

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

In-vivo UNTERSUCHUNG DES
CD4⁺-T-ZELL-ZYTOKINMILIEUS IN DEN
KOMPARTIMENTEN VON HUMANEN *Colitis*
ulcerosa UND *Morbus Crohn* LYMPHKNOTEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

– AUS DER SEKTION MEDIZIN –

VORGELEGT VON
DAVID BENJAMIN ELLEBRECHT
AUS LÜBECK

LÜBECK 2012

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Lübeck, den 25. Oktober 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Farke

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2013
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.04.2013
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Pathophysiologie der CED	3
1.2	Zielsetzung	8
2	Methodik	9
2.1	Auswahl des Patientenkollektivs	9
2.2	Versuchsablauf	9
2.3	Probenentnahme	11
2.4	Kryosektion	11
2.5	Immunhistochemische Färbungen	12
2.6	Laser-Mikrodissektion	13
2.7	mRNA-Isolierung	15
2.8	cDNA-Synthese	15
2.9	Quantitative real-time RT-PCR	16
2.10	Verwendete Software	17
2.11	Datenauswertung	17
3	Ergebnisse	19
3.1	Patientenkollektiv	19
3.2	Nicht-autoreaktive Lymphknoten	20
3.3	Autoreaktive Lymphknoten von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten	30
4	Diskussion	36
4.1	Humane nicht-autoreaktive Lymphknoten zeigen in-vivo keine morphologische oder funktionelle Alteration	36
4.2	Das in-vivo IL-4 dominierte Zytokinmilieu von Colitis ulcerosa Lymphknoten deutet auf den Verlust der peripheren Toleranz hin	38
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	44

Inhaltsverzeichnis

7	Abbildungsverzeichnis	51
8	Tabellenverzeichnis	52
A	Abbkürzungsverzeichnis	53
B	Materialien	56
C	Rohdaten	61
D	Ethikantrag	67
E	Danksagung	75
F	Lebenslauf	76

1. Einleitung

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC), resultieren aus einer idiopathischen unkontrollierten Immunantwort in der Lamina mucosa der Darmwand und führen langfristig zu irreversiblen Schäden und Funktionseinschränkungen des Gastrointestinaltrakts [1, 2]. Die Inzidenz liegt in Amerika und Europa für CU bei 2,2 - 14,3/100.000 und für MC bei 3,3 - 14,6/100.000 Einwohnern [3, 4, 5]. Der Erkrankungsgipfel liegt bei beiden Erkrankungen zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr. Hierbei treten 10% aller Neuerkrankungen vor dem 18. Lebensjahr auf. Zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr ist ein zweiter, weniger ausgeprägter Erkrankungsgipfel zu verzeichnen. Die Erkrankung an CU bzw. MC bedeutet für die Patienten gravierende Einschnitte in der Lebensqualität. Daten aus den USA zeigen, dass die CED für 700.000 Arztbesuche und 100.000 Krankenhausaufenthalte pro Jahr verantwortlich sind. Bis zu 33% der CU-Patienten benötigen in ihrem Leben chirurgische Interventionen aufgrund von Komplikationen. Im Falle von MC beträgt diese Zahl sogar 75% (Tabelle 1) [6].

CU ist eine nur die Lamina mucosa betreffende Entzündung, die sich kontinuierlich vom Rektum nach oral im Kolon ausbreitet. Histologisch zeigen sich mikroskopisch in der Mukosa und Submukosa Kryptenabszesse, Becherzellverlust sowie im Spätstadium Schleimhautatrophien (Abbildung 1A) [4, 5, 7]. Diese Epitheldysplasien können Ausgangspunkt eines Kolonkarzinoms sein, dessen Entstehungsrisiko mit dem Ausmaß der Kolonbeteiligung und der Dauer der Erkrankung korreliert (Tabelle 1) [4, 5].

MC ist eine diskontinuierliche segmental auftretende Entzündung des Gastrointestinaltrakts, die alle Darmwandschichten sowie jeden Abschnitt des Gastrointestinaltrakts betreffen kann. Histologisch zeigt MC charakteristische segmentale diskontinuierliche Befälle (skip lesions) mit zwischen geschalteten unveränderten Darmstücken, aphtoiden Läsionen, landkartenartigen Ulzera sowie ein Pflastersteinrelief (cobble - stone pattern) der Darmschleimhaut (Abbildung 1B und Tabelle 1) [4, 5, 7].

Therapeutisch werden die CED mit Hilfe von immunsupprimierenden Medikamenten wie Mesalazin (5-ASA), Kortikosteroiden sowie mit Azathioprin, Infliximab und Ciclosporin A angegangen [4, 8, 9, 10]. Die chirurgische Therapie wird bei Komplikationen angewendet [4, 5].

Die Pathogenese von CED ist ein multifaktorieller Prozess. Neben genetischen Faktoren und Umweltfaktoren spielen vor allem die immunologischen Prozesse eine wichtige

1. Einleitung

Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [1, 2, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Schon in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde über das familiär gehäufte Auftreten von CED berichtet [2, 11]. Eine positive Familienanamnese gilt bis heute als größter Risikofaktor für die Entstehung von CU und MC. Skandinavische und amerikanische Studien konnten zeigen, dass die CED besonders in den Herbst- und Wintermonaten auftreten. Eine weitere wichtige Rolle in der Entstehung von CED spielt ebenfalls der Lebensstil. So kann Nikotinabusus protektiv gegen Colitis ulcerosa wirken, aber die Entstehung von Morbus Crohn fördern [11].

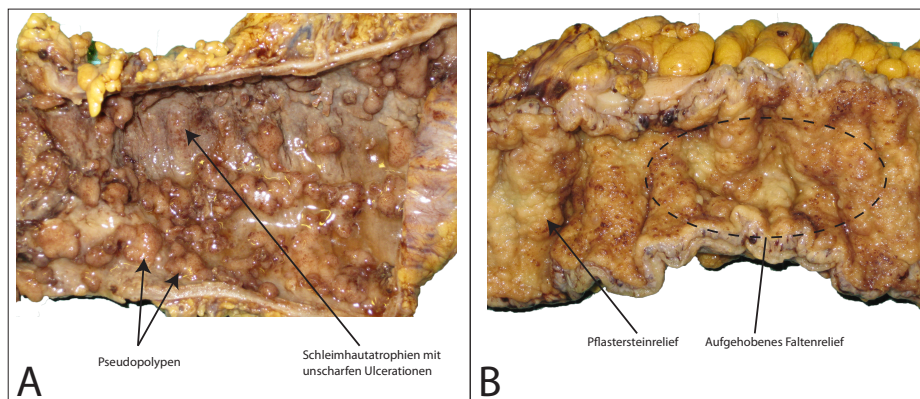


Abbildung 1.: **Operationspräparate von CU- und MC-Patienten.**

A: Das makroskopische Operationspräparat zeigt die für CU typischen unscharfen Ulcerationen und Pseudopolyphen.

B: Auf dem Operationspräparat eines an MC erkrankten Patienten erkennt man das segmental aufgehobene Faltenrelief sowie die deutliche Architektur- störung der Schleimhaut mit Ausbildung eines Pflastersteinreliefs.

Während sich viele Arbeiten mit den Folgen der pathophysiologischen Immunreaktion, d.h. der Entzündungsreaktion des adaptiven Immunsystems in der Mukosa, beschäftigen, sind die Zytokine als Botenstoffe der Immunzellen in den mesenterialen Lymphknoten (mLK) bislang nur wenig erforscht. Die vorliegende Arbeit untersucht aus diesen Gründen die pathogenetisch relevanten Lymphknoten von CED-Patienten. Da bislang nur wenige Untersuchungen über das Zytokinmilieu in menschlichen Lymphknoten vorliegen, werden zunächst mesenteriale mit nicht-mesenterialen Lymphknoten verglichen, worauf der Vergleich von mesenterialen nicht-autoreaktiven sowie CED-Lymphknoten erfolgt. Dies soll einen Beitrag leisten, das Muster des Zytokinmilieus in der Pathophysiologie der CED besser zu verstehen. Um die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit zu legen, werden das intestinale Immunsystem unter Betonung der Pathophysiologie der CED vorgestellt, um abschließend die Fragestellung dieser Arbeit einzuleiten.

1. Einleitung

Tabelle 1.: **Charakteristika der CED**

	<i>Colitis ulcerosa</i>	<i>Morbus Crohn</i>
<i>Lokalisation</i>	auf das Kolon beschränkt	gesamter Gastrointestinaltrakt (v.a. terminales Ileum und Kolon decedens)
<i>Endoskopischer Befund</i>	kontinuierlich fortschreitende Entzündung; unscharf begrenzte, flache Ulzerationen; Pseudopolypen	diskontinuierliche Entzündung (skip lesions); scharf begrenzte, tiefe Ulzerationen; Pflastersteinrelief
<i>Histologie</i>	Mukosa und Submukosa; Kryptenabszesse; entzündliches Infiltrat in der Lamina propria	transmuraler Befall; Epitheloidzellgranulome; entzündliches Infiltrat in der Darmwand
<i>Klinik</i>	oft akuter Beginn; Verlauf in Schüben; teilweise vollständige Remission	oft schleichender Beginn; Verlauf in Schüben mit inkompletter Remission
<i>Komplikationen</i>	toxisches Megacolon; schwere Blutungen; Kolonkarzinom	Fisteln; Stenosen; Abszesse; Strikturen
<i>Therapie</i>	Mesalazin (5-ASA); Glukokortikoide; Azathioprin/6-Mercaptopurin; Ciclosporin; Proktokolektomie	Mesalazin (5-ASA); Glukokortikoide; Azathioprin/6-Mercaptopurin; Ciclosporin; TNF- α -Antikörper

1.1. Die Pathophysiologie der CED

Die Auseinandersetzung des Organismus mit dem immensen Antigen-Reservoir aus Darmflora und Nahrungsbestandteilen erfordert einerseits eine Toleranzentwicklung und andererseits muss der Organismus in der Lage sein, auf Pathogene mit einer effektiven antikörper- und zellvermittelten Immunreaktion zu antworten. Daher gilt das intestinale Immunsystem als das größte Immunsystem des menschlichen Organismus und enthält mehr als die Hälfte aller lymphatischen Zellen und ca. 80% aller immunglobulinproduzierenden Zellen [17, 18]. In diesem komplexen Netzwerk bilden die Darmmukosa und mesenterialen Lymphknoten ein Wechselspiel zwischen angeborener und adaptiver Immunität, durch das die Integrität des menschlichen Organismus gewährleistet wird (Abbildung 2). Im Fall der CED kann durch das komplexe Zusammenwirken von genetischer Prädisposition, Umwelteinflüssen, Veränderungen der intestinalen Darmflora und immunologischen Faktoren diese Balance nicht aufrecht gehalten werden [6, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

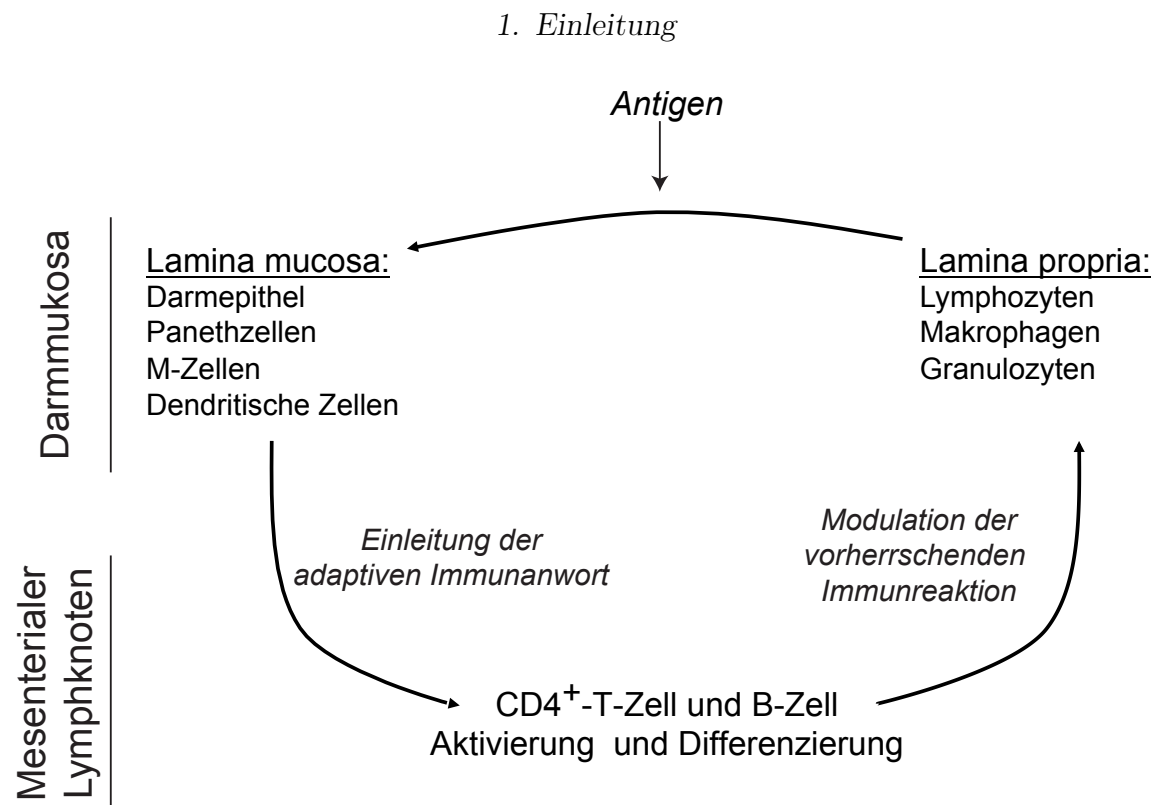


Abbildung 2.: **Feedbacksystem des intestinalen Immunsystems.** Ein eindringendes Antigen stimuliert die Zellen des angeborenen Immunsystems in der Darmmukosa. Über dendritische Zellen wird die $CD4^+$ -T-Zell- und B-Zell-Aktivierung und Differenzierung in den Kompartimenten der mesenterialen Lymphknoten initiiert. Die aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen wandern aus dem mesenterialen Lymphknoten in die Darmmukosa ein und modulieren über die sezernierten Zytokine das dort vorherrschende Immunmilieu.

Veränderungen im Bereich der Darmmukosa

Das intestinale Epithel spielt eine entscheidende Rolle in der Barrierefunktion des Gastrointestinaltrakts (GIT). Eine spezielle Glykokalyx verhindert zusammen mit einer sezernierten Mukusschicht die Adhäsionen der Bakterien an der Darmwand [17]. Durch die Resistenz ihrer Tight Junctions sind die Darmepithelzellen in der Lage den parazellulären Antigentransport zu regulieren [19]. Spezialisierte Epithelzellen (M-Zellen) sind die physiologischen Lücken der epithelialen Barriere [50]. Durch Aufnahme und lysosomale bzw. transzytische Prozessierung von Antigenen können diese im Bereich von Peyer Plaques und isolierten lymphatischen Follikeln T-Lymphozyten aktivieren [18, 19, 20]. Zusätzlich sind Panethzellen in der Lage Defensine, die ein Wirkspektrum gegen gram^+ und gram^- Bakterien, Pilze, Viren sowie Protozoen besitzen, zu sezernieren [17, 18, 20].

Patienten, die an CED erkrankt sind, zeigen eine Störung der Mukusschicht mit verminderter Sezernierung von Defensinen und eine Dysregulation der Tight-Junctions

1. Einleitung

mit der Folge der gesteigerten Permeabilität der Darmmukosa [21, 17]. Durch die Genmutationen von Toll-like-Rezeptoren und intrazellulären Nukleotid-Bindungsregionen (NOD) werden die proinflammatorischen Zytokine von Monozyten und Makrophagen gesteigert sezerniert [2, 11]. Zusätzlich konnte eine Veränderung der Darmflora nachgewiesen werden [3, 11, 13], die in einer verstärkten mukosomalen Immunreaktion gegen die kommensale Darmflora resultiert [3]. Durch die erhöhte Antigenpräsenz in der Lamina propria mucosae entsteht durch die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems die mukosomale Entzündungsreaktion von CU und MC.

Ausbildung einer CD4⁺ T-Zell abhängigen Immunantwort in den mesenterialen Lymphknoten

Durch die erhöhte Antigenpräsenz in der Lamina propria mucosae werden Zellen des angeborenen Immunsystems und dendritische Zellen (DC) aktiviert (Abbildung 3 *Mukosa*). Die DC wandern in die mesenterialen Lymphknoten (mLK) ein und initiieren die CD4⁺-T-Zell abhängige Immunantwort [18, 22, 23, 24, 25]. Viele Studien zeigen hierbei im Menschen und im Tiermodell eine Dysregulation der CD4⁺-T-Zell spezifischen Zytokine [21]. Aktuell sind vier Populationen der CD4⁺-T-Zellen bekannt, die in der autoreaktiven Immunreaktion der CED beteiligt sind.

Das TH1-Lymphozyten Zytokinmilieu umfasst die Zytokine IL-12 und IFN- γ [10, 26, 27, 28, 29]. Die Differenzierung der proliferierenden T-Zellen zu TH1-Zellen erfolgt in der Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ , die von DC sezerniert werden. Diese Zytokine bewirken eine Aktivierung der JAK1-Stat4 Kinasen sowie eine Induktion des Transkriptionsfaktors T-bet, der die IFN- γ Synthese und die IL-12 Rezeptor Expression in diesen CD4⁺-T-Zellen stimuliert (Abbildung 3 *T-Zell-Zone*) [10, 25, 26, 28, 27, 30, 31]. TH1-Zellen unterstützen physiologisch die zelluläre Immunreaktion [26, 27, 28, 30]. Über die Aktivierung von Makrophagen führen sie im Falle der CED zur Zerstörung der Mukosa [21, 30, 32].

IL-4, IL-5 sowie IL-13 zählen zu den TH2-spezifischen Zytokinen. TH2-Lymphozyten führen über IL-4 und IL-13 zur Proliferation und Aktivierung von B-Lymphozyten. Durch IL-4 und IL-5 sind TH2-Zellen in der Lage, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen zu aktivieren und deren Degranulation zu induzieren (Abbildung 3 *Mukosa*) [26, 27, 28, 30]. IL-4 ist der Faktor, der am stärksten über die Aktivierung von Stat6 und der Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 zur TH2-T-Zell-Differenzierung der proliferierenden T-Zellen führt (Abbildung 3 *T-Zell-Zone*) [10, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 33, 34]. Im Fall der CED zeigt sich eine TH2-T-Zell vermittelte verminderte IgA- sowie verstärkte IgG-Sezernierung der B-Lymphozyten [35, 36, 37] sowie eine erhöhte Bereitschaft der eosinophilen Granulozyten zur Degranulation [18, 30].

In den letzten Jahren ist die Population der CD4⁺-T-Lymphozyten um die TH17-Zellen erweitert worden (Abbildung 3). Die Differenzierung zu TH17-Zellen erfolgt

1. Einleitung

schon früh im Rahmen der erworbenen Immunantwort. Diese Zellen sind in der Lage IL-17, IL-21 sowie IL-23, jedoch kein IL-4 und IFN- γ zu sezernieren. Ihre Differenzierung ist TGF- β , IL-6 und IL-23 abhängig [10, 32]. Neuere Daten weisen darauf hin, dass TH17-Zellen, die physiologisch an der Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze beteiligt sind [22, 30, 38], neben den TH1-T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunpathogenese der CED spielen [3, 18, 21, 32, 39].

Die vierte Gruppe der CD4⁺-T-Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen (Treg), die für die Kontrolle der Immunreaktion verantwortlich sind (Abbildung 3). Hierbei werden zwei Subpopulationen unterschieden. Die Population der natürlichen T-regulatorischen Zellen (nTreg), die schon während der Entwicklung im Thymus zu regulatorischen T-Zellen differenzieren, ist für die Selbsttoleranz verantwortlich. Die zweite Population von Treg-Zellen bilden die adaptiven regulatorischen T-Zellen (aTreg), die sich in den sekundär lymphatischen Organen aus naiven CD4⁺-T-Lymphozyten differenzieren [30, 10, 40] (Abbildung 3 *T-Zell-Zone*). Ihre Aufgabe besteht in der Kontrolle der Immunreaktion gegen die kommensale Bakterienflora und Gewebsantigene [41]. Sowohl in humanen Proben als auch im Tiermodell konnten Veränderungen im Treg-Zytokinmilieu in der Darmmukosa nachgewiesen werden, die die autoreaktive Entzündung unterstützen [12, 13, 42, 43, 44, 45].

Obwohl ein definiertes Pathogen, das zur fehlgeleiteten Immunreaktion der CED führt, nicht bekannt ist, stellen die mLK das Zentrum der pathophysiologischen Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen dar. Bisher liegen nur unzureichende Daten über das Zytokinmilieu in den Kompartimenten von humanen Lymphknoten von CED-Patienten vor.

Die Rolle der CD4⁺-T-Zell-Zytokine in der Pathophysiologie der CED ist nicht vollständig geklärt

Untersuchungen in der Darmmukosa (human und im Tierexperiment) deuten eine Störung des Gleichgewichtes zwischen anti- und proinflammatorischen Zytokinen an [46]. Hierbei zeigt sich ein heterogenes Bild der CD4⁺-T-Zell-Zytokinexpression in der Darmmukosa von CED-Patienten. Im Fall der CU beschrieben einige Arbeiten einen erhöhten IL-5 und IL-13 Spiegel in der Darmschleimhaut von erkrankten Patienten. Im Umkehrschluss konnte ein verminderter IL-4 Spiegel in den Darmschleimhautproben von MC-Patienten nachgewiesen werden [43, 47, 48]. Jedoch konnten die Ergebnisse nur zum Teil durch andere Arbeitsgruppen reproduziert werden [49]. Nach aktuellem Forschungsstand wird davon ausgegangen, dass MC sowohl durch TH1- als auch durch TH17-Zell-Zytokine aufrechterhalten wird. IL-23, das sich aus den zwei Untereinheiten IL-23p14 und IL-12p40 zusammensetzt, induziert in Anwesenheit von TGF- β und IL-6 die Differenzierung der naiven CD4⁺-T-Lymphozyten zu TH17-Zellen [16, 39, 48, 49, 50, 51]. Jedoch konnte ebenfalls eine verstärkte Expression von IL-

1. Einleitung

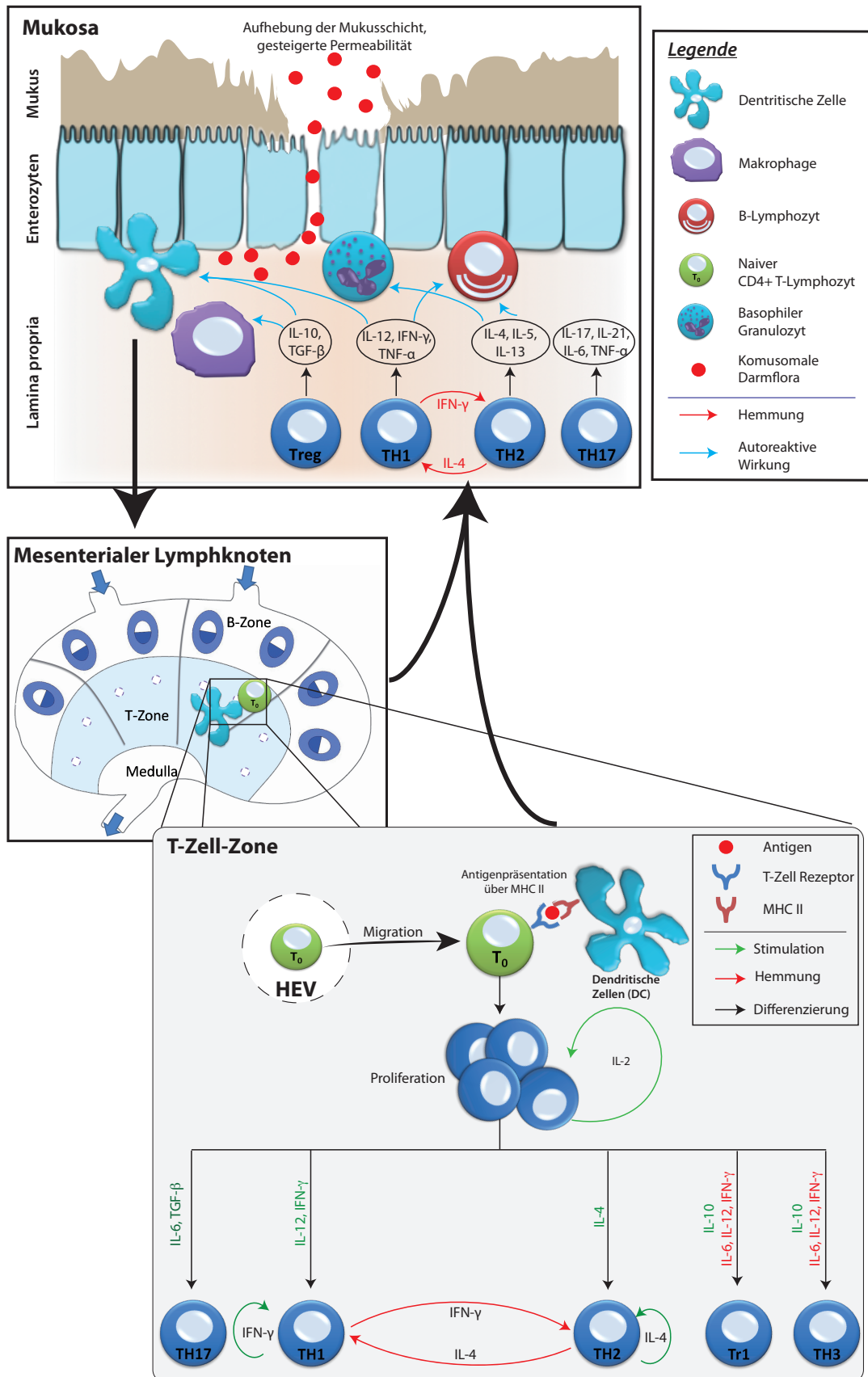


Abbildung 3.: Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Erläuterungen siehe Text.

1. Einleitung

17 in CU-Patienten nachgewiesen werden, so dass die Rolle der TH17-T-Zellen und ihrer Zytokine aktueller Bestandteil der Diskussion ist und weiterer Untersuchungen bedarf [3, 46]. Die Rolle des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, das die Antigen-Präsentation und die Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen inhibiert, ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. So wurde in MC-Patientenproben eine verminderte Expression von IL-10 nachgewiesen [52]. Im Gegenzug zeigen andere Untersuchungen einen verstärkten Nachweis von IL-10 in entzündeten Darmabschnitten von CU-Patienten [43].

Aufgrund der aktuell nur unzureichenden Erkenntnisse über das CD4⁺-T-Zytokinmilieu in der Pathophysiologie der CED kann die Untersuchung des Ursprungsorts - die mesenterialen Lymphknoten - neue Aufschlüsse über die Immunpathologie der CED liefern.

1.2. Zielsetzung

In dieser Dissertationsschrift werden nicht-autoreaktive mesenteriale Lymphknoten sowie nicht-mesenteriale Lymphknoten verglichen, um anschließend mesenteriale, lymphonodale Alterationen im CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieu von CED-Patienten identifizieren zu können. Hierdurch werden pathogenetisch relevante Veränderungen des CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieus in Lymphknoten von CED-Patienten erfasst, die Auswirkungen auf das Zytokinmilieu in der Mukosa haben können. Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Welches CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieu bildet sich in den Kompartimenten von humanen nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten aus?
2. Zeigt sich ein Unterschied zwischen nicht-autoreaktiven Lymphknoten mesenterialer und peripherer Lokalisation bezüglich der CD4⁺-T-Zell-Zytokinexpression sowie Morphologie?
3. Wie verändern sich die CD4⁺-T-Zell-Zytokinexpression und die Morphologie in den Lymphknotenkompartimenten im Falle von CU und MC?

2. Methodik

2.1. Auswahl des Patientenkollektivs

Für die vorliegende Studie wurden drei verschiedene Patientengruppen benötigt, um einerseits mesenteriale und periphere nicht-autoreaktive Lymphknoten und andererseits mesenteriale autoreaktive Lymphknoten von CED-Patienten immunhistochemisch sowie die Zytokinexpression auf mRNA-Ebene untersuchen zu können.

Die Experimente sind durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck nach berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten bewilligt worden (siehe Anhang D - Ethikantrag).

Die Auswahl des Patientenkollektivs erfolgte mit Hilfe der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums, Campus Lübeck. Für die mesenterialen gesunden Lymphknoten wurden Patienten mit der Diagnose rezidivierende Divertikulose coli sowie Colon elongatum ausgewählt. Als Vergleichsgruppe, d.h. mesenteriale autoreaktive Lymphknoten, die in den CED-Entzündungsprozess integriert sind, wurden Patienten ausgewählt, die an CU oder MC erkrankt waren. Die Gruppe der peripheren nicht-autoreaktiven Lymphknoten bildeten solche, die während Operationen der stenosierten Arteria carotis entfernt wurden, um das Gefäß freizupräparieren. Die Begutachtung und anschließende Freigabe der OP-Präparate erfolgte durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Bei der Auswahl des Patientenkollektivs wurde keine geschlechtsspezifische Unterscheidung gemacht.

Die Gesamtzahl der Patienten belief sich auf 23, wobei 9 weibliche und 14 männliche Patienten untersucht wurden. Die Anzahl der untersuchten mesenterialen Lymphknoten betrug 17; davon waren sechs mesenterial gesund und 11 mesenterial entzündet. Die Gruppe der peripheren Lymphknoten bestand aus sechs Präparaten.

2.2. Versuchsablauf

In den Versuchen wurden mit Hilfe von immunhistochemischen Proliferations- und T-Zell-Färbungen die Anzahl der proliferierenden Zellen in der T-Zell-Zone sowie B-Zell-Zone sowie die Kompartimentenflächen bestimmt. Außerdem wurden die CD4⁺-T-Zell-Zellmarker CD25, FoxP3 und RoR γ t, das T-Zell-Proliferationszytokin IL-2, die TH1-spezifischen Zytokine IL-12p40 und IFN- γ und TH2-spezifischen Zytokine IL-4

2. Methodik

und IL-5, IL-10 als Marker für regulatorische T-Zellen sowie IL-6 und IL-17 als TH17 spezifische Marker auf Basis der mRNA-Expression in der T-Zell-Zone, in der B-Zell-Zone und im Keimzentrum in den Lymphknoten untersucht (Abbildung 4).

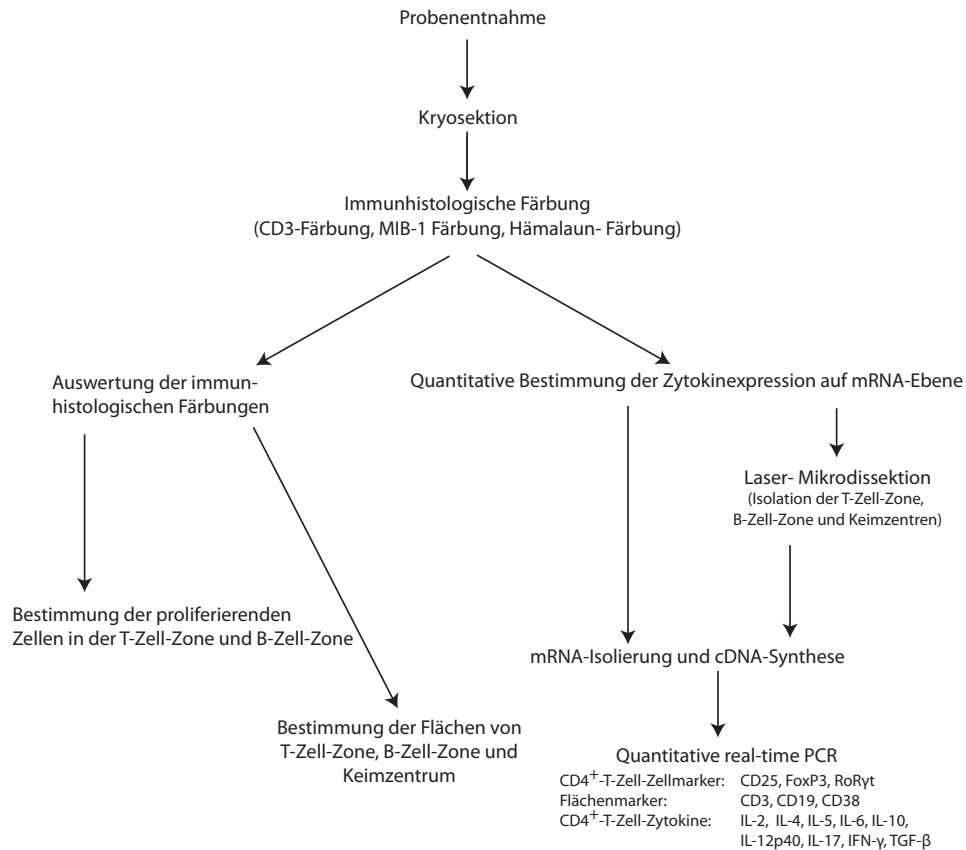


Abbildung 4.: **Versuchsablauf.** Nach dem Zuschneiden der Proben mit Hilfe der Kryosektion bei -20°C erfolgte die immunhistochemische Färbungen der Präparate. Hierdurch konnten die Proliferation in den Lymphknotenkompartimenten und die Lymphknoten- bzw. Keimzentrumsfläche bestimmt werden. Anschliessend wurden die CD4^{+} -T-Zell spezifische Zellmarker- und Zytokinexpression auf mRNA-Ebene durch die Laser-Mikrodissektion und real-time RT-PCR in den Kompartimenten und im gesamten Lymphknoten ermittelt.

Zusätzlich wurden zur besseren Charakterisierung der einzelnen Kompartimente die mRNA-Expression von CD3 (Marker für T-Lymphozyten), CD19 (Marker für B-Zellen) und CD38 (Marker für aktivierte B-Zellen) sowie von $\text{TGF-}\beta$ als Marker für Treg- und TH17 analysiert. Die Isolierung der T-Zell-Zone, der B-Zell-Zone sowie der Keimzentren der einzelnen Lymphknoten wurde mit Hilfe der Kryosektion und Laser-Mikrodissektion erreicht. Um die Expression der einzelnen Zytokine bewerten zu können, wurde die mRNA der jeweiligen Lymphknotenkompartimente isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Quantifizierung der cDNA wurde anschließend die quantitative real-time RT-PCR verwendet.

2.3. Probenentnahme

Das zu untersuchende Probenmaterial wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, von Patienten während Operationen - bei oben genannten Diagnosen - entnommen und durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, untersucht und freigegeben. Vor der Operation erfolgte die Aufklärung der Patienten in schriftlicher und mündlicher Form sowie deren schriftliche Einwilligung. Bei der Entnahme der mesenterialen Lymphknoten wurden die Drainage-Stationen des mesenterialen Lymphabflusses, d.h. Lnn. epiploici an der Darmwand präpariert und isoliert. Im Falle der entnommenen peripheren Lymphknoten handelt es sich um Lnn. cervicales. Bei der Entnahme wurde darauf geachtet, dass die Präparate weitgehend fettfrei waren und nicht gequetscht oder zerschnitten wurden. Die entnommenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff für den Transport tief gefroren, um die mRNA vor Schäden durch RNasen zu schützen. Bis zur weiteren Verarbeitung der Proben und Durchführung der Experimente blieben die Lymphknotenproben bei - 80°C tief gefroren.

2.4. Kryosektion

Die Kryosektion wurde mit dem Kryostat Jung CM 3000 der Firma Leica durchgeführt. Die Schnitttemperatur betrug -20°C. Nach Auswahl passender Probenschnitte und lichtmikroskopischer Begutachtung, wobei das ganze Organ auf der Schnittfläche sichtbar sein musste, wurden die Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von 14µm angefertigt. Die Schnittreihenfolge erfolgte wie in Abbildung 5 dargestellt. Die den gesamten Lymphknoten umfassenden Kryoschnitte wurden in 700µl RLT Puffer der Firma Analytik Jena AG bei -20°C eingefroren. Die Kryoschnitte für die Laser-Mikrodissektion wurden auf P.A.L.M. Membrane Slides, die zuvor 40 Minuten unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254nm vorbehandelt wurden, aufgezogen. Dabei wurden pro Membrane Slide immer 12-15 Kryoschnitte aufgebracht. Anschließend erfolgte die Toluidin-Blau Färbung der Kryoschnitte. Hierfür wurden die Membrane Slides mit den Kryoschnitten mit 75% Ethanol und 0,1% Diethyl-Pyrocyanat Wasser vorbehandelt. Die anschließende 10-minütige Färbung erfolgte mit 0,2% Toluidin-Blau-Lösung. Die Fixierung der Kryoschnitte geschah durch zweimaliges Eintauchen der Kryoschnitte für 30 Sekunden in 0,1% DEPC-Wasser sowie 100% Ethanol. Die gefärbten Kryoschnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tief gefroren.

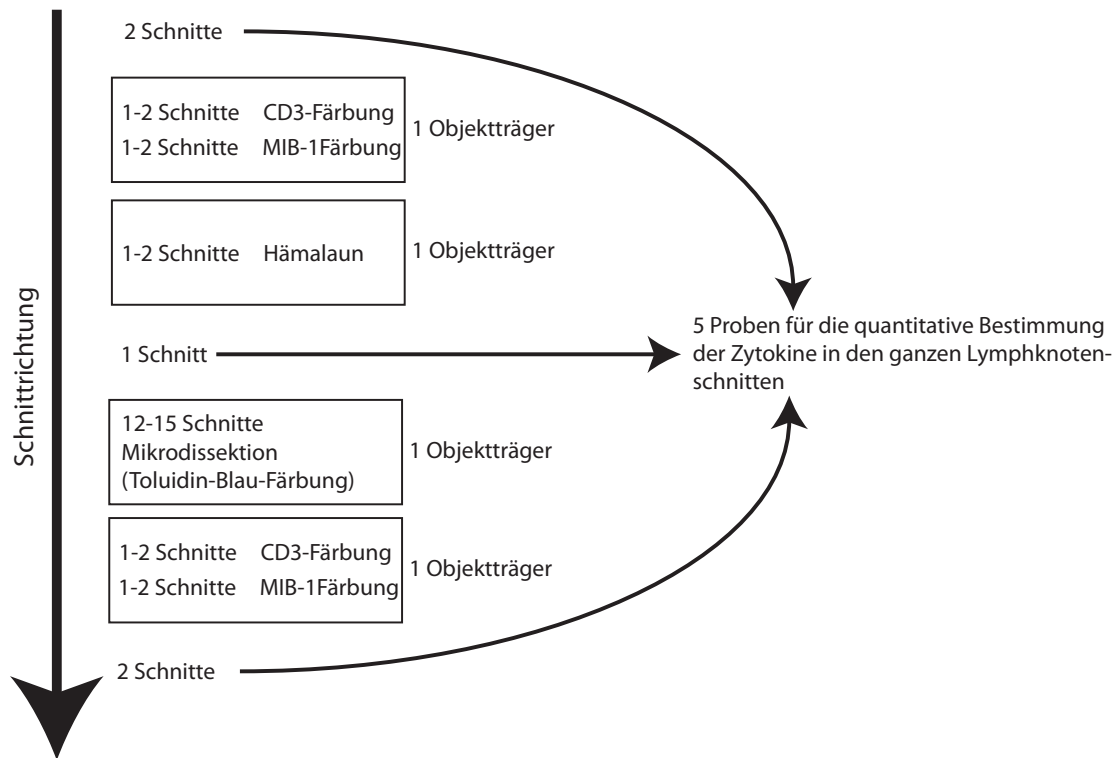


Abbildung 5.: **Kryosektion.** Die Lymphknoten wurden mit Hilfe der Kryosektion bei -20°C geschnitten. Um einen repräsentativen Überblick über den gesamten Lymphknoten zu erhalten, wurden zunächst zwei Schnitte in einen Eppendorf-Tube gefüllt. Anschließend erfolgten die Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen. Anschliessend wurde wieder ein Schnitt in das Eppendorf-Tube gefüllt. Nun erfolgten die Schnitte für die Mikrodisektion, die auf zuvor mit 40 Minuten unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254nm vorbehandelten P.A.L.M. Membrane Slides aufgezogen wurden. Abschliessend wurden wieder zwei Schnitte in das Eppendorf-Tube gefüllt.

2.5. Immunhistochemische Färbungen

Das verwendete immunhistologische Färbeprinzip beruht auf der APAAP-Methode (**A**lkalische-**P**hosphatase-**A**nti-**A**lkalische-**P**hosphatase), die spezifisch gebundene monoklonale Antikörper sichtbar macht. Hierdurch können CD3-Antikörper gegen T-Zellen blau und MIB-1 Antikörper gegen proliferierende Zellen rot angefärbt werden, indem über den Brückenantikörper RAM (Rabbit-Anti-Mouse Immunoglobulin) der Alkalisch-Phosphatase-Komplex an die primären Antikörper gegen CD3 und Ki-67 bindet und eine Substrat-Enzymreaktion die Anfärbung auslöst.

Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die Antikörper wurden in TBST sowie Fast Red und Fast Blue im APAAP-Substrat angesetzt.

2. Methodik

Tabelle 2.: **Antikörper der Immunhistochemie**

Abkürzung	Name	Hersteller
Anti CD3	Anti-Human CD3 Antikörper	DakoCytomatio Denmark A/S, Glostrup Dänemark
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase	
MIB-1	Anti-Human Ki-67 Antikörper	
RAM	Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin	

Die Färbeschritte sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Spülschritte mit TBS-T sowie die Färbungen wurden schüttelnd durchgeführt; die Inkubationen mit Antikörpern erfolgten in der dunklen Feuchtkammer.

Tabelle 3.: **Immunhistochemische Färbungen**

	Arbeitsschritt	Reagenzien	Inkubationszeit
1	Vorinkubation	TBS-T	2 x 5min.
2	Primärinkubation	CD3 Antikörper 1:500 MIB-1 Antikörper 1:500	1 Stunde
3	Spülen	TBS-T	2 x 5min.
4	Sekundärinkubation	RAM 1:500	30 min.
5	Spülen	TBS-T	2 x 5 min.
6	Tertiärinkubation	APAAP _{Maus} 1:50 (Tertiärinkubation wiederholen)	30 min.
7	Spülen	TBS-T	15 min.
8	Entwicklung	CD3 → Fast Blue MIB-1 → Fast Red	25 min.
9	Gegenfärbung	Hämalaun	20 Sek.

MIB-1 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen das Proliferationsantigen Ki-67 gerichtet ist und in der S, G1, G2 und M Phase, aber nicht in der G0 Phase des Zellzyklus exprimiert wird.

Die Auswertung der Proliferation in der T-Zell Zone und B-Zell-Zone erfolgte mit Hilfe des Leitz Laborlux 12 auf einer Fläche von 100 Kleinquadraten (entspricht $81.768 \mu\text{m}^2$ bei einer 400fachen Vergrößerung). Die Bestimmung der Flächen von T-Zell-Zone, B-Zell-Zone und Keimzentrum erfolgte computergestützt.

2.6. Laser-Mikrodissektion

Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion erfolgte die Isolierung der Lymphknoten - Kompartimente (Abbildung 6). Zur Vorbereitung wurden die Deckelinnenseiten der Mikro-

2. Methodik

dissektion - Tubes abgeschnitten und mit Öl benetzt. Die Mikrodissektion wurde bei 50facher Vergrößerung bzw. 100facher Vergrößerung durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Gesamtfläche von mindestens $800.000\mu\text{m}^2$ pro isoliertem Kompartiment und Probe erzielt wurde, um eine ausreichende Zahl von Zellen für die anschließende RNA-Isolierung zu gewinnen. Die isolierten Kompartimentproben wurden mit $350\mu\text{l}$ RLT-Puffer zur RNA-Isolierung versetzt, 1 Minute bei 500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend bei -20°C tief gefroren.

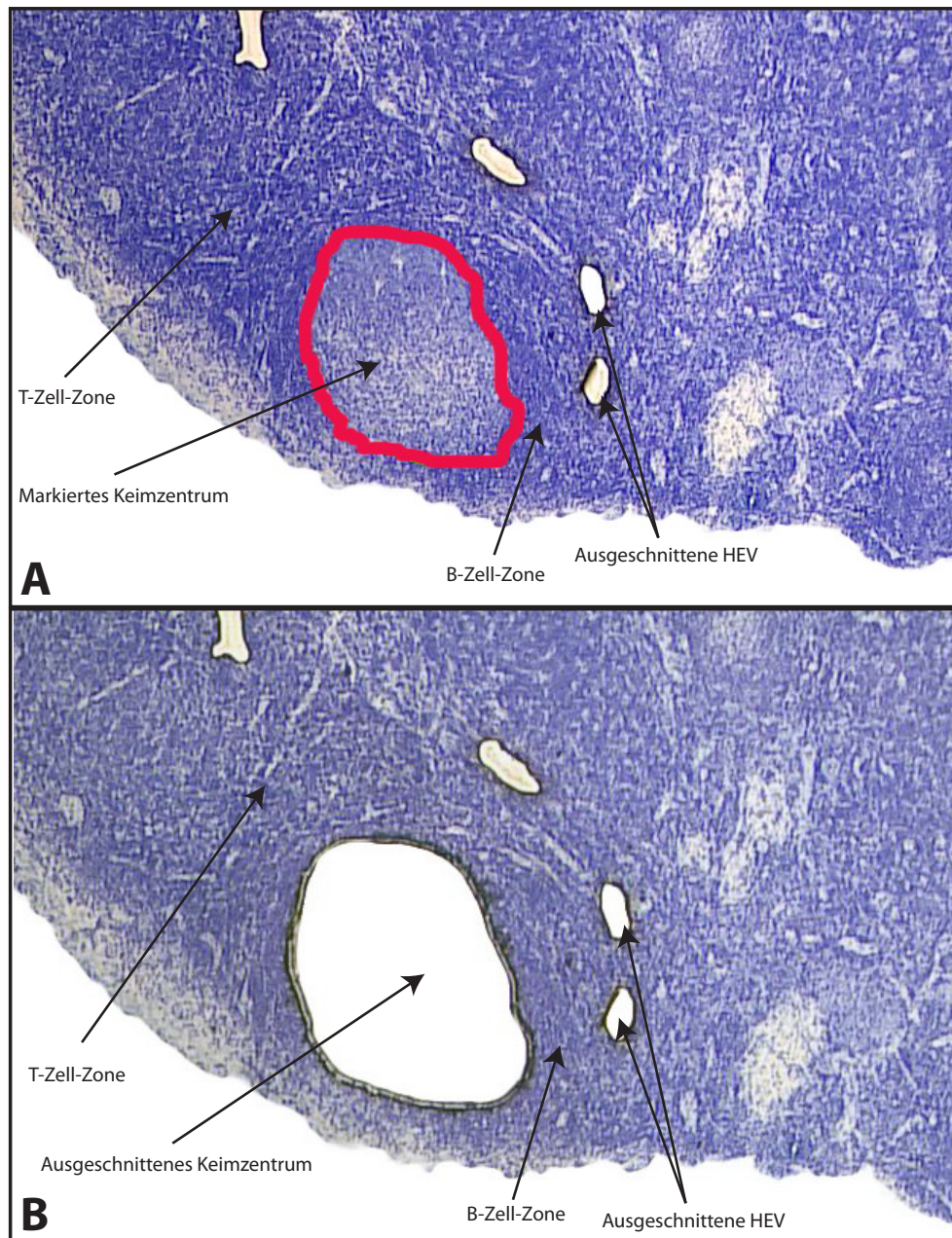


Abbildung 6.: **Laser-Mikrodissektion.** Computergestützt können die Kompartimente des Lymphknotens - hier ein Keimzentrum - markiert werden (A) und mittels eines Lasers aus der Probe ausgeschnitten werden (B) (Toluidin-Blau Färbung; 100fache Vergrößerung).

2.7. mRNA-Isolierung

Die mRNA-Isolierung wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit der Firma Analytik Jena AG durchgeführt. Die Proben der gesamten Lymphknotenschnitte und aus der Laser-Mikrodissektion wurden hierfür an der Luft aufgetaut, 1 Minute auf dem Rüttler gemischt, für 10 Sekunden anzentrifugiert und mit 350 μ l RLT-Puffer auf 700 μ l Probenvolumen aufpipettiert. Die gesamten Lymphknotenschnitte wurden zusätzlich 1:10 verdünnt, um die Säulenkapazität der innuPREP RNA Mini Kits nicht zu überlasten. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer 1ml Insulinspritze und einer 20 Gauge großen Kanüle durch zehnmaliges Aufziehen der Spritze geschert, um die Zellwände der Lymphozyten in den Proben zu zerstören. Zu den Proben wurde 700 μ l 70% Ethanol hinzupipettiert, um später für eine optimale Bindung der Wasch-Lösungen zu sorgen. Von den Proben wurden jeweils 700 μ l auf die Spin Filter pipettiert und bei 12.000 Umdrehungen pro Minute für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die restlichen 700 μ l der Probe auf die Spin Filter pipettiert und anschließend die Proben wieder bei 12.000 Umdrehungen pro Minute für zwei Minuten zentrifugiert. Das Waschen der mRNA erfolgte durch die Zugabe von 500 μ l Washing Solution HS, anschließendes einminütiges Zentrifugieren bei 8.000 Umdrehungen pro Minute und Zugabe von 700 μ l Washing Solution LS und Zentrifugation mit 8.000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute. Das Eluieren der mRNA erfolgte mit 60 μ l RNase freiem Wasser, einminütiger Inkubation und Zentrifugation für eine Minute mit 8.000 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand nach der ersten Zentrifugation wurde wieder auf die Säule pipettiert, um eine 15 - 30% höhere Gesamt - RNA - Konzentration zu erzielen. Nach einminütiger Inkubation erfolgte die letzte Zentrifugation für 60 Sekunden mit 8.000 Umdrehungen pro Minute. Abschließend wurden die Proben für 20 Minuten bei 60°C in dem Concentrator 5301 der Firma Eppendorf AG eingedampft.

2.8. cDNA-Synthese

Die eingedampften Proben wurden mit DEPC-Wasser auf 8 μ l aufgefüllt. Der anschließende DNase-I Verdauung erfolgte durch Hinzupipettieren von 1 μ l 10xDNase-Puffer und 1 μ l DNase-I-Enzym und einer Inkubation von 15 Minuten bei 20°C. Die DNase-I-Verdauung wurde durch Zugabe von 1,5 μ l Stop-Solution (1,5mM EDTA-Lösung) angehalten. Das anschließende zehnminütige Inkubieren bei 70°C diente dem Glätten des RNA-Knäuls. Die Proben wurden sofort auf Eis gekühlt, um die erneute Knäuelbildung der RNA zu verhindern. Das Umschreiben von RNA in cDNA resultierte durch die Zugabe von 0,5 μ l Reverse Transkriptase und 8 μ l cDNA-Mastermix (Tabelle 4) und einer Inkubation zuerst bei 25°C für zehn Minuten, das dem Andocken des Random-Primers dient, und danach bei 42°C für 50 Minuten.

Tabelle 4.: **cDNA-Mastermix Ansatz**

Reagenz	Menge
5x Puffer	4 μ l
0,1M DTT	2 μ l
Random Primer	1 μ l
dNTP	1 μ l

Die Reaktion wurde durch eine 15 minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Die Proben wurden nach erneutem Anzentrifugieren bei -20°C tiefgefroren.

2.9. Quantitative real-time RT-PCR

Die quantitative Bestimmung der Zytokine erfolgte sowohl in gesamten Lymphknotenschnitten als auch in den zuvor durch Laser-Mikrodissektion isolierten Kompartimenten der Lymphknoten. Das Gesamtvolumen betrug immer 20 μ l für die real-time RT-PCR. Der Reaktionsansatz war immer wie in Tabelle 5 angegeben:

Tabelle 5.: **real-time RT-PCR Ansatz**

Produkt	Volumen
cDNA Probe	1 μ l
Primer	2 μ l
2x SYBR-Green Mastermix	10 μ l
DEPC-Wasser	7 μ l

Für die präparative Generierung wurden entsprechend größere Reaktionsansätze für jedes Zytokin im untersuchten Kompartiment der Lymphknoten hergestellt. Es erfolgte aber zur Amplifikation die Aufteilung in Aliquots zu 20 μ l. Dabei wurden die 2 μ l Primer der Zytokine vorgelegt. Und die 18 μ l des restlichen Ansatzes nach Aliquotierung hinzugegeben. Die in den ganzen Lymphknotenschnitten und Lymphknotenkompartimenten untersuchten Zytokinen sind in Tabelle 6 zusammengestellt:

Tabelle 6.: **Untersuchte Zytokine**

Housekeeping-Gen:	CASC-3
CD4⁺-T-Zell-Zellmarker:	CD25, FoxP3, RoR γ t
Flächenmarker:	CD3, CD19, CD38
CD4⁺-T-Zell-Zytokine:	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IFN- γ , TGF- β

In diesen Versuchen wurde, wie in den Voruntersuchungen durch Kalies et al., das House-keeping Gen Cancer Candidate 3 (CASC-3) mitgeführt, um die Fluoreszenz-

2. Methodik

signale der einzelnen Zytokine und Zellmarker vergleichen zu können [23, 53]. Das Temperaturprogramm für die real-time RT-PCR ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7.: **Temperaturprogramm der real-time RT-PCR**

Programm	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	95°C	10 Min.
Amplifikation	50	95°C	45 Sek.
		60°C	1 Min.
Dissoziation	1	95°C	15 Sek.
		60°C	20 Sek.
		95°C	15 Sek.

Die Messung der Fluoreszenz des Amplifikationsprodukts erfolgte immer nach dem Ende des 2. Schrittes der Amplifikation.

2.10. Verwendete Software

Für die Auswertung wurde folgende Software verwendet:

- Microsoft Excel 2011 (Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Straße 1, 85716 Unterschleißheim, Deutschland)
- SPSS 17 (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606, USA)
- SigmaPlot 11 (Systat Software GmbH, Schimmelbuschstraße 25, D-40699 Erkrath)

Die Erstellung der Dissertation erfolgte mit:

- Microsoft Word 2011 (Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Straße 1, 85716 Unterschleißheim, Deutschland)
- L^AT_EX 2.0.4 (MiKTeX 2.9)

2.11. Datenauswertung

Für jedes untersuchte Kompartiment im einzelnen Lymphknoten wurden Doppelansätze bestimmt. Um eine Aussage über die quantitative Expression eines Zellmarkers

2. Methodik

bzw. Zytokins auf mRNA Ebene zu gewinnen, wurden die Kopien des geprüften Zytokins mit Hilfe folgender Formel ins Verhältnis zu einer Kopie des Housekeeping-Gens CASC-3 gesetzt:

$$\frac{Kopien_{Zytokin}}{Kopie_{CASC-3}} = 2^{-(C_{t;Zytokin} - C_{t;CASC-3})} [54]$$

CASC-3 ist ein Gen für ein Kern-Cytoplasma Transportprotein, das in allen Zellen des Körpers gleich stark exprimiert wird. Der Treshhold für die real-time PCR wurde bei 0,15 festgelegt. Falls Ct-Werte für CASC-3 über 34 und für die übrigen Zytokine über 40 lagen, wurden sie gestrichen und die Kopieanzahl auf null gesetzt.

Die statistische Auswertung der Proben einer Gruppe wurde mit dem Wilcoxon-Test vorgenommen; der Vergleich der Gruppen untereinander erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test. Bei der Durchführung der Versuche wurde darauf geachtet, dass die Probenentnahmen und Experimente unter gleichen Bedingungen abliefen. Zusätzlich wurde ein genaues Protokoll geführt, in dem die Versuchsschritte und Messergebnisse festgehalten wurden. Die Auswahl des Patientenkollektivs geschah geschlechtsunabhängig und nur unter den oben genannten Diagnosestellungen.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung sowie schriftlicher Einwilligung von 56 Patienten konnten von 23 Patienten die Lymphknoten aus den Operationspräparaten durch Ärzte des Instituts für Pathologie, UK-SH Campus Lübeck, entnommen werden. In den anderen Fällen gelang keine eindeutige Identifikation und Entnahme der Lymphknoten.

Im ersten Teil, der sich dem Vergleich mesenterialer und peripherer Lymphknoten widmet, wurden jeweils sechs mesenteriale (mLK) und sechs periphere (pLK), nicht-autoreaktive Lymphknoten untersucht. Im zweiten Teil wurden die mLK als Kontrollgruppe sechs bzw. fünf Lymphknoten von Patienten, die an Colitis ulcerosa (CU) bzw. Morbus Crohn (MC) erkrankt waren, gegenübergestellt. Die entnommenen Lymphknoten stammten im Falle der mLK aus dem Colon descendens und sigmoideum. Die CU-Lymphknoten waren aus Operationspräparaten des gesamten Kolons im Rahmen einer restaurativen Proktokolektomie entnommen worden. Zwei Proben stammten zusätzlich aus dem Caecum. Die Lymphknotenproben der MC-Gruppe waren im terminalen Ileum und im Colon descendens lokalisiert. Die pLK stammten aus cervicalen Operationspräparaten. Die Ischämiezeit, d.h. die Zeit von der Präparatentnahme bis zur Kältefixierung, betrug durchschnittlich 40 ± 2 Minuten.

Geschlechts- und Altersverteilung

Die Geschlechts- und Altersverteilung ist in Tabelle 8 dargestellt. In der Altersverteilung zeigen sich deutliche Unterschiede in den vier untersuchten Gruppen. Die nicht-autoreaktiven pLK stammen aus Operationspräparaten von deutlich älteren Patienten als in der Vergleichsgruppe der nicht-autoreaktiven mLK. Die Patienten, die aufgrund einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung operiert wurden, sind nochmals deutlich jünger. Hierbei liegt das durchschnittliche Alter zum Operationszeitpunkt bei CU bei 46 Lebensjahren und MC bei 39 Lebensjahren.

Tabelle 8.: Geschlechts- und Altersverteilung des Patientenkollektivs

		Männlich	Weiblich	Gesamt	Alter zum Operationszeitpunkt [Jahre]
Gesund	<i>mLK</i>	2	4	6	64 ± 15
	<i>pLK</i>	4	2	6	73 ± 8
Erkrankt	<i>CU</i>	4	2	6	46 ± 16 *
	<i>MC</i>	4	1	5	39 ± 6 *

* signifikante Abweichung bezogen auf nicht-autoreaktive mesenteriale Lymphknoten (mLK) $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test).

3.2. Nicht-autoreaktive Lymphknoten

Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit sollen die nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten in ihrem histologischen Erscheinungsbild und in ihrer Zytokinexpression analysiert und cervicalen (peripheren) Lymphknoten gegenübergestellt werden. Da diese Lymphknoten nicht in eine auto-reaktive Immunantwort involviert sind, wird durch ihre Charakterisierung eine Kontrollgruppe definiert. Anhand dieser Kontrollgruppe lassen sich pathogenetisch relevante Alterationen in den CED-Lymphknoten(s. Abschnitt 3.3) spezifisch analysieren.

Die Zellproliferationsdichte zeigt keinen Unterschied zwischen humanen nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten

Die T-Zell- und B-Zell-Zonen stellen den Ursprung der adaptiven Immunantwort im Lymphknoten dar. Der Aktivitätszustand dieser beiden Kompartimente wurde durch Quantifizierung der proliferierenden Zellen identifiziert. Dies erfolgte mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 (Abbildung 7 A und B). Die CD3-T-Zell-Färbung ermöglichte die Identifikation der einzelnen Kompartimente (Abbildung 7 C und D).

Die T-Zell-Zone weist in den nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten verglichen mit der B-Zell-Zone pro Flächeneinheit eine deutlich höhere Anzahl an proliferierenden Zellen auf (Abbildung 8). Hierbei zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der proliferierenden Zellen ohne Ausbildung von Proliferationszentren. Im Vergleich zu den Lymphknoten anderer Lokalisation (cervicale Lymphknoten; pLK) zeigt sich eine vergleichbare Proliferationsdichte in beiden Kompartimenten (Abbildung 8).

3. Ergebnisse

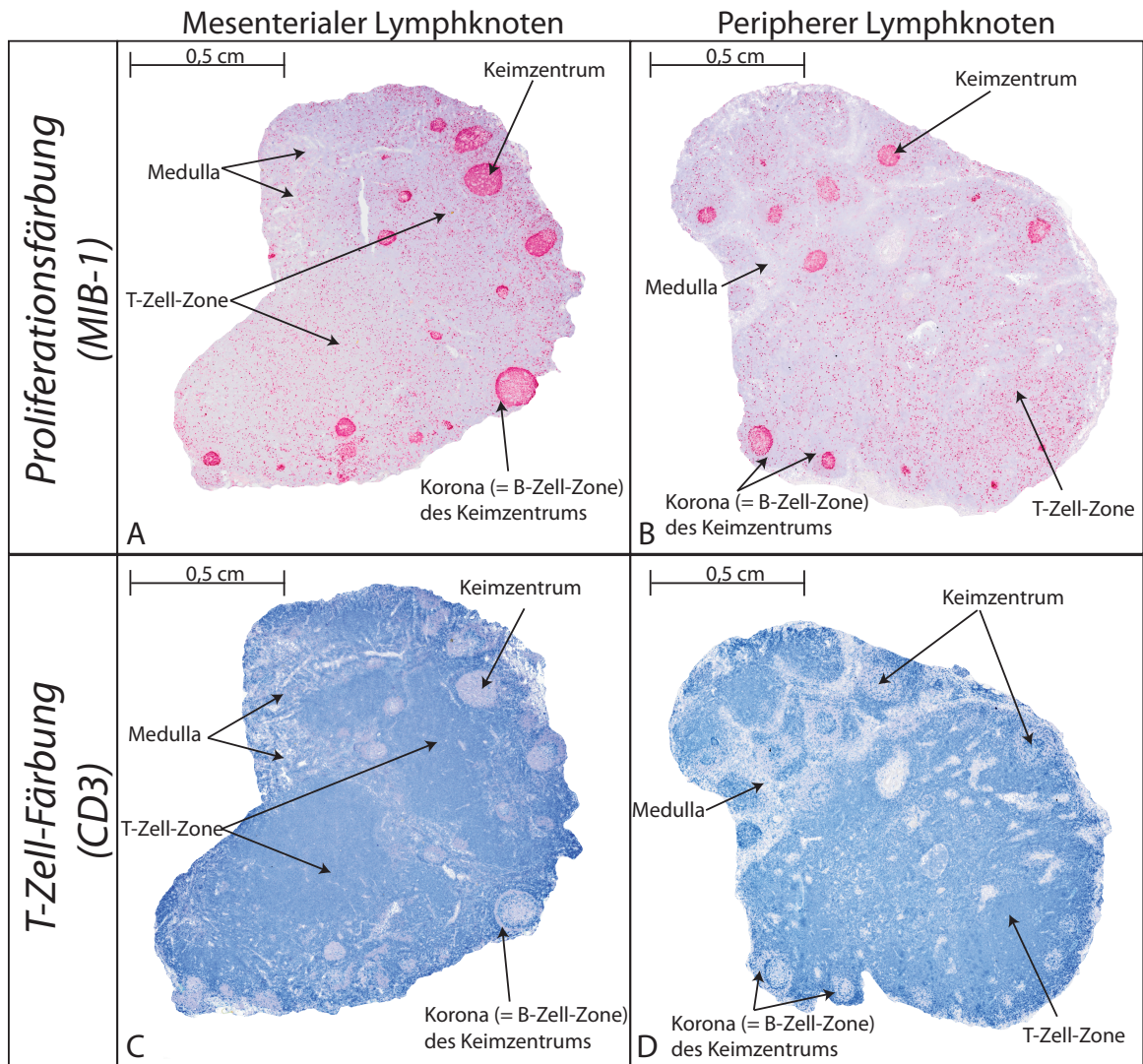


Abbildung 7.: **Immunhistochemische Proliferations- und T-Zell-Färbung der nicht - autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten.** Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MIB-1 erfolgt die immunhistochemische Färbung des Proliferationsantigens Ki-67 (A und B). Die T-Zellen werden über die immunhistochemische Anfärbung mit CD3 nachgewiesen (C und D). Dargestellt sind Folgeschnitte von einem mesenterialen bzw. peripheren Lymphknoten. Vergrößerung: 10fach.

3. Ergebnisse

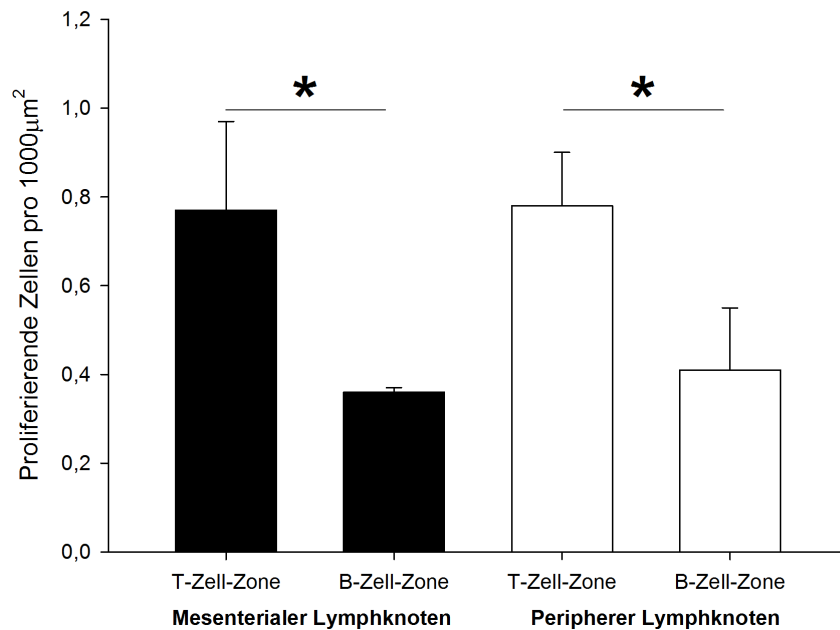


Abbildung 8.: **Proliferation in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone in nicht - autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten.** Mittels der MIB-1 Proliferationsfärbung wird das Ki-67 Antigen angefärbt. Es erfolgt die Auszählung auf einer Fläche von 1000 μm². Dargestellt sind die Durchschnittswerte mit Standardabweichung. Der Vergleich der Kompartimente erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentest. * signifikante Abweichung bezogen auf die T-Zell-Zone $p < 0,01$.

Die Keimzentrumsfläche unterscheidet sich nicht in humanen nicht-autoreaktiven Lymphknoten unterschiedlicher Lokalisation

Die Zellproliferation als Ausdruck der beginnenden Immunantwort in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone führt zu einer B-Zell-abhängigen Immunreaktion mit Ausbildung von Keimzentren. Die Größe und der Flächenanteil gibt Aufschluss über die Aktivität der B-Zell-abhängigen Immunreaktion. Der Flächenanteil beträgt in den nicht-autoreaktiven mLK 3,8 (± 2) %, was einer durchschnittlichen Fläche von 42.846 (± 17.537) μm² entspricht. Im Vergleich hierzu sind die Keimzentren der pLK in der Tendenz etwas größer; weisen aber im relativen Flächenverhältnis die gleiche Größe auf (Tabelle 9).

Tabelle 9.: **Keimzentren der nicht-autoreaktiven Lymphknoten**

	Keimzentrumsfläche [μm ²]	Flächenanteil [%]
<i>mLK</i>	42.846 ± 17.537	3,80 ± 2,0
<i>pLK</i>	65.090 ± 34.582	4,77 ± 4,2

Die humanen Gesamtlymphknotenschnitte weisen mesenterial und peripher kein unterschiedliches Zytokinmilieu auf

Nach der deskriptiv morphologischen Charakterisierung der nicht-autoreaktiven Lymphknoten, erfolgt nun die funktionelle Analyse des CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieus im gesamten Lymphknotenschnitt.

Der Abbildung 9 ist zu entnehmen, dass die Expressionen auf mRNA-Ebene aller zu untersuchenden Zellmarker und Zytokine in den ganzen Schnitten von nicht-autoreaktiven mLK und pLK mittels real-time RT-PCR detektiert werden können. In den mLK wird von den Transkriptionsfaktoren und Zellmarkern RoR γ t am geringsten exprimiert. Im Vergleich ist die CD25-Expression durchschnittlich um den Faktor 42 stärker in diesen Lymphknoten. TGF- β wird in der Gruppe der CD4⁺-T-Zell-Zytokine am stärksten und IL-17 am geringsten exprimiert. Hierbei beträgt die IL-17-Expression im Vergleich dieser Zytokine 0,2% der TGF- β -Expression. In den ganzen Schnitten der pLK findet sich ein ähnliches Verteilungsmuster der Transkriptionsfaktoren, Zellmarker sowie der CD4⁺-T-Zell-Zytokine. Als Zellmarker wird RoR γ t am geringsten und CD25 am stärksten exprimiert. Der Unterschied innerhalb der Expression liegt in der Größenordnung der mLK. Durchschnittlich wird IL-17 um den Faktor 483 (entspricht 0,2%) geringer als TGF- β in den ganzen Schnitten der pLK exprimiert. Im statistischen Vergleich der Zytokinexpression konnten zwischen mLK und pLK keine Unterschiede gefunden werden.

Die Laser-Mikrodissektion ermöglicht die selektive Untersuchung der Kompartimente in humanen nicht-autoreaktiven Lymphknoten

Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion besteht die Möglichkeit, einzelne Lymphknotenkompartimente mit hoher Präzision auszuschneiden und anschließend getrennt zu analysieren. Hierdurch ist eine höhere Sensitivität in der Detektion spezifischer Zellmarker und Zytokine auf mRNA-Ebene und somit eine genaue Dokumentation der CD4⁺-T-Zell-Aktivität möglich [55].

Vor Analyse des CD4⁺-T-Zell-Zellmarker- und Zytokinmilieus werden als Qualitätskontrolle der Kompartimentenisolation die Expressionen der Oberflächenantigene CD3, CD19 und CD38 bestimmt. CD3 ist das spezifische Oberflächenantigen für T-Zellen; CD19 hingegen charakterisiert B-Lymphozyten. Die Ratio ermöglicht eine Zuordnung zum T-Zell- bzw. B-Zell-Kompartiment. Wird vermehrt CD3 als CD19 exprimiert ($\frac{CD3}{CD19}$ Ratio > 1), befindet man sich in einem T-Zell dominierten Areal. In diesem Fall ist es die T-Zell-Zone. Ist die $\frac{CD3}{CD19}$ Ratio kleiner als 1 handelt es sich um ein B-Zellen dominiertes Kompartiment (B-Zell-Zone oder Keimzentrum). CD38 wiederum kennzeichnet proliferierende B-Zellen, wie sie im Keimzentrum vorkommen. Durch die Bestimmung der $\frac{CD38}{CD19}$ Ratio können die B-Zell-Zone und das Keimzentrum näher definiert werden

3. Ergebnisse

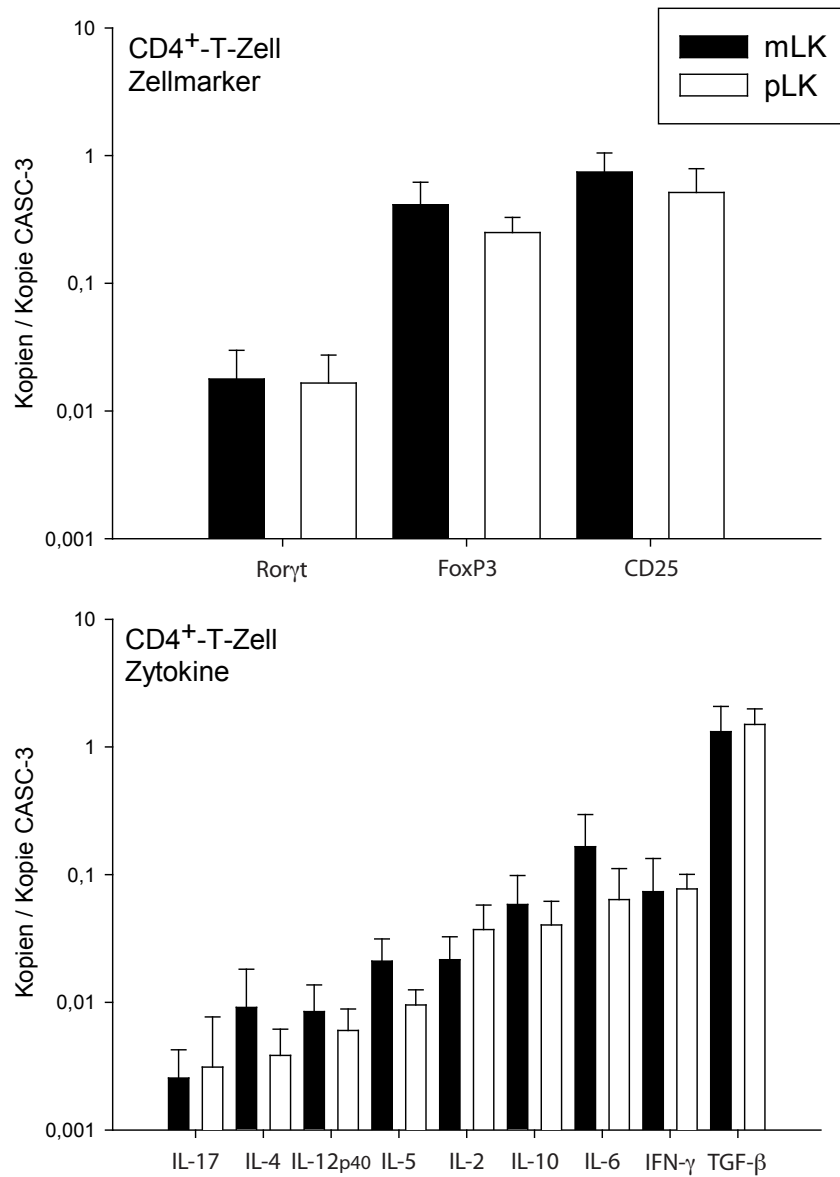


Abbildung 9.: **CD4⁺-T-Zell-Zellmarker und Zytokin-Expression in Gesamtlymphknotenschnitten von nicht-autoreaktiven mLK und pLK.** Mit Hilfe der Kryosektion erfolgt die Isolierung von den gesamten, den ganzen Lymphknoten umfassenden Schnitten. Die Entnahme findet an verschiedenen Stellen statt, um die CD4⁺-T-Zell-Zellmarker- und Zytokin-expression im gesamten Lymphknoten zu repräsentieren. Anschließend wird die mRNA isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mittels real-time RT-PCR die Zytokinexpression bezogen auf das Housekeeping-Gen CASC-3 bestimmt. Dargestellt sind nach Größe sortiert die Mittelwerte als Balkendiagramm mit Standardabweichung für die spezifischen CD4⁺-T-Zell-Zellmarker (CD25, FoxP3 und RoRγt) und CD4⁺-spezifischen Zytokine. Der Vergleich zwischen mesenterialen (mLK) und peripheren (pLK) Lymphknoten erfolgte mit Hilfe des Mann-Withney-U-Test.

3. Ergebnisse

[56, 57].

Mit Blick auf Abbildung 10 A zeigt sich, dass mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion eine exakte Isolation der T-Zell-Zone von den B-Zell-dominierten Arealen (B-Zell-Zone und Keimzentrum) sowohl im nicht-autoreaktiven mLK als auch pLK gelingt. B-Zell-Zone und Keimzentrum konnten ebenfalls erfolgreich durch die Laser-Mikrodissektion voneinander getrennt werden (Abbildung 10 B).

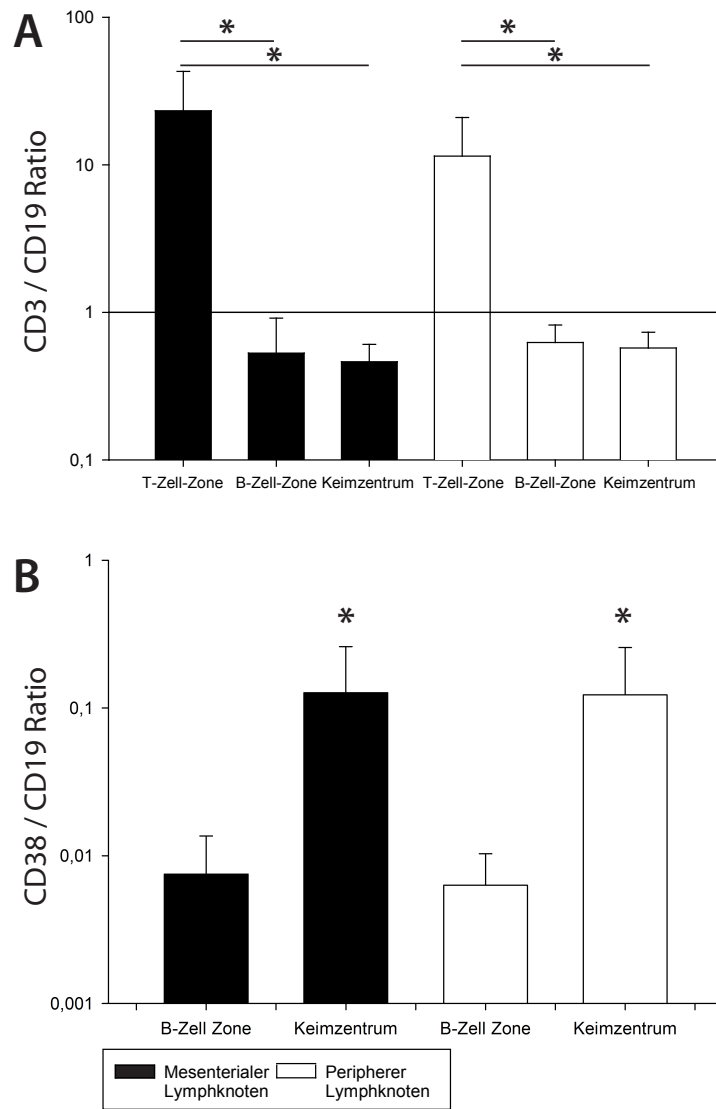


Abbildung 10.: $\frac{CD3}{CD19}$ Ratio und $\frac{CD38}{CD19}$ Ratio in den Kompartimenten von humanen nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten. Nach der Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion erfolgt die Isolation der mRNA, die cDNA-Synthese sowie die Bestimmung der T-Zell (CD3), B-Zell (CD19) und aktivierter B-Zell (CD38) Oberflächenantigene mit Hilfe der real-time RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der $\frac{CD3}{CD19}$ Ratio (A) und $\frac{CD38}{CD19}$ Ratio (B) mit Standardabweichungen. Der Vergleich zwischen den Kompartimenten erfolgte mittels Wilcoxon-Rangsummentest. *signifikante Abweichung mit $p < 0,05$.

Humane nicht-autoreaktive humane Lymphknoten weisen in ihren Kompartimenten ein ähnliches CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieu auf

Nach der Betrachtung der CD4⁺-T-Zell spezifischen Zytokine im Gesamtlymphknoten, die keine Unterschiede im Expressionsprofil zwischen mLK und pLK zeigte, erfolgte die Analyse der Zellmarker, Transkriptionsfaktoren sowie der Zytokine auf Ebene der Lymphknotenkompartimente.

Durch die Quantifizierung der mRNA in den untersuchten Lymphknoten lässt sich mit der Ausnahme von CD25 innerhalb der Zellmarker ein ähnliches Expressionsmuster in den mLK und pLK erkennen (Abbildung 11). Das von aktivierten CD4⁺-T-Zellen exprimierte CD25, das als α -Kette des IL-2 Rezeptors zu einer stärkeren Bindungsaktivität des Rezeptors führt, wird in der B-Zell-Zone der mLK geringer exprimiert. In den pLK ist hingegen die Expression in beiden Kompartimenten stabil. Vergleicht man jedoch die T-Zell- bzw. B-Zell-Zone von mLK und pLK miteinander, zeigen sich sowohl für CD25 als auch für FoxP3 und RoR γ t keine Unterschiede in der Expression.

Im Anschluss an die Bestimmung der Zellmarker erfolgte die Analyse der CD4⁺-T-Zell-Zytokine (Abbildung 12 und 13). Die mLK zeigen mit Ausnahme von IL-6 keine Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen der T-Zell- und B-Zell-Zone. Der Expressionsunterschied von CD25 zwischen der T-Zell- und B-Zell-Zone der mLK spiegelt sich nicht in der IL-2-Expression wider (Abbildung 12). Für die TH1- bzw. TH2-spezifischen Zytokine zeigt sich nur für IL-5 eine tendentielle, aber statistisch nicht signifikant geringere Expression in der B-Zell-Zone. Der Expressionsunterschied von FoxP3 und RoR γ t kann nicht in den entsprechenden Zytokinen (IL-10, IL-17 und TGF- β) nachgewiesen werden.

In den pLK zeigt die Auswertung neben der IL-6-Expression zwei weitere Unterschiede zwischen der T-Zell- und B-Zell-Zone (Abbildung 12 und 13). Erstens wird IL-12p40 in der T-Zell-Zone stärker exprimiert (Abbildung 12). Zweitens ist die IL-10-Expression in diesem Kompartiment schwächer als in der B-Zell-Zone ausgeprägt (Abbildung 13).

Sowohl für die T-Zell-Zone als auch für die B-Zell-Zone zeigt die statistische Auswertung, dass die Expressionen der CD4⁺-T-Zell-Zytokine sich nicht zwischen mLK und pLK unterscheiden.

Die Keimzentren bilden das Ergebnis der CD4⁺-T-Zell-abhängigen Immunantwort in den Lymphknoten. Daher wurde ebenfalls eine Expressionsanalyse in diesem Kompartiment durchgeführt. Der Vergleich der CD4⁺-T-Zell-Zellmarker und -Zytokine zeigt keinen Unterschied zwischen nicht-autoreaktiven mLK und pLK (Tabelle 10).

3. Ergebnisse

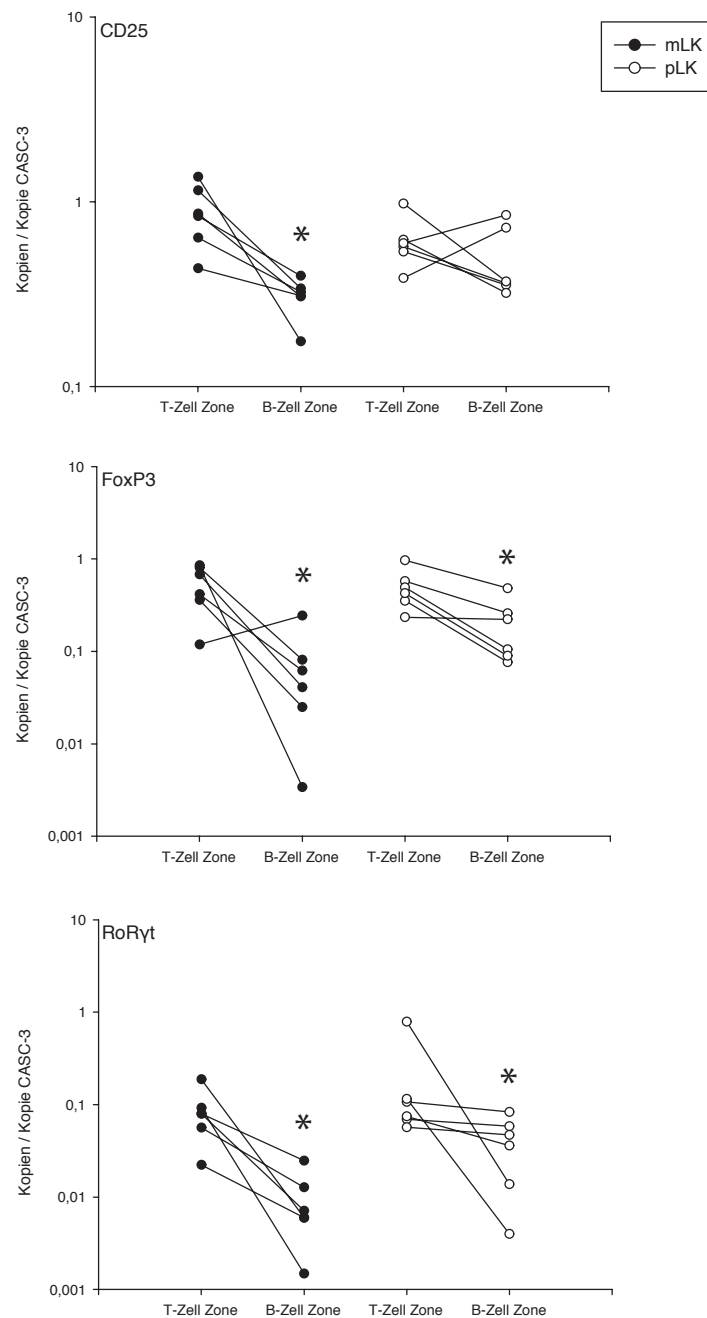


Abbildung 11.: **Zellmarkerexpression in der T-Zell- und B-Zell-Zone von humanen nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten.** Nach der Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion erfolgt die Isolation der mRNA, die cDNA-Synthese sowie die Bestimmung der Zytokine mit Hilfe der real-time RT-PCR. Dargestellt sind die Einzelwerte in der T-Zell-Zone und in der B-Zell-Zone. Der Vergleich zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Gruppe erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentest. Der Vergleich zwischen mLK und pLK erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test. * signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten mit $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

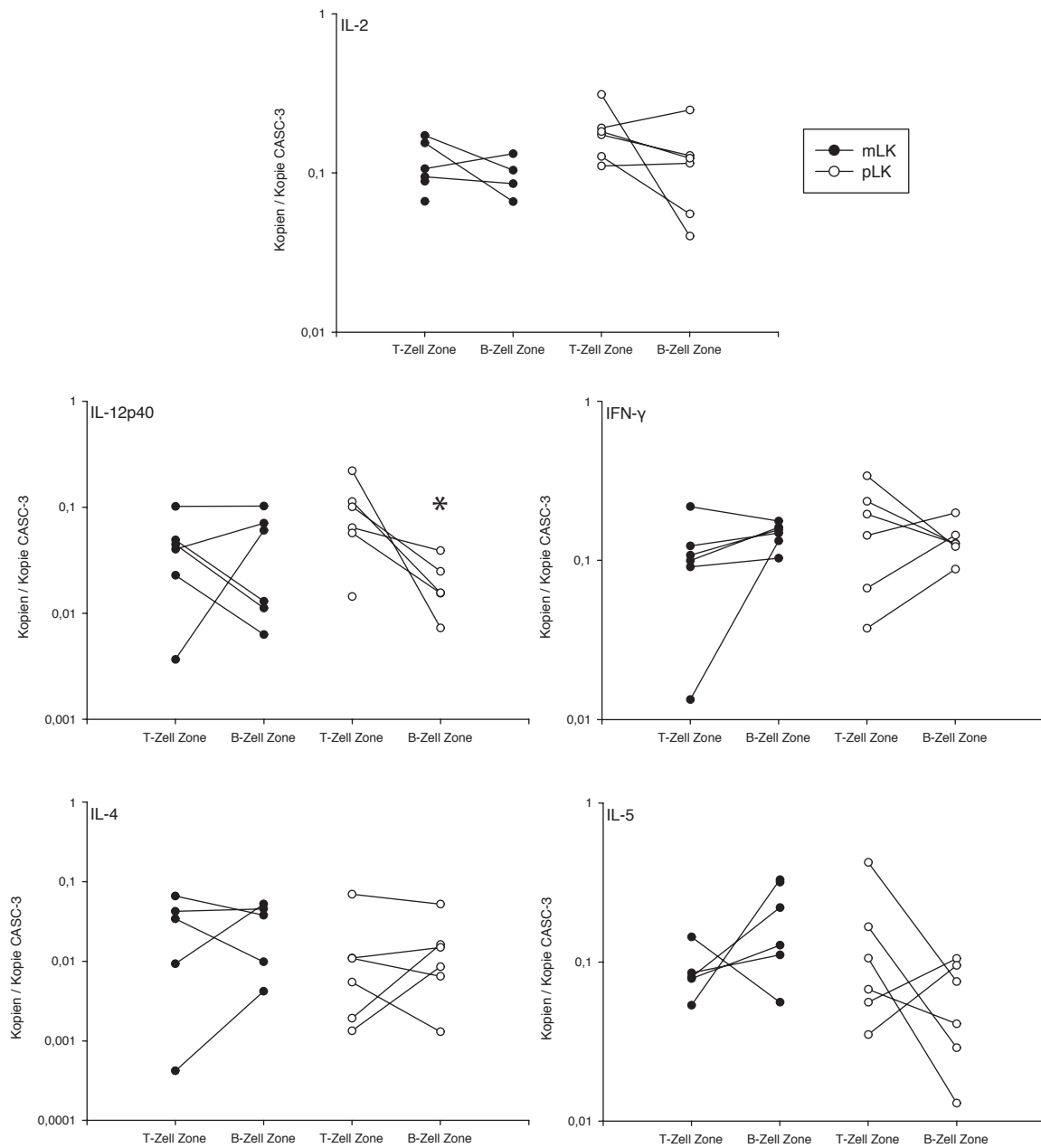


Abbildung 12.: **TH1- und TH2-Zytokinexpression in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone von nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten.** Nach der Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion erfolgte die Isolation der mRNA, die cDNA-Synthese sowie die Bestimmung der TH1- und TH2-T-Zell-Zytokine mit Hilfe der real-time RT-PCR. Dargestellt sind die Einzelwerte in der T-Zell-Zone und in der B-Zell-Zone. Der Vergleich zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Gruppe erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentest. * signifikante Unterschied zwischen den Kompartimenten mit $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

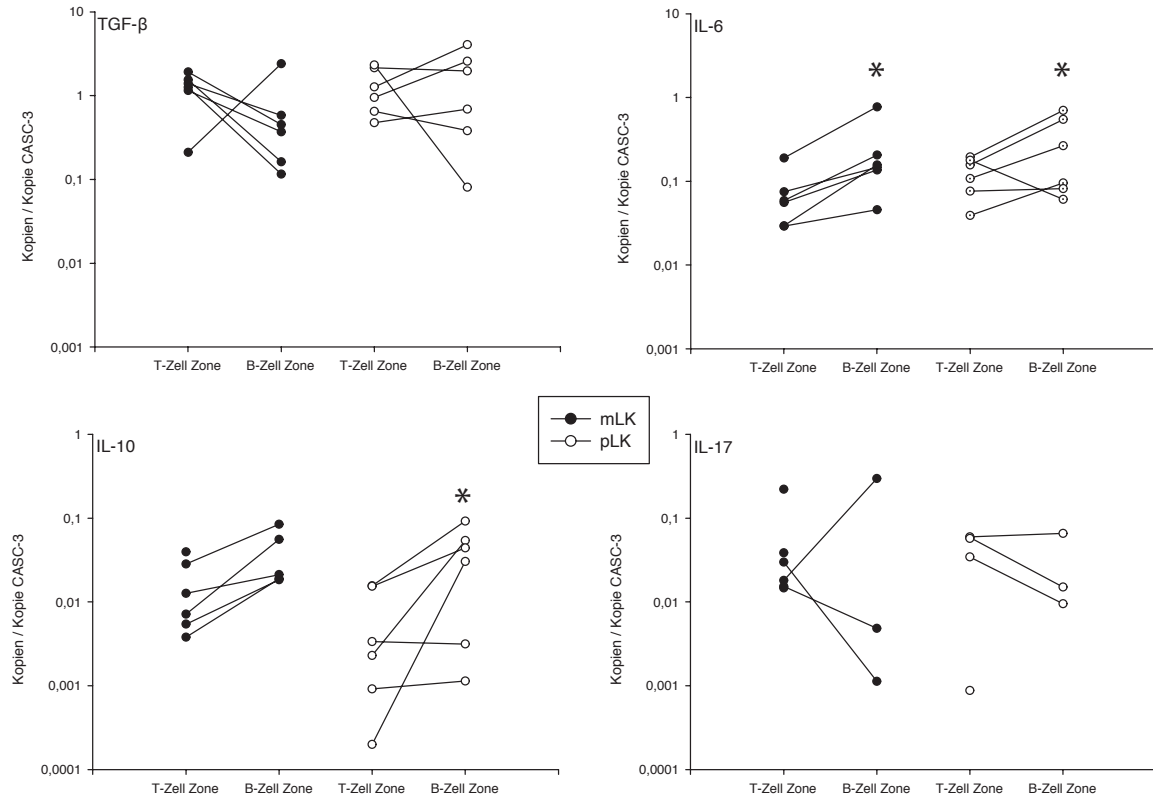


Abbildung 13.: **Treg- und TH17-Zytokinexpression in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone von nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten.** Nach der Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion erfolgte die Isolation der mRNA, die cDNA-Synthese sowie die Bestimmung der Treg- und TH17-T-Zell-Zytokine mit Hilfe der real-time RT-PCR. Dargestellt sind die Einzelwerte in der T-Zell-Zone und in der B-Zell-Zone. Der Vergleich zwischen den einzelnen Kompartimenten in einer Gruppe erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentest. * signifikante Unterschied zwischen den Kompartimenten mit $p < 0,05$.

Tabelle 10.: **CD4⁺-T-TZell-Zellmarker und -Zytokinexpression im Keimzentrum von humanen nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten.**

		mLK	pLK
		[Kopien / Kopie CASC-3]	[Kopien / Kopie CASC-3]
Zellmarker	CD25	0,3753 ± 0,1927	0,4950 ± 0,2457
	FoxP3	0,0679 ± 0,0887	0,1004 ± 0,0409
	RoR γ t	0,0125 ± 0,0105	0,0174 ± 0,0127
Zytokine	IL-2	0,0583 ± 0,0361	0,0432 ± 0,0141
	IL-12p40	0,0655 ± 0,0519	0,0117 ± 0,0133
	IFN- γ	0,0667 ± 0,0350	0,1214 ± 0,0523
	IL-4	0,0104 ± 0,0081	0,0237 ± 0,0337
	IL-5	0,0575 ± 0,0410	0,0695 ± 0,0765
	TGF- β	0,7523 ± 0,7481	2,6912 ± 2,5113
	IL-6	0,0742 ± 0,0529	0,0640 ± 0,0520
	IL-10	0,0146 ± 0,0134	0,0241 ± 0,0186
	IL-17	0,0167 ± 0,0192	0,0169 ± 0,0149

3.3. Autoreaktive Lymphknoten von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten

Im zweiten Teil dieser Untersuchung werden die drainierenden mesenterialen Lymphknoten aus Operationspräparaten von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten morphologisch und funktionell analysiert. Die zuvor untersuchten nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten dienen nun als Kontrollgruppe.

Präoperative antiinflammatorische Medikation

Die bestehende präoperative antiinflammatorische Therapie kann sich auf die zu untersuchenden Zellmarker- und Zytokinexpressionen auswirken. In Tabelle 11 sind die präoperativen Medikationen aufgelistet. In der Gruppe der gesunden mLK hatte kein Patient eine antiinflammatorische bzw. immunmodulatorische Therapie erhalten. CU- und MC-Patienten hatten bis auf eine Ausnahme eine bestehende medikamentöse Therapie v.a. mit Glukokortikoidderivaten, Azathioprin und Mesalazin erhalten. Eine immunmodulatorische Therapie z.B. mit dem TNF- α -Antikörper Infliximab war in keiner Gruppe zu erheben.

CU-Lymphknoten weisen morphologische Veränderungen auf

Durch die immunhistologische Anfärbung von CD3⁺-Zellen können analog zu den nicht-autoreaktiven Lymphknoten die Kompartimente identifiziert und computergestützt vermessen werden. Im Fall der CU-Lymphknoten zeigt sich sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch gegenüber den MC-Lymphknoten eine deutliche

3. Ergebnisse

Tabelle 11.: **Präoperative antiinflammatorische Therapie**

		<i>Gesund</i>	<i>CU</i>	<i>MC</i>
Glukokortikoide	<i>Systemisch</i>	-	1	2
	<i>Lokal</i>	-	1	-
Azathioprin		-	2	3
Mesalazin (5-ASA)		-	3	-
Methotrexat		-	-	1
Immunmodulatorische Therapie (Infliximab etc.)		-	-	-
Keine medikamentöse Therapie		6		1

Zunahme der T-Zell-Zonenfläche (Abbildung 14). Die T-Zell-Zonenfläche beträgt in den CU-Lymphknoten $18.614.647 (\pm 10.017.076) \mu\text{m}^2$ im Vergleich zur Kontrollgruppe ($6.648.726 \pm 5.727.253 \mu\text{m}^2$) und MC-Gruppe ($9.928.568 \pm 4.625.610 \mu\text{m}^2$). Die ausgemessene B-Zell-Zonenflächen beträgt in den CU-Lymphknoten $1.756.548 (\pm 905.762 \mu\text{m}^2)$ und ist damit tendentiell größer als in den nicht-autoreaktiven Lymphknoten ($1.046.809 \pm 750.428 \mu\text{m}^2$). Im Vergleich der drei Gruppen fällt die B-Zell-Zonenfläche in den MC-Lymphknoten am geringsten aus ($577.635 \pm 353.393 \mu\text{m}^2$).

Um zu klären, ob die T-Zell-Zonen-Hyperplasie in CU-Lymphknoten auf eine veränderte Anzahl von proliferierenden Zellen zurückzuführen ist, erfolgte die Bestimmung der Proliferation in der T-Zell- und B-Zell-Zone. Die Ergebnisse zeigen in der T-Zell-Zone der CU-Lymphknoten eine im Vergleich zur Kontroll- und MC-Gruppe ähnlich

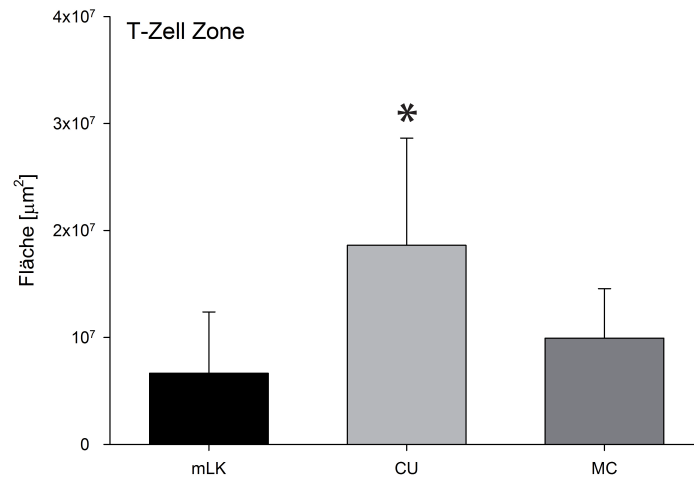


Abbildung 14.: **T-Zell-Zonenfläche von nicht-autoreaktiven mesenterialen und CED-Lymphknoten.** Computergestützt wurden die T-Zell-Zonenflächen von nicht-autoreaktiven mesenterialen und CED-Lymphknoten vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte als Balkendiagramme mit Standardabweichung der T-Zell-Zone von nicht-autoreaktiven mesenterialen, CU- und MC-Lymphknoten. Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test. * signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

starke Ausprägung der Proliferation. In der B-Zell-Zone ist die Anzahl der proliferierenden Zellen in allen drei Gruppen gleich stark ausgebildet. Proliferationszentren konnten weder in der T-Zell-Zone noch in der B-Zell-Zone von CU- und MC-Lymphknoten nachgewiesen werden (Tabelle 12).

Um zu untersuchen, ob sich im Fall der CED-Lymphknoten histologische Veränderungen in den Keimzentren ergeben, die den eigentlichen Ort der B-Zell-Proliferation darstellen, erfolgte die Bestimmung der Keimzentrumsfläche und des Flächenanteils an der Gesamtlymphknotenfläche. Im Gegensatz zur T-Zell-Zone zeigen die Ergebnisse, dass die untersuchten CU-Lymphknoten im Vergleich zur Kontroll- und MC-Gruppe verkleinerte Keimzentren aufweisen (Tabelle 12).

Tabelle 12.: **Proliferation und Keimzentrenausbildung in humanen CED-Lymphknoten**

		Gesund	CU	MC
<i>Proliferation</i>	T-Zell-Zone [Zellen/1000 μm^2]	0,84 $\pm$ 0,17	0,62 $\pm$ 0,19	0,86 $\pm$ 0,25
	B-Zell-Zone [Zellen/1000 μm^2]	0,47 $\pm$ 0,17	0,35 $\pm$ 0,18	0,34 $\pm$ 0,12
<i>Keimzentren</i>	Fläche [μm^2]	42.846 $\pm$ 17.537	30.000 $\pm$ 9.011*	36.175 $\pm$ 18.077
	Flächenanteil	3,8%	2,07%*	2,40%

* signifikante Abweichung bezogen auf die nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten (mLK) $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test).

CU-Lymphknoten zeigen deutliche Veränderungen im Zytokinmilieu

Der Lymphknoten stellt das Zentrum der Immunantwort in der Pathophysiologie der CED dar. Die ausdifferenzierten und selektionierten T- und B-Zellen wandern aus dem Lymphknoten in die Darmmukosa ein und sind für das dortige Zytokinmilieu verantwortlich. Da sich in den histologischen Untersuchungen erste Veränderungen in der Lymphknotenmorphologie zeigten, wurde von mir das vorherrschende Zytokinmilieu in den Lymphknoten von CED-Patienten untersucht.

Die Expressionen der Zellmarker bzw. Transskriptionsfaktoren und Zytokine sind in den Gesamtlymphknoten von CU- und MC-Lymphknoten mittels real-time RT PCR nachweisbar. In den Gesamtlymphknotenschnitten zeigt sich eine unterschiedlich starke Expression der Zellmarker und Zytokine. Im Lymphknoten von CU- und MC-Patienten wurde CD25 am stärksten und RoR γ t am geringsten exprimiert. Dieses Expressionsmuster ähnelt dem der nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten, die die Kontrollgruppe bilden. Ebenfalls liegt der Expressionsunterschied zwischen dem am geringsten und am stärksten exprimierten Zellmarker in der gleichen Größenordnung. Innerhalb der untersuchten Zytokine deutet sich ebenfalls ein Unterschied der einzelnen Expressionen an. Innerhalb der CU-Lymphknoten wird IL-17 am geringsten und

3. Ergebnisse

TGF- β am stärksten exprimiert. Diese Ergebnisse ähneln denen der Kontrollgruppe. Im Gegensatz wird in den MC-Lymphknoten IL12-p40 am geringsten exprimiert. TGF- β ist auch in der MC-Gruppe das am stärksten exprimierte Zytokin in den Gesamtlymphknotenschnitten. Im Vergleich der drei Gruppen kann kein statistischer Unterschied gefunden werden.

Da die Zytokinexpression in den Gesamtlymphknotenschnitten keine Unterschiede der CED-Lymphknoten zur Kontrollgruppe zeigte (Daten nicht dargestellt), wurden die einzelnen Kompartimente nach Isolation mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion getrennt untersucht. Die Bestimmung der $\frac{CD3}{CD19}$ Ratio und $\frac{CD38}{CD19}$ Ratio ermöglicht die Validierung der erfolgreichen Isolierung der Lymphknotenkompartimente (Abbildung 15).

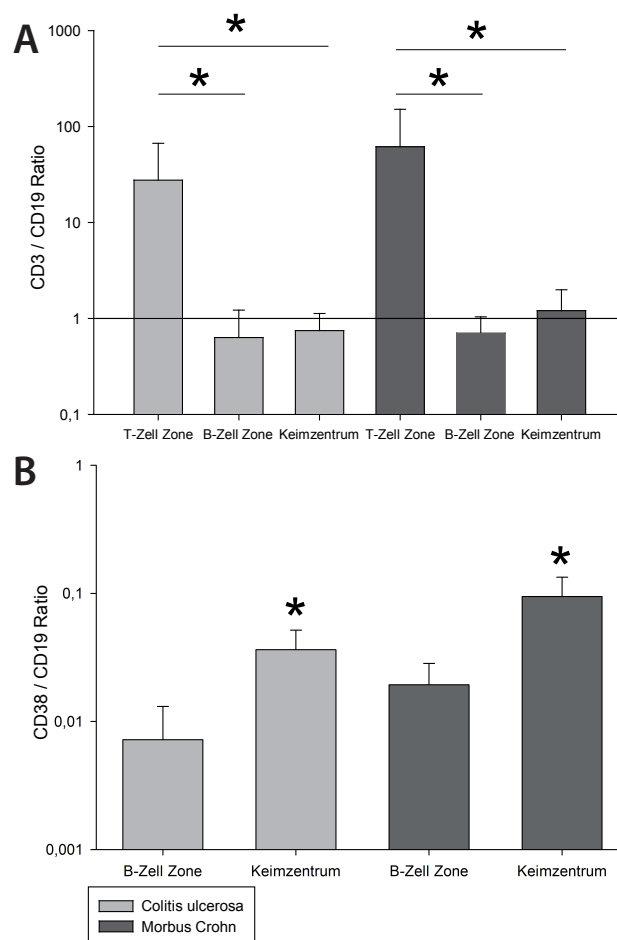


Abbildung 15.: $\frac{CD3}{CD19}$ -Ratio und $\frac{CD38}{CD19}$ -Ratio in den Lymphknotenkompartimenten von CU und MC Patienten. Nach der Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion erfolgte die Isolation der mRNA, die cDNA-Synthese sowie die Bestimmung der T-Zell (CD3) und B-Zell (CD19, CD38) Oberflächenantigene mit Hilfe der real-time RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte als Balkendiagramm mit Standardabweichungen. Der Vergleich zwischen den Kompartimenten erfolgte mittels Wilcoxon-Rangsummentest. *signifikante Abweichung bezogen auf die T-Zell-Zone mit $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

Die Auswertung des Expressionsprofil auf Kompartimentenebene weist Veränderungen auf, die zuvor nicht in den ganzen Lymphknotenschnitten erfasst werden konnten. In der T-Zell-Zone von CU- und MC-Lymphknoten zeigt sich eine stärkere Expression von IL-6 und IL-17 im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der B-Zell-Zone der CED-Lymphknoten werden neben dem Zellmarker CD25 und dem Transkriptionsfaktor FoxP3 die Zytokine TGF- β und IL-6 stärker exprimiert (Abbildung 16).

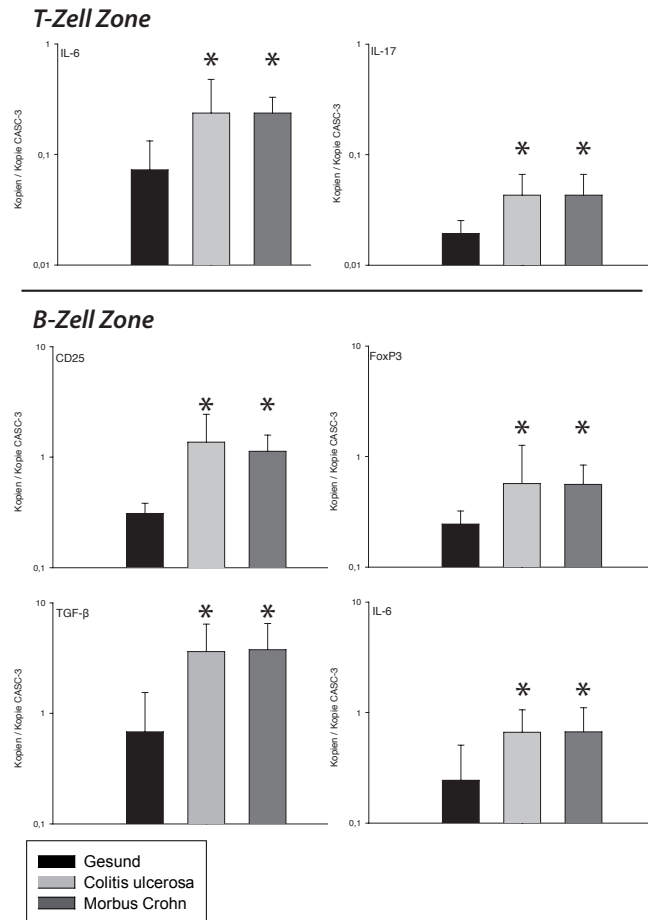


Abbildung 16.: **Expressionsveränderungen in den Kompartimenten der drainierenden CED-Lymphknoten.** Nach der Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion erfolgt die Isolation der mRNA, die cDNA-Synthese sowie die Bestimmung mit Hilfe der real-time RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte als Balkendiagramme mit Standardabweichung in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone von nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten (Kontrollgruppe) sowie Lymphknoten, die aus Operationspräparaten von CU und MC Patienten entnommen wurden. In den Keimzentren fanden sich keine gleichartigen Veränderungen der Zytokinexpression. Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test. * signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $p < 0,05$.

Ein schwächer als in der Kontrollgruppe exprimiertes Zytokin findet sich in den Untersuchungen nicht. Hierbei fällt auf, dass die meisten Veränderungen in der B-Zell-Zone

3. Ergebnisse

zu finden sind. Neben den ähnlichen Veränderungen sowohl in den CU- als auch in den MC-Lymphknoten fällt eine Besonderheit in den CU-Lymphknotenkompartimenten auf. Es zeigt sich zusätzlich zu den Veränderungen des Zytokinmilieus, die in beiden Gruppen auftreten, die verstärkte Expression des TH2-spezifischen Zytokins IL-4. Dieses wird in den Kompartimenten der CU-Lymphknoten stärker als in der Kontrollgruppe und in den MC-Lymphknoten exprimiert wird (Abbildung 17).

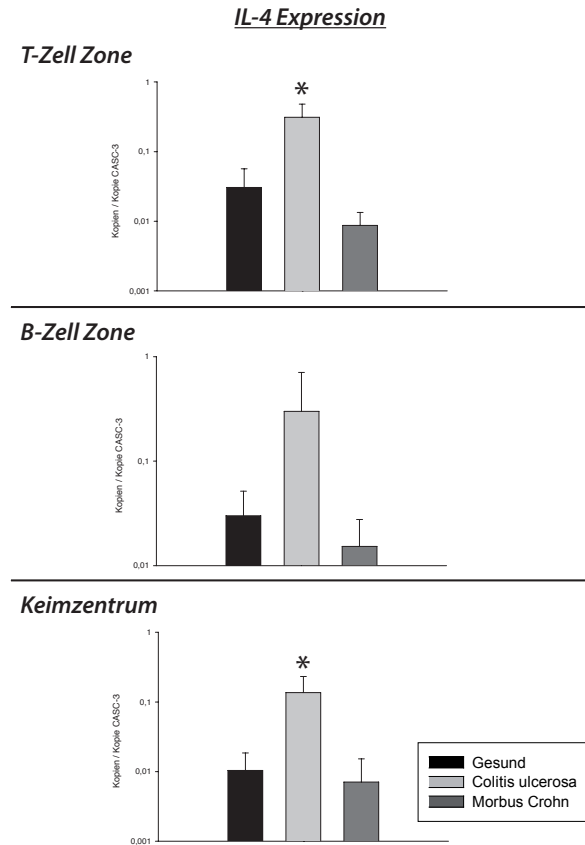


Abbildung 17.: **Verstärkte IL-4-Expression in den Kompartimenten der drainierenden Lymphknoten von CU-Patienten.** Nach der Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion erfolgt die Isolation der mRNA, die cDNA-Synthese sowie die Bestimmung IL-4 mit Hilfe der real-time RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte als Balkendiagramme mit Standardabweichung in den Kompartimenten von nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten (Kontrollgruppe) sowie Lymphknoten, die aus Operationspräparaten von CU und MC Patienten entnommen wurden. Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test. * signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit $p < 0,05$.

IL-4 wird gegenüber der Kontrollgruppe um den Faktor 10 und gegenüber den MC-Lymphknoten um das 35fache stärker in der T-Zell-Zone exprimiert. In der B-Zell-Zone und im Keimzentrum finden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich starke Expressionsunterschiede. In den B-Zell dominierten Arealen der MC-Lymphknoten beträgt die IL-4 Expression im Vergleich zur CU-Gruppe nur 5%.

4. Diskussion

Die CD4⁺-T-Lymphozyten stellen die entscheidende Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar [10, 30]. In ihrer Rolle sind sie für die Balance der Immunzellen sowie für deren rasche Koordination während einer Immunreaktion verantwortlich [22, 27, 31, 40, 58]. Ihre Differenzierung und Aktivierung wird im Wesentlichen durch das vorherrschende Zytokinmilieu bestimmt [10, 22, 26, 27]. Die Lymphknoten sind in diesem Zusammenhang die Orte, in denen die CD4⁺-T-Zell-Differenzierung vornehmlich stattfindet [30]. Eine Veränderung des Zytokinmilieus kann wesentliche Auswirkungen auf die Immunbalance haben [59, 60, 61]. Eine Folge ist die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Daher ist es Ziel dieser Arbeit, den Status der CD4⁺-T-Zell-Zytokinexpression von nicