eine Testentscheidung gefällt, ob der prozentuale Mittelwert sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant vom Mittelwert der Kontrolle unterscheidet. Dazu wird die Nullhypothese H_0 aufgestellt, die besagt, daß die Werte der Versuche mit den Werten der Kontrolle übereinstimmen. Andernfalls gilt die Alternativhypothese H_1 , die die Verschiedenheit der Werte beschreibt. Liegt der Testwert über dem Quantil der t-Funktion, so muß die Nullhypothese verworfen werden, d.h. der ermittelte Wert unterscheidet sich statistisch signifikant vom Kontrollwert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß sich M-Zellen zu den Zeitpunkten 12h, 24h, 48h und 72h statistisch signifikant vermehrt beobachten lassen. Nach einer Woche finden sich dagegen keine statistisch signifikanten erhöhten Werte mehr.

4.3 Beobachtungen zur Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen am chronischen Indomethazin-induzierten Ileitismodell der Ratte

Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, daß die Induktion einer Ileitis durch Indomethazin und die damit verbundene Expansion von M-Zellen im FAE mit einem vermehrten Auftreten von mononukleären Zellen in der M-Zell-Tasche assoziiert ist (siehe Abbildung 5) und die hier lokalisierten Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine vermehrte lysosomale Aktivität aufweisen. Um diese Unterschiede zu beschreiben, wurden die M-Zell assoziierten mononukleären Zellen von gesunden und kranken Tieren mit Hilfe immunhistochemischer Doppelfärbung charakterisiert. Dabei wurden zunächst entzündete Peyer'sche Plaques aus Tieren untersucht, bei denen durch zweimalige Injektion von Indomethazin eine chronische Ileitis induziert worden war, anschließend auch Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger Injektion.

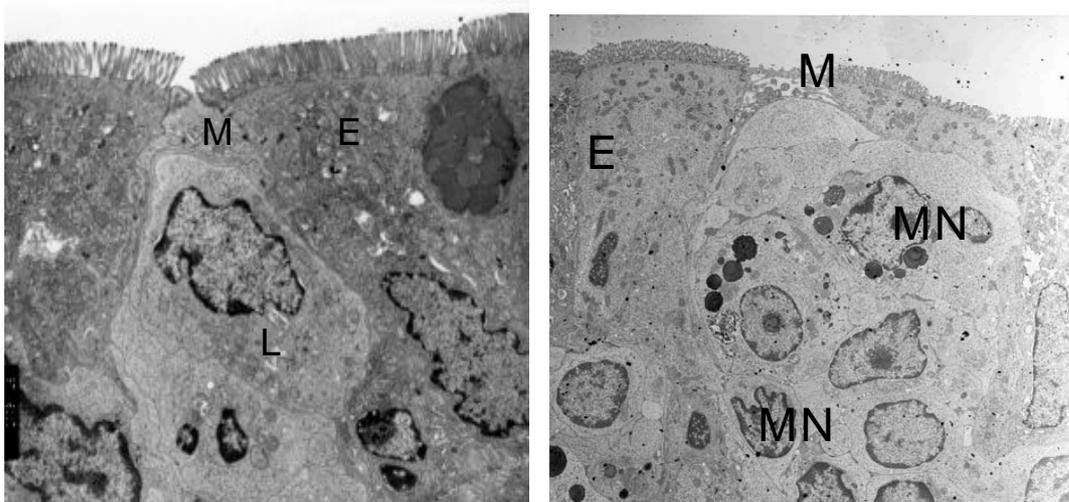


Abbildung 5 (links) und Abbildung 6 (rechts): Elektronenmikroskopische Aufnahmen von M-Zellen.

Links sieht man im nicht entzündeten Gewebe eine M-Zelle (M) mit einem assoziierten Lymphozyten in der M-Zell-Tasche (L). Daneben kommt ein Enterozyt zur Abbildung (E). Rechts sieht man eine M-Zelle (M) unter entzündlichen Bedingungen. Die M-Zell-Tasche ist mit reichlich mononukleären Zellen (MN) gefüllt.

Zur Untersuchung der Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen wurden die Marker CD4, CD8, CD11b, CD25, T-Zell-Rezeptor $\alpha\beta$ und ein Marker für B-Zellen verwendet, die Identifizierung der M-Zellen erfolgte durch den Nachweis einer fehlenden Alkalischen Phosphatase-Aktivität.

Der verwendete B-Zellen Marker erkennt ein 160/180kDa Oberflächenantigen, das nur von Ratten B-Zellen exprimiert wird. Über das Verhalten dieses Markers bei unterschiedlichen Subpopulationen ist abgesehen von der fehlenden Reaktivität gegenüber Plasmazellen keine Information verfügbar. Aus älteren Untersuchungen ist bekannt, daß B-Zellen hauptsächlich im Keimzentrum der Peyer'schen Plaques zu finden sind.

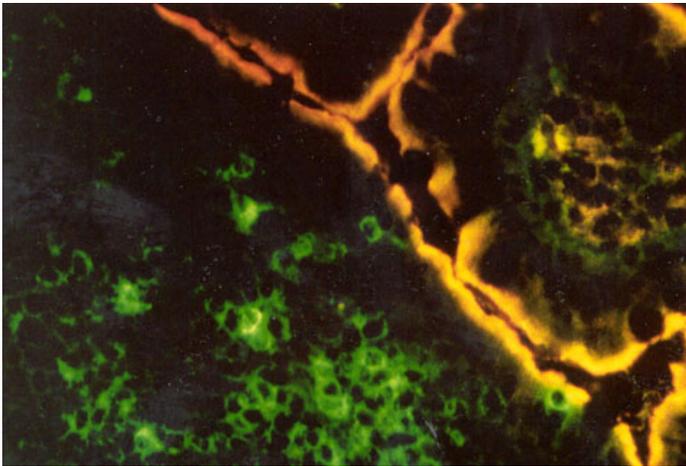


Abbildung 7: Mit FITC immunhistochemisch markierte B-Zellen unter dem mit Texas Red markierten AP des FAE. Man erkennt B-Zellen unterhalb von M-Zellen, denen AP im Bürstensaum fehlt.

Insgesamt wurden 118 M-Zellen auf das Vorhandensein von B-Zellen hin untersucht. Beim Kontrolltier konnte durch den verwendeten Marker in dieser Untersuchung keine Assoziation mit M-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen ließen sich im chronischen Indomethazin-induzierten Ileitismodell insgesamt 15 B-Zell assoziierte M-Zellen nachweisen (23%).

Der Oberflächenmarker CD4 wurde zur Darstellung von T-Helferzellen und T-Helfergedächtniszellen gewählt. Sie sind wichtige Bestandteile der M-Zell-Tasche. Insgesamt 127 M-Zellen wurden auf die Assoziation mit CD4 positiven Zellen hin untersucht.

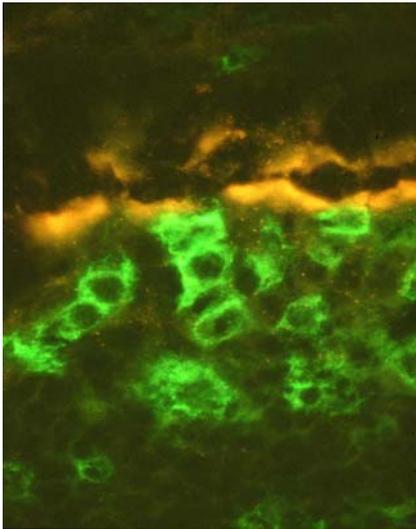


Abbildung 8: Mit FITC markierte CD4 positive Lymphozyten unter dem mit Texas Red markierten AP des FAE. Man sieht mehrere CD4 positive Zellen in der M-Zell-Tasche bei chronischer Ileitis.

Dabei waren 17 CD4 positive Zellen in der Kontrolle und 43 beim Tier mit der chronischen Ileitis mit M-Zellen assoziiert. Das sind 69,4% aller M-Zellen bei chronischer Entzündung gegenüber 26,2% bei der Kontrolle. Auffallend ist daneben, daß sich in entzündeten Material teilweise multiple CD4 positive Lymphozyten in der M-Zell-Tasche nachweisen lassen.

T-Zellen, die den T-Zell-Rezeptor (TCR) $\alpha\beta$ tragen, sind typisch für Peyer'sche Plaques, während $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor positive Lymphozyten physiologischerweise hier nicht anzutreffen sind. 83 M-Zellen wurden auf Assoziation mit TCR $\alpha\beta$ positiven Zellen untersucht. TCR $\alpha\beta$ positive Zellen wurden bei Kontrollen nur einmal an eine M-Zelle assoziiert gesehen (2,3%), während in der chronischen Ileitis 11 M-Zellen eine Assoziation mit TCR $\alpha\beta$ positiven Lymphozyten zeigten (28,2%).

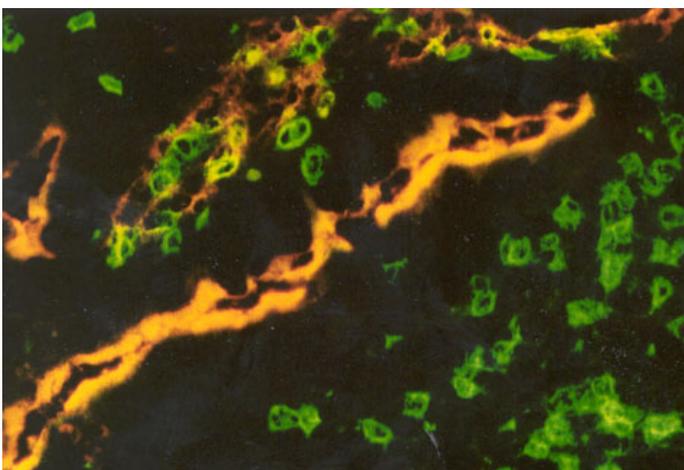


Abbildung 9: Mit FITC markierte TCR $\alpha\beta$ positive T-Lymphozyten unter dem mit Texas Red AP markierten FAE. TCR $\alpha\beta$ positive Zellen sind während der chronischen Ileitis signifikant häufiger mit M-Zellen assoziiert.

CD25 ist ein Oberflächenantigen, das dem Interleukin 2 Rezeptor zuzuordnen ist. Es wird auf T-Zellen exprimiert und ist ein Marker für die Aktivierung dieser Zellen. Eine weitere Zellpopulation exprimiert neben dem CD4 Oberflächenantigen gleichzeitig CD25. Diese sog. regulatorischen T-Zellen sind möglicherweise an der kontaktabhängigen Suppression einer T-Zell Proliferation beteiligt. 90 M-Zellen wurden auf Assoziationen mit CD25 positiven Zellen hin untersucht. Bei Kontrollen fanden sich keine Assoziationen (0%). Eine Assoziation mit einer CD25 positiven Zelle wurde bei chronischer Ileitis demonstriert (2%).

CD8 positive Zellen sind T-Zellen, die zytotoxisch wirken können. Diese auch als Effektor T-Zellen bezeichneten Zellen können andere Zellen über verschiedene Mechanismen beseitigen. T-Zellen dieser Art sind um das Keimzentrum eines Peyer'schen Plaques angeordnet und finden sich auch bevorzugt in der interfollikulären Zone.

128 M-Zellen wurden zur Klärung der Frage der Assoziation von CD8 positiven Zellen untersucht. 16 Assoziationen wurden beim Kontrollgewebe gefunden. Insgesamt 21 Assoziationen dieser Zellen konnten bei chronisch entzündetem Gewebe gezählt werden. Somit sind bei chronischer Entzündung 32 % aller M-Zellen mit CD8 positiven Zellen assoziiert, während der Wert bei gesundem Gewebe 25,4% beträgt.

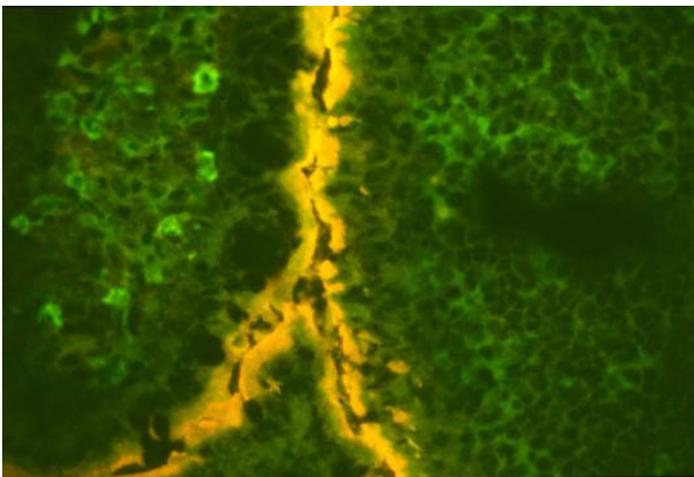


Abbildung 10: AP Färbung mit Texas Red und FITC Färbung von CD11b positiven Zellen.
CD11b positive Zellen sind sehr selten an M-Zellen assoziiert, man findet sie eher im Dom Teil des Plaques.

Zellen, die den Oberflächenmarker CD11b exprimieren, sind myeloiden dendritischen Zellen zuzuordnen. Sie befinden sich hauptsächlich in der subepithelialen Domregion eines Peyer'schen Plaques.

Es wurden 143 M-Zellen untersucht. Im nicht entzündeten Gewebe fand sich in 9 Fällen eine Assoziation von AP-negativen FAE-Enterozyten mit CD11b positiven mononukleären Zellen, 7 Assoziationen wurden im chronischen Ileitismodell gezeigt. Die relativen Anteile betragen somit 9,6% aller M-Zellen bei chronischer Entzündung bzw. 12,9% aller M-Zellen bei gesunden Kontrollen.

4.4 Beobachtungen zur Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen am akuten Ileitismodell

Es wurden die Marker für B-Zellen, T-Zell-Rezeptor $\alpha\beta$ und CD4 positive Zellen untersucht, da für diese signifikante Ergebnisse bei den Untersuchungen am Modell der chronischen Indomethazin-induzierten Ileitis erzielt wurden. Dabei wurden Proben zu den Zeitpunkten 24h und 72h nach Induktion einer akuten Indomethazin-induzierten Ileitis verwendet.

85 M-Zellen wurden zum Zeitpunkt 24h auf Assoziation von M-Zellen mit B-Zellen hin untersucht. Bei Kontrollen ergab sich keine einzige gemeinsame Sichtung. Eine Assoziation wurde in 7 Fällen von akuter Ileitis gefunden. Somit sind 15,9% aller M-Zellen mit B-Zellen bei akuter Entzündung assoziiert, während es keine Verbindungen bei Kontrollen gibt. Nach 72h wurden 113 M-Zellen auf eine Assoziation mit B-Zellen hin untersucht. 7 Assoziationen konnten im akuten Entzündungsmodell nachgewiesen werden (11,7%), wiederum keine bei Kontrolltieren.

Für die Frage nach der Assoziation von TCR $\alpha\beta$ positiven Zellen wurden 97 M-Zellen immunhistochemisch untersucht. Bei Kontrollen konnte nur eine Assoziation festgestellt werden. TCR $\alpha\beta$ positive Zellen waren nach 24 Stunden in 12 Fällen an M-Zellen assoziiert. Dies sind 22,6% aller M-Zellen im Gegensatz zu 2,3% bei Kontrollen. Zum Zeitpunkt 72h wurden 90 M-Zellen untersucht. Bei Kontrollen wurde nur eine TCR $\alpha\beta$ positive Zelle in Assoziation mit einer M-Zelle gesehen. Dies entspricht 2,3% der M-Zellen. Nach 72 Stunden wurden 11 TCR $\alpha\beta$ positive Zellen in der Umgebung von M-Zellen nachgewiesen, also 23,9% der M-Zellen. Beide Zeitpunkte zeigen somit vergleichbare prozentuale Anteile.

Eine Untersuchung von 108 M-Zellen nach einem Tag und 135 M-Zellen nach drei Tagen sollte Aufschluß über die Assoziation von CD4 positiven Zellen in der M-Zell-Tasche geben. In den Kontrollen zeigte sich ein relativer Anteil von CD4-assoziierten

M-Zellen von 26,2%. Interessanterweise fanden sich dagegen 24h nach Induktion einer akuten Ileitis 46,5% der M-Zellen mit CD4 positiven Zellen assoziiert, während sich nach weiteren 48h nur noch ein Wert von 27,1% ergab.

4.5 Statistische Auswertung der Daten zur Assoziation von Zellen des Immunsystems an M-Zellen bei akuter und chronischer Indomethazin-induzierter Ileitis der Ratte

Zur statistischen Evaluierung der Daten wurde der χ^2 -Test verwendet. Dabei werden die Daten der Vier-Felder-Tafel mit einer χ^2 -Funktion verglichen. Aus der Vier-Felder-Tafel wird eine Prüfgröße berechnet, die mit den Quantilen der $\chi^2_{f;1-\alpha}$ Funktion mit f Freiheitsgraden verglichen wird. Liegt der Testwert über dem Quantil, so kann bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=5\%$ ein Unterschied zwischen Kontrolle und Experiment angenommen werden.

Die Ergebnisse sind in Abb. 11 und 12 in Form der errechneten Irrtumswahrscheinlichkeit, dem p-Wert, angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich für die Marker B-Zellen ($p=0,005$), CD4 ($p=0,001$) und TCR $\alpha\beta$ ($p=0,002$) bei chronischer Ileitis. Dagegen zeigten sich die entsprechenden Werte für die Marker CD8 ($p=0,41$), CD11b ($p=0,72$) und CD25 ($p=1,0$) nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 11).

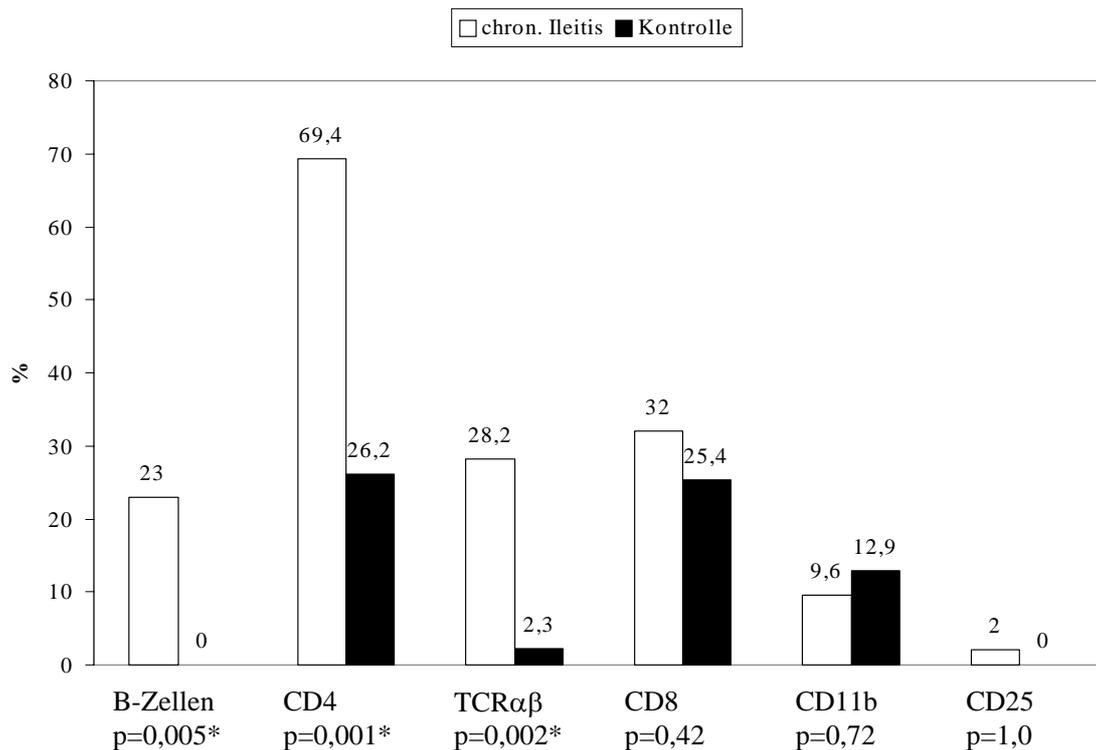


Abbildung 11: Überblick über die Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen bei Ratten mit chronischer Ileitis. Es sind die relativen prozentualen Werte im direkten Vergleich von chronischer Ileitis und Kontrolle dargestellt. Unter den Säulen wird die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben, die aus dem χ^2 Test resultiert. Mit * gekennzeichnete Werte sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die Untersuchung der akuten Indomethazin-induzierten Ileitis zeigte eine statistische Signifikanz sowohl zum Zeitpunkt 24h als auch 72h nach Induktion für die Assoziation der M-Zellen mit B-Zellen ($p=0,02$ bzw. $0,02$) und TCR $\alpha\beta$ positive T-Zellen ($p=0,008$ bzw. $0,006$).

Im Gegensatz dazu konnte für die Assoziation von CD4-positiven T-Zellen mit M-Zellen nur zum Zeitpunkt 24h nach Induktion ein statistisch signifikanter Anstieg bestimmt werden. Nach weiteren 48h war im Vergleich zur gesunden Kontrolle kein Unterschied mehr zu detektieren (siehe Abb.12).

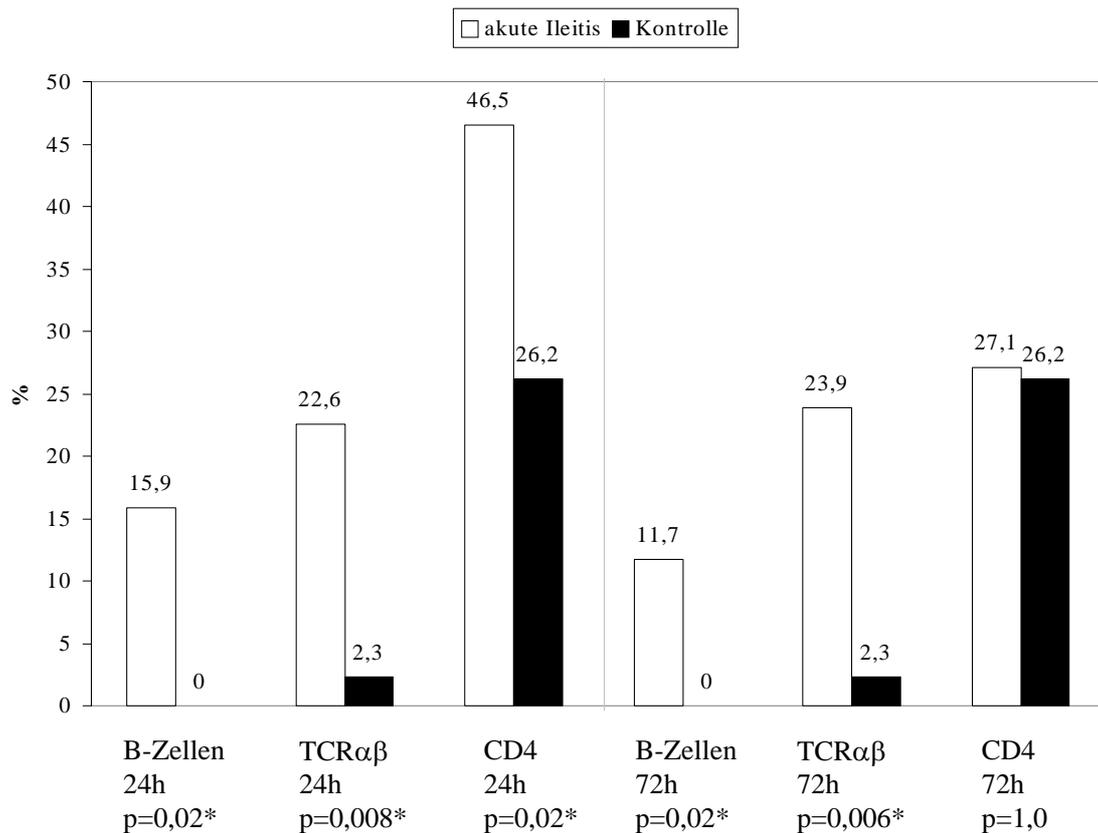


Abbildung 12: Übersicht über die verschiedenen Assoziationen einen Tag und 3 Tage nach Induktion einer akuten Ileitis. Zum direkten Vergleich sind die Balken mit prozentualen Werten der akuten Ileitis und der Kontrolle benachbart angeordnet. Unter den Säulen wird die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben, die aus dem χ^2 Test resultiert. Mit * gekennzeichnete Werte sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

4.6 *In Situ* Hybridisierung von Peyer'schen Plaques mit einer FITC markierten pIL4-Sonde

Studien konnten zeigen, daß die T-Zell Antwort des Peyer'schen Plaques auf luminale Antigene teilweise durch Th2-Zellen, die IL4 bilden, beeinflusst wird. Intestinale Antigene sind ebenso für die Induktion einer Indomethazin-induzierten Ileitis wichtig. Mit Hilfe der *In Situ* Hybridisierungsmethode sollte eine Analyse der IL4 Expression im entzündeten und gesunden Gewebe erfolgen, um die Rolle einer veränderten Cytokinproduktion nach Behandlung mit Indomethazin und ihre Rolle für die M-Zell-Formation zu studieren.

Zunächst wurde RNA aus Milzzellen der Ratten isoliert. Diese RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit für das Interleukin 4 spezifischen Primern wurde nun eine PCR zur Amplifikation eines IL4 Genabschnittes

durchgeführt. Die so gewonnene spezifische DNA wurde nun in einen pGEM-T Vektor kloniert und in *E. coli* Bakterien transformiert. Das erhaltene Konstrukt pIL4 enthielt das IL4 Genprodukt flankiert von den T7 und SP6 RNA Startstellen. Eine Sequenzierung der DNA erfolgte, um die Orientierung des Konstruktes im Vektor zu bestimmen, und so durch Wahl einer geeigneten Polymerase jeweils einen Sense oder Antisense RNA Strang zu synthetisieren. Durch Zugabe von FITC markierten Nukleotiden wurde nun eine mRNA erzeugt, die mit der mRNA für IL4 in den Gewebeschnitten hybridisiert werden kann oder, im umgekehrten Fall, eine mRNA gebildet, die als Negativkontrolle verwendet werden kann (siehe Kapitel 3.6).

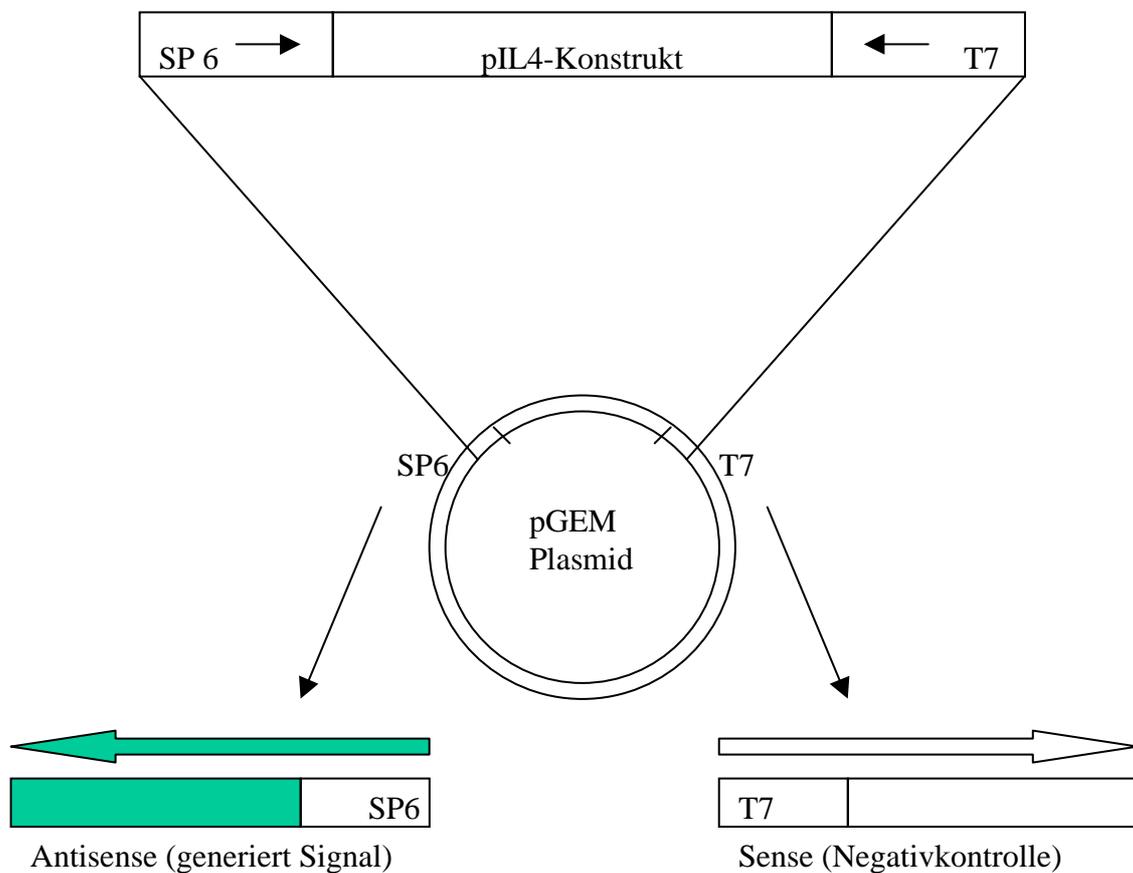


Abbildung 13: pIL4 Konstrukt im pGEM Plasmid. Durch Verwendung einer speziellen Polymerase, die die SP6 oder T7 Region des Plasmides erkennt, kann sowohl eine Sense RNA Sonde als auch eine Antisense RNA Sonde aus dem gleichen Plasmid gewonnen werden.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der IL4 PCR. Man erkennt, daß das gewünschte PCR Produkt mit 152 Basenpaaren vorhanden ist, die Negativkontrolle zeigt dagegen keine Bande.

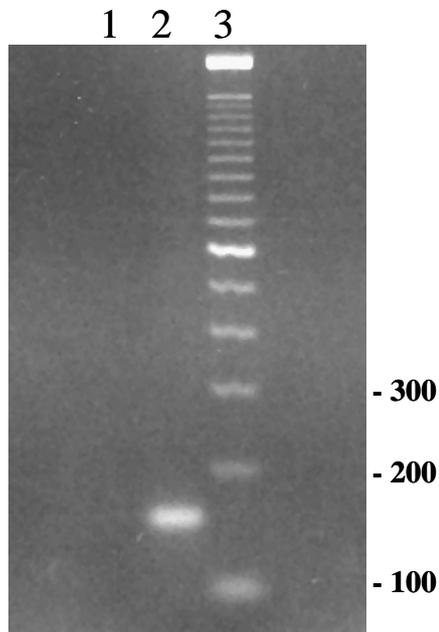


Abbildung 14: Ergebnis der Gel-Elektrophorese der IL4 PCR. (1) Negativkontrolle (2) Bande zwischen 100 und 200 Basenpaaren entsprechend dem korrekten PCR Produkt (3) DNA Leiter in 100 bp Abschnitten.

Die Abbildung 15 zeigt repräsentative Ergebnisse der *In Situ* Hybridisierung mit der pIL4-RNA Sonde. Die Negativkontrolle mit der Sense Sonde zeigt einzelne unspezifische FITC Signale, die keinem Teil des Peyer'schen Plaques spezifisch zugeordnet werden können und am ehesten Artefakten entsprechen. Darunter befindet sich eine *In Situ* Hybridisierung mit einer Antisense Sonde, die bei einem nicht entzündeten Peyer'schen Plaque durchgeführt wurde. Man erkennt vereinzelte Signale im Bereich des subepithelialen Domteils des Peyer'schen Plaques. Im interfollikulären Raum sieht man kein Signal. Das Keimzentrum bleibt signalfrei. Das FAE zeigt ebenfalls ein positives FITC Signal.

Zum Vergleich dazu befindet sich darunter eine *In Situ* Hybridisierung mit der Antisense RNA Sonde eines Peyer'schen Plaques, der entzündet ist. Hier kommt im gesamten Dombereich ein starkes FITC-Signal durch die dortigen Lymphozyten zum Ausdruck. Das Signal ist subepithelial besonders stark. Zum Keimzentrum hin werden immer weniger Zellen mit IL4 Signal gesehen, das Keimzentrum selbst ist nahezu

signalfrei. An den Flanken des Domes und in Teilen der interfollikulären Zone ist ein IL4 Signal zu erkennen. Das FAE zeigt ebenfalls ein starkes FITC Signal.

Insgesamt zeigt sich bei geringem Hintergrund eine deutliche Induktion von IL4 v.a. in der subepithelialen Domregion im Rahmen der Indomethazin-induzierten Ileitis.

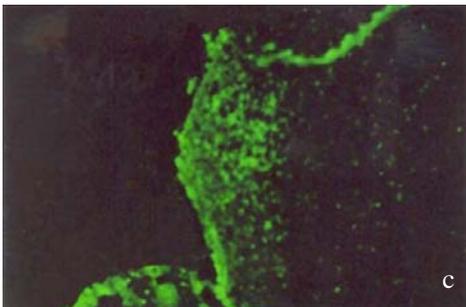
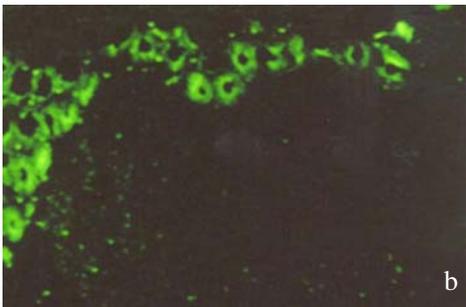
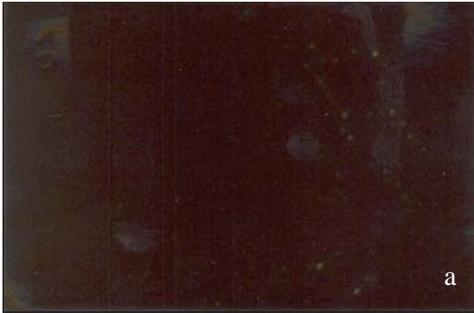


Abbildung 15: FITC *In Situ* Hybridisierung mit IL4 RNA Sonde.
a) Negativkontrolle b) Nicht entzündeter Peyer'scher Plaque c) Entzündeter Peyer'scher Plaque

5. Diskussion

5.1 Einleitung

Die exakten Mechanismen der Entstehung und Perpetuierung des Morbus Crohn sind bis dato nicht beschrieben. Eine Reihe unterschiedlicher Studien konnten u.a. den Einfluß von luminalen Antigenen und Bakterien zeigen (FIOCCHI 1998), die unter physiologischen Bedingungen v.a. durch M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithel aufgenommen werden und so eine Immunantwort des GALT induzieren. Daneben scheinen weitere immunologische wie genetische Faktoren für die Entwicklung und den Verlauf der Erkrankung wichtig zu sein. Jüngere Studien gehen davon aus, daß Ulcerationen beim Morbus Crohn ihren Ursprung im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) nehmen (FUJIMURA et. al. 1996), was die Bedeutung des FAE und der dort lokalisierten M-Zellen für die Pathogenese dieser Erkrankung unterstreicht.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher auf die Frage eingegangen werden, welche Rolle M-Zellen, die eine bedeutende Funktion in der Induktion mukosaler Immunantworten besitzen, bei akuten und chronischen Entzündungsvorgängen spielen. Insbesondere sollte dabei auf die Frage eingegangen werden, wie die Kinetik der M-Zell Formation im FAE im Rahmen einer akuten Entzündung verläuft und ob eine alterierte Antigenaufnahme via M-Zellen mit dem Entzündungsprozess assoziiert ist. Als korrespondierende Parameter wurden neben der Anzahl der M-Zellen morphologische Kriterien wie die Lymphozytenpopulationen in der M-Zell-Tasche untersucht. Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob eine veränderte Cytokinproduktion im Peyer'schen Plaque zwischen Kontrollen und der Indomethazin-induzierter Ileitis vorliegt.

5.2 Das Indomethazin-induzierte Ileitismodell

Die Indomethazin-induzierte Ileitis der Ratte repräsentiert ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der entzündlichen Darmerkrankungen. Neuere Studien konnten zeigen, daß dieses Tiermodell Ähnlichkeiten mit dem Morbus Crohn aufweist (ANTHONY et al. 2000). Neben vaskulären Faktoren scheinen Mechanismen wie die Inaktivierung von protektiven Prostaglandinen, Gallesekretion, Nahrungsmittelbestandteile und Bakterien

wichtig für die Entstehung der chronischen Darmentzündung zu sein (SATHOH et al. 1983, KENT et al. 1969).

Eine detaillierte Charakterisierung der akuten und chronischen Indomethazin-induzierten Ileitis der Ratte konnte zeigen (YAMADA et al. 1993), daß die einmalige Gabe von Indomethazin in der Dosis von 7,5 mg/kg KG innerhalb kurzer Zeit zu einer Dünndarmentzündung führt, die durch mukosale Ulcerationen entlang der mesenterialen Wurzel des Darms, Darmschlingenadhäsionen, mesenteriale Blutungen, Dilatation der Darmschlingen, Darmwandödem und Diarrhöe gekennzeichnet ist. Die maximale Ausprägung der akuten Entzündung wird nach drei Tagen erreicht. Nach einer Woche ist die Entzündung in der Regel mit einer Restitutio ad integrum ausgeheilt. Für die Entstehung der Entzündung sind multiple Faktoren relevant: Das Zusammenwirken von Indomethazin und Galle hat synergistische zytotoxische Effekte auf das intestinale Epithel, eine Translokation von intestinalen Bakterien spielt bei akuter Ileitis eine untergeordnete Rolle. Dagegen besitzen neutrophile Granulozyten offensichtlich keinen Einfluß auf den Ablauf der Entzündung (YAMADA et al. 1993).

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch die chronische Indomethazin-induzierte Ileitis, die durch die zweimalige Gabe von Indomethazin in der Dosis von 7,5 mg/kg KG im Abstand von 24 Stunden erreicht wurde. Die so hervorgerufene Ileitis hatte eine Mortalität von 14,7% hervorgerufen durch Peritonitiden. Entzündliche Veränderungen bei chronischer Indomethazin-induzierter Ileitis persistierten bei einem Großteil der Ratten über zwei Wochen, also bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Es wurden massiv dilatierte Darmschlingen, Adhäsionen, hyperämische Veränderungen und multiple zum Mesenterium hin gelegene Ulcerationen während des gesamten Beobachtungszeitraum festgestellt. Die chronische Entzündung entstand zunächst durch eine erhöhte Permeabilität der epithelialen Barriere gefolgt von einer massiven Translokation endogener Bakterien in die mesenterialen Lymphknoten. Durch aktivierte Entzündungszellen, die nicht neutrophilen Granulozyten entsprechen, wurde die Entzündung bis zum Ende des Beobachtungszeitraums aufrecht erhalten. Die Gabe von Antibiotika konnte den Ablauf der chronischen Indomethazin-induzierten Ileitis deutlich mildern, so daß angenommen wurde, daß die endogene Bakterienflora einen erheblichen Einfluß auf das entzündliche Geschehen hat. In Synopsis mit den Befunden

anderer Arbeitsgruppen kann festgestellt werden, daß das chronische Indomethazin-induzierte Ileitismodell Übereinstimmungen mit der Crohn'schen Erkrankung aufweist. In unserer Studie konnte gezeigt werden, daß bestimmte Unterschiede in dem Modell der akuten Indomethazin-induzierten Ileitis und der chronischen Indomethazin-induzierten Ileitis mit Veränderungen auf M-Zell Ebene einhergehen. Während die Anzahl der M-Zellen nach 7 Tagen im akuten Entzündungsmodell wieder den Wert von nicht entzündetem Gewebe erreicht, können in der chronischen Entzündung auch 14 Tage nach Induktion der Ileitis noch vermehrt M-Zellen gesichtet werden. Unklar bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt, ob die chronisch persistierende Entzündung ursächlich für die Expansion der M-Zellen im FAE verantwortlich ist oder eine persistierende Translokation luminaler Antigene durch M-Zellen die Entzündung unterhält.

5.3 Induktion von M-Zellen

Viele Veröffentlichungen haben Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung von M-Zellen in verschiedenen Tiermodellen erbracht. Unter entzündlichen Bedingungen sind M-Zellen bisher selten untersucht worden. In einer jüngeren Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß M-Zellen unter chronisch-entzündlichen Bedingungen vermehrt angetroffen werden und die Vermehrung dieser M-Zellen mit den morphologischen Zeichen der M-Zell Apoptose einher geht (KUCHARZIK et al. 2000). Korrespondierend mit den vermehrten M-Zellen nach Indomethazingabe bei Ratten konnte auch bei Menschen mit Spondylarthropathie im Rahmen einer Darmentzündung eine starke Vermehrung von M-Zellen festgestellt werden (CUVELIER et al. 1994). Andere Arbeitsgruppen beschrieben jedoch einen Verlust von M-Zellen im FAE von Lymphfollikeln im Dickdarm des Menschen bei Morbus Crohn (FUJIMURA et al. 1992).

In unserer Untersuchung wurde das Fehlen der alkalischen Phosphatase im Bürstensaum der M-Zellen als morphologisches Zeichen verwendet. Dieser negative Marker für M-Zellen ist ein verlässlicher morphologischer Parameter für diese Zellpopulation (OWEN&BHALLA 1983). Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit einem kürzlich entdeckten M-Zell spezifischen monoklonalen Antikörper für Ratten korreliert (RAUTENBERG et al. 1997).

Die Anzahl der M-Zellen ist bereits 12 Stunden nach der Indomethazingabe deutlich über der Norm erhöht und erreicht nach 7 Tagen wieder den ursprünglichen Zustand vor der akuten Entzündung. In dieser Studie wurde gezeigt, daß M-Zellen unter nicht entzündlichen Bedingungen 3,9% der Zellen im FAE ausmachen, jedoch unter akut entzündlichen Bedingungen nach drei Tagen 10,3% der Zellen bilden und nach 7 Tagen wieder den Ausgangswert erreichen. Die M-Zell Formation korreliert mit den makroskopischen Zeichen der Entzündung wie Hyperämie, Wandödem und Ulcerationen, die bereits maximal nach 24 h ausgeprägt sind und sich hauptsächlich im distalen Jejunum und proximalen Ileum befinden. Ab dem dritten bis zum siebtem Tag sind die Entzündungszeichen rückläufig, so daß dann kaum noch morphologische Zeichen der Entzündung zu erkennen sind. Da die höchste Anzahl von M-Zellen im FAE nach 3 Tagen beobachtet werden, scheint dies eine sekundäre Folge der Entzündung zu sein und nicht die primäre Antwort auf die Gabe von Indomethazin. Die signifikante Vermehrung von M-Zellen im FAE kurz nach Induktion der Entzündung deutet darauf hin, daß M-Zellen wesentlich in den Prozeß der Entzündung eingebunden sind. Interessant erscheint die rasche Induktion der M-Zell Formation in Hinblick auf die Ontogenese von M-Zellen, die bis heute trotz multipler Studien als nicht abschließend geklärt anzusehen ist. Zur Zeit werden zwei verschiedene Theorien bevorzugt diskutiert (NICOLETTI 2000). Zum einen wurden in den Krypten der Dome der Peyer'schen Plaques Zellen identifiziert, die bestimmte M-Zell typische Eigenschaften haben, so daß hier eine eigene Zelllinie, die sich aus Stammzellen generiert, postuliert wird. Andere Studien konnten zeigen, daß eher immunologische Bedingungen im FAE zur Induktion von M-Zellen führen. So konnte Savidge et al. zeigen, daß SCID-Mäusen, denen Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe fehlt, nach Behandlung mit Lymphozyten von Wildtypmäusen Follikel assoziiertes Gewebe mit M-Zellen entwickeln (SAVIDGE et al. 1995). Außerdem konnte Kerneis et al. ein in vitro Modell zur Differenzierung von M-Zellen aus einer epithelialen Caco2 Zelllinie in Ko-Kultur mit Lymphozyten des Peyer'schen Plaques vorstellen (KERNEIS et al. 1997). Hieraus ergibt sich, daß bestimmte immunologische oder inflammatorische Bedingungen Enterozyten dazu bringen, sich in M-Zell-artige Zellen umzuwandeln, obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen weiter unklar bleiben. Schließlich wurde postuliert, daß M-Zellen aus Stammzellen generiert werden und zuvor ein

phänotypisches Stadium als Enterozyten durchlaufen. Diese „pre-M-Zellen“ könnten sich dann durch die immunologischen Bedingungen des Peyer'schen Plaque bei Entzündung schnell zu M-Zellen weiterentwickeln. Die Beschleunigung dieses Prozesses, der bei normaler Entwicklung ca. drei Tage benötigt (GEBERT et al. 2000), würde durch das veränderte Mikroklima erreicht (KRAEHENBUHL & NEUTRA 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen an, daß die Anzahl der M-Zellen rasch ansteigt und über einen Zeitraum von 3 Tagen über die Norm statistisch signifikant erhöht ist. Der kurzfristige Anstieg macht eine „de novo“ M-Zell Genese unwahrscheinlich, so daß das Mikroklima im Bereich des FAE am ehesten für die Induktion ursächlich verantwortlich scheint und eventuell prädeterminierte M-Zellen möglicherweise durch veränderte immunologische Bedingungen schneller zu M-Zellen weiterdifferenzieren. Dieser Frage soll in den weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

Die Unterschiede in der Anzahl der M-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Entzündungsinduktion sind wahrscheinlich multifaktoriell begründet. Es könnten genetische Unterschiede, Unterschiede in der Darmflora bzw. eine unterschiedliche Ausprägung der Indomethazin-induzierten Ileitis zusätzlich in Frage kommen. Die angedeutete Zweigipfligkeit ist daher wahrscheinlich eher Ausdruck der systemimmanenten Variabilität als ein eigenständiger Mechanismus.

5.4 Assoziierte Lymphozyten

Vorherige Beobachtungen an menschlichen M-Zell-Taschen deuten auf ein spezialisiertes Mikroklima hin, in dem T-Gedächtniszellen ($CD4^+CD45R0^+$) und B-Gedächtniszellen ($sIgD^+CD20^+$) das Proliferationsantigen Ki-67 exprimieren. Weitere Beobachtungen ergaben, daß bestimmte B-T-Zell Interaktionen im Innern der M-Zell-Tasche stattfinden. Hier wird lokal eine Immunantwort auf luminale Antigene generiert und gesteuert und die mukosale Immunantwort in idealer Weise stimuliert (FARSTAD et al. 2001).

Die Daten in dieser Untersuchung zeigen signifikante Steigerungen von M-Zellen assoziierten TCR $\alpha\beta$ positiven, CD4 positiven T-Zellen und B-Zellen im Verlauf der chronischen Darmentzündung der Ratte, während andere Marker (CD8,CD11b,CD25) im Vergleich zu nicht entzündetem Gewebe nicht verändert sind. Es ist möglich, daß

insbesondere die beobachtete Vermehrung von B-Zellen und CD4 positiven Zellen das morphologische Korrelat zur vermehrten Antigenaufnahme durch M-Zellen im Rahmen der Entzündung darstellt.

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, daß unter entzündlichen Bedingungen die Vermehrung von M-Zellen im FAE mit einer vermehrten Assoziation von B-Zellen an M-Zellen einhergeht. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß B-Zellen für das gehäufte Auftreten von M-Zellen im FAE verantwortlich sein könnten, wie Vorarbeiten von Borghesi und Mitarbeiter postulieren (BORGHESI et al. 1999). Da B-Zellen natürlicherweise in der M-Zell-Tasche vorkommen, erschien es primär verwunderlich, daß sie nie an M-Zellen bei Kontrolltieren gefunden wurden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der verwendete Antikörper spezielle Subpopulationen von B-Zellen nicht markieren kann. Daten über das Verhalten dieses Antikörpers bei unterschiedlichen Populationen von B-Zellen liegen nicht vor, es ist jedoch bekannt, daß er regelmäßig Zellen im Keimzentrum des Peyer'schen Plaue anfärbt, aber keine Plasmazellen markiert. Man muß daher annehmen, daß der Antikörper nicht alle B-Zellen in der M-Zell-Tasche anfärbt bzw. nur auf sehr niedrigem, mit der verwendeten Methode nicht detektierbarem Niveau. Im Rahmen der Entzündung erscheint somit eine differenzierte B-Zell Population in der M-Zell-Tasche, die mehr dem Typ innerhalb des Keimzentrums entspricht. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, daß definierte B-Zellmarker entzündungsabhängig heraufreguliert werden.

CD4 positive Zellen in der M-Zell-Tasche sind T-Helferzellen zuzuordnen. Da sie besondere immunregulatorische Eigenschaften besitzen, ist ihr vermehrtes Auftreten in der M-Zell-Tasche interessant. Insbesondere stellt sich die Frage, ob auch möglicherweise CD4 positive Zellen an der M-Zell Induktion beteiligt sind oder sie eher für die Induktion der Immunantwort wichtig sind. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß bei der Untersuchung der M-Zell-Tasche in der akuten Indomethazin-induzierten Ileitis nach 24 Stunden B-Zellen, TCR $\alpha\beta$ positive Zellen und CD4 positive T-Helferzellen vermehrt angetroffen werden. Dies unterscheidet sich nicht von der Situation bei der chronischen Ileitis. Nach 3 Tagen jedoch sieht man, daß zwar noch vermehrt B-Zellen und TCR $\alpha\beta$ positive Zellen in der M-Zell-Tasche vorhanden sind, nicht jedoch mehr CD4 positive T-Helferzellen im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Situation korreliert mit der makroskopisch sichtbaren Beendigung der Entzündung des

Darms. Somit kann vermutet werden, daß die CD4 positive Population mit der Entzündungsreaktion einhergeht und nicht direkt die M-Zell Formation beeinflussen, deren Anzahl nach 3 Tagen sich anhaltend erhöht darstellt.

5.5 Interleukin 4 Produktion durch Zellen im Peyer'schen Plaque bei Entzündung

Interleukin 4 (IL 4) ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von ca. 15-19 kDa (speziesabhängig). Es wird hauptsächlich durch aktivierte Th2-Helferzellen, basophile Granulozyten und Mastzellen produziert und hat multiple biologische Funktionen. Diese umfassen bei B-Zellen: Vermehrte Expression von MHCII Komplexen, Immunglobulinklassenwechsel hin zu IgG und IgE, Expression von CD23 und verstärkte IgG Produktion. IL 4 bewirkt bei T-Zellen das Wachstum von T-Helferzellen und zytotoxischen Zellen. Andere Effekte sind die Verstärkung der Reifung von dendritischen Zellen, die verringerte Produktion von IL 1, IL 6 und TNF α durch Macrophagen, die Inhibition der Angiogenese und die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM1 auf Epithelzellen. Die Sekretion von IL 4 durch Th2-Zellen bewirkt eine Suppression von IFN γ . Die Bedeutung von IL 4 bei intestinalen Entzündungen wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß eine verminderte Expression von IL 4 bei Morbus Crohn durch genetische Veränderung des IL 4 Genes beschrieben wurde (KLEIN et al. 2001).

In Situ Hybridisierungsstudien in dieser Arbeit zeigen einen deutlichen Unterschied bezüglich der Expression von IL 4 im Peyer'schen Plaque. Bei Kontrollen zeigt sich eine IL 4 Expression hauptsächlich in Epithelzellen und in vereinzelt Lymphzellen im Peyer'schen Plaque. Unter den Bedingungen der Entzündung zeigen sich jedoch viele Zellen im Bereich des FAE, des Domes, der interfollikulären Zone und um die Krypten, die IL 4 exprimieren. Das Keimzentrum bleibt jedoch ohne IL 4 Signal, so daß spekuliert werden kann, daß die vermehrte IL 4 Produktion auf dendritische Zellen und T4-Helferzellen zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang sind insbesondere myeloide dendritische Zellen beschrieben worden, die eine starke durch IL 4 gekennzeichnete Immunantwort durch T-Zellen *in vitro* realisieren (IWASAKI & KELLSALL 2001).

Die differenzierte Produktion von Interleukin 4 durch CD4 positive Zellen im gesunden Peyer'schen Plaque im Gegensatz zu CD4 positiven Zellen der Milz wurde beschrieben

(TONKONOGY & SAWAIN 1993). Da diese Zellen im Dombereich besonders häufig vorkommen, scheinen sie für einen Großteil der IL 4 Produktion bei der Indomethazin-induzierten Entzündung verantwortlich zu sein. Die Produktion von Interleukin 4 im entzündeten Peyer'schen Plaque ist kongruent mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. In einem anderen Tiermodell wurde die entzündungsfördernde Wirkung von IL 4 insbesondere bei Th1 vermittelter Darmentzündung beschrieben (FORT et al. 2001).

Eine Arbeitsgruppe konnte bei M. Crohn einen Zusammenhang zwischen der antiinflammatorischen Wirkung der Ausschaltung eines Stückes Ileums durch Ileostoma und der verminderten Produktion von IL 4 und Interferon γ durch CD3 positive intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und Lamina-Propria-Lymphozyten (LPL) im ausgeschalteten Stück nachweisen (SCHMIT et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Indomethazin-induzierte Ileitis durch Veränderung der Immunantwort hin zu einer durch Interleukin 4 charakterisierten Antwort gekennzeichnet ist. Die Daten legen nahe, daß ein Zusammenhang zwischen der veränderten Antigenaufnahme durch M-Zellen, der Vermehrung der M-Zellen, einer veränderten Zusammensetzung der Lymphozyten der M-Zell-Tasche und der Expression von IL 4 im Peyer'schen Plaque bei Entzündung besteht.

Zusammenfassend unterstreichen die Daten dieser Untersuchung die Bedeutung der M-Zellen sowie der Peyer'schen Plaques im Rahmen intestinaler Entzündungsreaktionen. Erhöhte Antigenaufnahme durch eine expandierte M-Zell Population in Kombination mit einer alterierten Antigenprozessierung sind möglicherweise Mechanismen, die zur Entstehung und Perpetuierung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung beitragen.

6. Zusammenfassung

M-Zellen sind spezialisierte Epithelzellen im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) der Peyer'schen Plaques und spielen eine wichtige Rolle im mukosalen Immunsystem. Die Mechanismen der M-Zell -Entstehung und -Funktion sind bis heute unzureichend verstanden. Ziel dieser Untersuchung war es, die Kinetik der M-Zell Formation unter den Bedingungen der akuten Darmentzündung darzustellen und die M-Zell assoziierten Lymphozyten zu charakterisieren. Zur Untersuchung diente ein Tiermodell mit Wistarratten, die durch die Gabe von Indomethazin eine Ileitis entwickeln (Bez.-Reg. Münster 29.7.01, AZ: G6/99). M-Zellen wurden durch das Fehlen der alkalischen Phosphatase identifiziert, Lymphozytensubpopulation wurden immunhistochemisch anhand ihrer Oberflächenmoleküle dargestellt. Die Expression von Interleukin-4 wurde durch *In Situ* Hybridisierung untersucht. Die Induktion von M-Zellen bei akuter Entzündung stellte sich nach 12 h dar und blieb bis zu 72 h konstant, nach einer Woche fand sich keine weitere Zunahme mehr. Es wurde eine signifikante Vermehrung der $\text{TCR}\alpha\beta^+$, CD4^+ T-Zellen und B-Zellen entdeckt; keine Unterschiede fanden sich für die Marker CD8, CD11b und CD25. Im Rahmen einer chronischen Ileitis konnte ebenfalls eine signifikante Vermehrung von assoziierten $\text{TCR}\alpha\beta^+$, CD4^+ T-Zellen und B-Zellen gezeigt werden. *In Situ* Hybridisierungsversuche ergaben eine erhöhte IL-4 Expression durch Zellpopulationen im Innern des Peyer'schen Plaques im Rahmen der Ileitis. Die Bildung von M-Zellen im FAE ist unter den Konditionen der Entzündung deutlich vermehrt und geht offensichtlich mit der Assoziation bestimmter Lymphozytenpopulation einher. M-Zellen scheint daher eine Rolle bei der Pathogenese der Indomethazin-induzierten Ileitis zuzukommen. Die beschriebenen Mechanismen haben möglicherweise auch eine Bedeutung bei der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.

7. Literaturverzeichnis

Adachi S. et al. Essential role of IL7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage.

Int. Immunol. 10: 1-6 (1998).

Akira S., Takeda K. & Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.

Nature Immunol. 2: 675-680 (2001).

Allan C.H., Mendrick D.L. & Trier J.S. Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants.

Gastroenterology 104: 698-708 (1993).

Alpan O., Rudomen G. & Matzinger P. The role of dendritic cells, B cells and M cells in gut oriented immune response.

J. Immunol. 166: 4843-4851 (2001).

Anthony A., Pounder R.E., Dhillon A.P., Wakefield A.J. Similarities between ileal Chron's disease and indomethazin experimental jejunal ulcers in the rat.

Aliment Pharmacol Ther 14:241-5 (2000).

Arnold G., Beier H.M., Hermann M., Kaufmann P., Kretschmann H.-J., Kühnel W., Schiebler T.H., Schmidt W., Steiniger B., Winckler J., van der Zypen E. & Zilles K.: Allgemeine Anatomie des Abwehrsystems.

In Schiebler, Schmidt, Zilles (Hrsg): Anatomie, 6. Auflage, Springer Verlag; Berlin, New York, Heidelberg (1995), S. 171-186.

Autenrieth I.B. & Firsching R. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: An ultrastructural and histological study.

J. Med. Microbiol. 44: 285-94 (1996).

Ayabe T. et al. Secretion of microbial α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria.

Nature Immunol. 1: 113-118 (2000).

Beatty W.L. & Sansonetti P.J. Role of lipopolysaccharide in signaling to subepithelial polymorphonuclear leukocytes.

Infect. Immun. 65: 4395-4404 (1997).

- Bienenstock J. und Clany R.** Bronchial associated lymphoid tissue.
Hrsg. P.L. Ogra, M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Mestecky, W. Strober und J. Bienenstock. Handbook of mucosal immunology. Academic Press., Inc. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. Seite 529-538 (1994).
- Borghesi C., Regoli M., Bertelli E., Nicoletti C.** Modifications of the follicle-associated epithelium by short-term exposure to a non-intestinal bacterium.
J Pathol 180: 326-32 (1996).
- Borghesi C., Taussig M.J., Nicoletti C.** Rapid appearance of M cells after microbial challenge is restricted at the periphery of the follicle-associated epithelium of Peyer's patch.
Lab. Invest. 79:1393-1401 (1999).
- Braeger C.P. et al.** Ontogenetic aspects of the intestinal immune system in man.
Int. J. Clin. Lab. Res. 22:1-4 (1992).
- Bye W.A., Allen C.H., Trier J.S.** Structure, distribution and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum.
Gastroenterology 86: 789-801 (1984).
- Cook D.N. et al.** CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue.
Immunity 12: 495-503 (2000).
- Cuvelier C.A., Quatacker J., Mielants H. et al.** M cells are damaged and increased in number in inflamed human ileal mucosa.
Histopathology 24: 417-426 (1994).
- De Togni P. et al.** Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin.
Science 264: 703-706(1994).
- Farstad I.N., Carlsen H., Morton H.C. & Brandzaeg P.** Immunglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics.
Immunology 101: 354-363 (2000).
- Farstad I.N., Halstensen T.S., Fausa O. & Brandtzaeg P.** Heterogeneity of M cell associated B and T cells in human Peyer's patches.
Immunology 83: 457-464 (1994).

- Finke D., Acha-Orbea H., Mattis A., Lipp M. & Kraehenbuhl J.P.** CD4⁺CD3⁺-Cells induce Peyer's patch Development: Role of $\alpha 4\beta 1$ Integrin Activation by CXCR5. *Immunity* 17: 363-373. (2002).
- Finnlay B.B. & Falkow S.** Common themes in microbial pathogenicity revisited *Micro. Molec. Biol. Review* 61: 136-169 (1997).
- Fiocchi C.** Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205 (1998).
- Fiocchi C.** Mucosal Immunity. *Gastroenterology International*. 2: 172-179 (1989).
- Fort M., Lesley R., Davidson N. et al.** IL-4 exacerbates disease in a Th1 cell transfer model of colitis. *J Immunol*. 166(4): 2793-2800 (2001)
- Förster A. et al.** A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87: 1037-1047 (1996).
- Fu Y.X. & Chaplin D.D.** Development and maturation of secondary lymphoid tissue. *Annu. Rev. immunol.* 17: 399-433 (1999).
- Fujimura Y.** Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches-phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol. Jpn.* 21: 325-335 (1996).
- Fujimura Y., Hosobe M., Kihara T.** Ultrastructural study of m cells from colonic lymphoid nodules obtained by colonic biopsy. *Dig. Dis. Sci.* 37: 1089-1098 (1992).
- Fujimura Y., Kamoi R., Iida M.** Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohns disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy and immunohistochemistry. *Gut* 38: 724-32 (1996).
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A.** Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501 (1992).

Gebert A. & Hach G. Differential binding of lectins to M cells and enterocytes in the rabbit caecum.

Gastroenterology 105: 1350-1361 (1993).

Gebert A. Identification of M-cells in the rabbit tonsil by vimentin immunohistochemistry and in vivo protein transport.

Histochem. Cell. Biol. 104: 211-20 (1995).

Gebert A., Göke M., Rothkötter H.J. & Dietrich C.F. Mechanismen der Antigenaufnahme im Dün- und Dickdarm: Die Rolle der M Zellen für die Initiierung von Immunantworten.

Z Gastroenterol. 38: 855-872 (2000).

Gebert A., Rothkötter H.J. & Pabst R. M cells in Payer's patches of the intestine.

Int. Rev. Cytol. 167: 91-159 (1996).

Gebert A & Pabst R. M cells at locations outside the gut.

Sem. immunol. 11: 165-170 (1999).

Gewirtz A.T. & Madara J.L. Periscopes up! Monitoring microbes in the intestine.

Nature Immunol. 2: 288-290 (2001).

Golovkina T.V., Shlomchik M., Hannum L., Chervonsky A. Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity.

Science 286: 1965-1968 (1999).

Hanski C., Grützkau A., Neumann M. & Riecken E.O. Forschungsforum I: Pathogenitätsmechanismen für Erreger im Magen-Darm-Trakt.

Ergebnisse der Gastroenterologie 25: 62-65 (1989).

Hein W.R. Organisation of mucosal lymphoid tissue.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 236: 1-15 (1999).

Heinecke A. et al. t Test. In: Java unterstützte münsteraner Biometrie Oberfläche [JUMBO] S.65 1998 und [HTTP://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/vierf.html](http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/vierf.html)

Hogenesch H. & Felsburg P.J. Ultrastructure and alkaline phosphatase activity of the dome epithelium of canine Peyer's patches.

Vet. Immunol. Immunopathol. 24: 177-186 (1990).

Hopkins S.A., Niedergang F., Corthesy-Theulaz E. & Kreaehenbuhl J.P. A recombinant Salmonella thyphimurium vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells.

Cell Microbiol. 2: 59-68 (2000).

Huang F.P., Platt N., Wykes M., Major J.R., Powell T.J., et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes.

J. Exp. Med. 191: 435-443 (2000).

Iwasaki A. & Kelsall B.L. Localization of distinct Peyer's patch dendritic subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine.

J. Exp. Med. 191: 1381-1393 (2000).

Iwasaki A. & Kelsall B.L. Unique functions of CD11b⁺, CD8 α ⁺, and doebble-negative peyer's patch dendritic cells.

J. Immunology 166: 4884-4890 (2001).

Janeway C.A.Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view.

Pros. Natl. Acad. Sci. USA 98: 7461-7468 (2001).

Jones B., Pascopella L. & Falkow S. Entry of microbes into the host using M cells to break the mucosal barrier.

Curr. Opin. Immunol. 7: 474-478 (1995).

Kato T. & Owen R.L. Structure and function of intestinal mucosal epithelium.

Hrsg. P.L. Ogra, M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Mestrcky, W. Strober und J. Bienenstock. Handbook of mucosal immunology. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Boston. London, Sydney, Tokyo, Toronto. Seite 11-26 (1994).

Kayser F.H. Allgemeine Aspekte der medizinischen Mikrobiologie.

In: Kayser F., Bienz A., Eckert J, Zinkernagel R. (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie, 9. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York (1998). S. 29-79

Kayser F.H. Allgemeine Aspekte der medizinischen Mikrobiologie.

In: Kayser F., Bienz A., Eckert J, Zinkernagel R. (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie, 9. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York (1998). S. 407-408

Kent T.H., Cardelli R.M., Stamler F.W. Small intestinal ulcers and intestinal flora in rats given indomethacin.

Am J. Pathol 54: 237-245 (1964).

Kerneis S., Bogdanova A., Colucci-Guyon E., Kraehenbuhl J.P., Pringault E. Cytosolic distribution of villin in M cells from mouse peyer's patches correlates with the absence of a brush border.

Gastroenterology 110: 515-521 (1996).

Kerneis S., Bogdanova A., Kraehenbuhl J.P. & Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria.

Science 277: 949-952 (1997).

Klein W., Tromm A., Grippa T. et al. Interleukin-4 receptor gene polymorphism in inflammatory bowel diseases.

Genes Immun 2(5): 287-289 (2001).

Komminoth P. Detection of mRNA in tissue sections using DIG-labeled RNA and oligonucleotide probes.

In: Nonradioactive *In Situ* Hybridization Application Manual. 2nd Edition, Hrsg. Boehringer Mannheim Germany GmbH (1996) S. 126-135.

Kong Y.Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis.

Nature 397: 315-23 (1999).

Koni P.A. & Flavell R.A. A role for tumor necrosis factor receptor type 1 in gut-associated lymphoid tissue development: genetic evidence of synergism with lymphotoxin β .

J. Exp. Med. 187: 1977-1983 (1998).

Korner H. & Sedgwick J.D. Tumor necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity.

Immunol. Cell. Biol. 74: 465-72 (1996).

Kraehenbuhl J.P. & Neutra M.R. Epithelial M cells: Differentiation and function.

Annu. Rev. Cell. Biol. 16: 301-332 (2000).

Kucharzik T., Lügering A., Lügering N., Rautenberg K., Linnepe M., Cichon C. et al. Characterization of M cell development during indomethacin-induced ileitis in rats.

Aliment. Pharmacol. Ther. 14: 247-256 (2000).

Kucharzik T., Lügering N., Pauels H.G. et al. IL 4, IL 10 and IL 13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells.

Clin. Exp. Immunol. 111: 152-157 (1998).

Laissue J.A., Chappuis B.B., Muller C., Reubi J.C. & Gebbers J.O. The intestinal immune system and its relation to disease.

Dig. Dis. 11: 298-312 (1993).

Laky K. et al. Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of $\gamma\delta$ T cells and Peyer's patches.

J. Exp. Med. 191: 1569-1580 (2000).

Macpherson A.J. et al. A primitive T-cell independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria.

Science 288: 2222-2226 (2000).

Madra J.L. Regulation of movement of solutes across tight junctions.

Annu. Rev. Physiol. 60: 143-159 (1998).

McCracken V.J. & Lorenz R.G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbacteria.

Cell. Microbiol. 3: 1-11 (2001).

Mestecky J., Lue C. & Russell M.W. Selective transport of IgA: Cellular and molecular aspects.

Gastroenterol Clin. North Am. 20: 441-71 (1991).

Nagler-Anderson C. & Shi H.N. Orally induced Peripheral nonresponsiveness to soluble protein antigens.

Crit. Rev. Immunol. 21: 121-132 (2001).

Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa.

Nat. Rev. Immunol. 1: 59-67 (2001).

Neutra M.R. & Kraehenbuhl J.P. Cellular and molecular basis for antigen transport in the intestinal epithelium.

Hrsg. P.L. Ogra, M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Mestecky, W. Strober und J. Bienenstock. Handbook of mucosal immunology. Academic Press., Inc. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. Seite 27-39 (1994).

Neutra M.R., Frey A. & Kraehenbuhl J.P. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization.

Cell. 86: 345-348 (1996).

Neutra M.R., Pringault E. & Kraehenbuhl J.P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses.

Annu. Rev. Immunol. 14: 275-300 (1996).

Nicoletti C. Unsolved mysteries of intestinal M cells.

Gut 47: 735-9 (2000).

Owen R.L. & Bhalla D.K. Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites in rat and mouse Peyer's patch M cells.

Am. J. Anat. 168: 199-212 (1983).

Owen R.L. & Jones A.L. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles.

Gastroenterology 66: 189-203. (1974).

Owen R.L. M-Cells Entryways of opportunity for Enteropathogens.

J. Ex. Med. 180: 7-9 (1994).

Ozinsky A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by innate immune system is defined by cooperation by Toll-like receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 97: 13766-13771 (2000).

Pabst R. Nachweis, Funktion und Charakterisierung von M-Zellen in den Tonsillen

MHH Forschungsbericht. Seite 5-8 (1995).

Podolsky D.K. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defence and repair: the best offense is a good defense.

Am. J. Physiol. 277: G495-G499 (1999).

Rautenberg K., Chinon C., Heyer G., Demel M. & Schmidt M.A.

Immunocytochemical characterization of the follicle-associated epithelium of Peyer's patches: anti-Cytokeratin 8 antibody (clone 4.1.18) as molecular marker for rat M cells.

Eur. J. Cell Biol. 71: 361-370 (1997).

Read S., Malmstrom V. & Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation.

J. Exp. Med. 192: 295-302 (2000).

Renz-Polster H. & Braun J.: Dünn- und Dickdarm.

In H. Renz-Polster, J. Braun (Hrsg): Basislehrbuch Innere Medizin, 1. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena (2000) S.573-581.

Rescigno M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.

Nature Immunol. 2: 361-367 (2001).

Robinson J.K., Blanchard T.G., Levine A.D., Emancipator S.N. & Lamm, M.E. A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo.

J. Immunol. 166: 3688-3692 (2001).

Sartor R.B. New therapeutic approaches to Crohn's disease.

N. Engl. J. Med. 342: 1664-1666 (2000).

Satoh H., Guth P., Grossman M.I. Role of bacteria in gastric ulceration produced by indomethacin in the rat: Cytoprotective action of antibiotics.

Gastroenterology 84: 483-489 (1983).

Savidge T.C. & Smith M.W. Evidence that membranous (M) cell genesis is immunoregulated.

Adv. Exp. Med. Biol. 371: 239-241 (1995).

Savidge T.C., Smith M.W., James P.S. A confocal microscopical analysis of Peyer's patch membranous (M) cell and lymphocyte interactions in the scid mouse.

Adv Exp Med Biol. 371A: 243-5 (1995).

Savidge T.C., Smith M.W., James P.S. Evidence that membranous (M) cells do not originate as a separate cell lineage from mouse intestinal stem cells.

J. Physiol. 446: 294P (1992).

Schmit A., Van Gossum A., Carol M., Houben J.J., Mascart F. Diversion of intestinal flow decreases the numbers of interleukin 4 secreting and interferon gamma secreting T lymphocytes in small bowel mucosa.

Gut 46(1): 40-45 (2000)

Schmidt G.H., Wilkinson M.M., Ponder B.A.J. Cell migration pathway in the intestinal epithelium: an *in situ* marker system using mouse aggregation chimeras.

Cell 40: 425-429 (1985).

Schuerer-Maly C.C., Eckmann L., Kagnoff M.F. et al. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation of inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide.
 Immunology 81: 85-91 (1994).

Schulte R., Kerneis S., Klinke S., Bartels H., Preger S. et al. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta 1 integrins apically expressed on M-like cells.
 Cell. Microbiol. 2: 59-68 (2000).

Shevahn E.M. Certified professional: CD4+CD25+ suppressor cells.
 J. Exp. Med. 193: F41-F45 (2001).

Siebers A. & Finnlay B.B. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections.
 Trends Microbiol. 4: 22-29 (1996).

Sierro F., Pringault E., Simon-Assman P., Kraehenbuhl J.P., Debard N. Transient expression of M cell phenotype by enterocyte-like cells of the follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patches.
 Gastroenterology 119 (3): (2000).

Smith M.W., James P.S., Tivey D.R. M cell number increases after transfer of SPF mice to a normal animal house environment.
 Am J. Pathol 128: 385-389 (1987).

Spahn T.W. et al. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches.
 Eur. J. Immunol. 31: 1278-1287 (2001).

Sträter J., Wellish I., Riedel S. et al. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis.
 Gastroenterology 113: 160-167 (1997).

Strober W., Nakamura K. & Kitani A. The SAMPI/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory disease.
 J. Clin. Invest. 107: 667-779 (2001).

Suzuki K. et al. Gut cryptopatches: direct evidence for extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis.
 Immunity 13: 691-702 (2000).

Thorstenson K.M. & Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4+ T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen.

J. Immunol. 167: 188-195 (2001).

Tonkonogy S.L. & Swain S.L. Distinct lymphokine production by CD4+ T cells isolated from mucosal and systemic lymphoid organs.

Immunology 80(4): 574-580 (1993).

Trier J.S. Structure and function of intestinal M cells Gastroenterol.

Clin North Am. 20: 531-547 (1991).

Van der Ven I. & T. Sminia. The development and structure of mouse nasal-associated lymphoid tissue: an immuno- and enzyme-histochemical study.

Reg. Immunol. 5: 69-75 (1993).

Yamada T., Deitch E., Specian R.D. et al. Mechanisms of acute und chronic intestinal inflamation induced by indomethacin.

Inflammation 6: 641-662 (1993).

Yamanaka T., Straumfors A., Craig Morton H., Fausa O., Brandtzaeg P., Farstad I.N. M cell pockets of humanpeyer's patches are specialized extensions of germinal centers.

Eur. J. Immunol. 31: 107-117 (2001).

Zinkernagel R.M. Grundlagen der Immunologie.

In: Kayser F., Bienz A., Eckert J, Zinkernagel R. (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie, 9. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York (1998). S. 43-131

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch das Ileum mit Schleimhautzotten und Lymphfollikeln, welche in der Submucosa als organisierte Peyer'sche Plaques auftreten.	19
Abbildung 2: Beispiel einer Vier-Felder-Tafel	54
Abbildung 3: Immunhistochemie mit Anti-Cytokeratin-8, Negativbilder.	57
Abbildung 4: Kinetik der M-Zell Formation.	58
Abbildung 5 (links) und Abbildung 6 (rechts): Elektronenmikroskopische Aufnahmen von M-Zellen.	60
Abbildung 7: Mit FITC immunhistochemisch markierte B-Zellen unter dem mit Texas Red markierten AP des FAE.	61
Abbildung 8: Mit FITC markierte CD4 positive Lymphozyten unter dem mit Texas Red markierten AP des FAE.	62
Abbildung 9: Mit FITC markierte TCR $\alpha\beta$ positive T-Lymphozyten unter dem mit Texas Red AP markierten FAE.	62
Abbildung 10: AP Färbung mit Texas Red und FITC Färbung von CD11b positiven Zellen.	63
Abbildung 11: Überblick über die Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen bei Ratten mit chronischer Ileitis.	66
Abbildung 12: Übersicht über die verschiedenen Assoziationen einen Tag und 3 Tage nach Induktion einer akuten Ileitis.	67
Abbildung 13: pIL4 Konstrukt im pGEM Plasmid	68
Abbildung 14: Ergebnis der Gel-Elektrophorese der IL4 PCR.	69
Abbildung 15: FITC <i>In Situ</i> Hybridisierung mit IL4 RNA Sonde.	70

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Floer
Vorname: Werner Martin
Geburtsdatum / -ort: 1. Januar 1977, Hannover
Anschrift: Schäferweg 3
48565 Steinfurt
Tel.: 02551 - 5301
Familienstand: ledig
Vater: Dr. med. vet. Werner Floer, Fachtierarzt für
Mikrobiologie
Mutter: Birgitt Floer-Marx, Angestellte

Schulbildung:

08/1983 – 06/1987 Grundschule Beckedorf
08/1987 – 07/1996 Gymnasium Arnoldinum Burgsteinfurt
Leistungskurse: Biologie, Sozialwissenschaften
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

10/1996 – 02/2002 Westfälische Wilhelms-Universität Münster:
Studiengang Humanmedizin
08/1998 Ärztliche Vorprüfung
08/1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/1999 – 08/2001 Famulaturen in den Fächern Gastroenterologie
(10 Wochen), Endokrinologie (4 Wochen)
Unfallchirurgie (5 Wochen), Gynäkologie
(2 Wochen)
08/1999-02/2002 Tätigkeit am Institut für Anatomie der Universität
Münster als studentischer Tutor im Kurs der

	makroskopischen Anatomie (Direktor: Prof. Dr. F. Pera)
10/2001 – 02/2002	Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für allgemeine Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. N. Senninger)
02/2002-06/2002	Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für Neurologie (Direktor: Prof. Dr. E.B. Ringelstein)
06/2002-09/2002	Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik und Poliklinik B, Station 12B Ost (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Domschke)
12/2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12/2002	Approbation
12/1998-09/2002	Promotion unter der Anleitung von Herrn OA PD Dr. Kucharzik und Dr. A. Lügering: Über die Assoziation von Lymphozyten an M-Zellen und deren Kinetik im Tiermodell der akuten und chronischen Ileitis.
1.1. 2003	AiP an der Uniklinik Münster in der Medizinischen Klinik und Poliklinik B (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W Domschke)

10. Danksagung

Ich danke Herrn OA Privatdozent Dr. med T. Kucharzik und Herrn Dr. med A. Lügering für die Überlassung des Themas und für die mannigfaltige Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. K. Rautenberg für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Anhang: Tierversuchsgenehmigung



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Herrn
PD Dr. med. Torsten Kucharzik
Medizinische Klinik /
Poliklinik B (GMI) des
Universitätsklinikums Münster
Domagkstr. 3A/UG

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers
Aktenzeichen
50.0835.1.0 (G 6/99)

48149 Münster

29. Juni 2001

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren
Tierversuch G 6/99:
"Charakterisierung mukosaler Immunantworten
im Indomethacin-induzierten Ileitis-Modell
der Ratte"

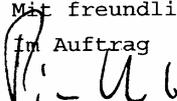
Bezug: - Antrag des Herrn Dr. med. Thomas W. Spahn vom 05.
04.2001, hier eingegangen am 09.04.2001
- Mein Genehmigungsbescheid vom 14.06.1999 - Az.: 23.
0835.1.0 (G 6/99)

Sehr geehrter Herr Dr. Kucharzik,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) stimme ich der Erweiterung des o.a. Versuchsvorhabens um 42 Wistar-Ratten zu.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag


Dr. Piontkowski

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de p X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle p Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz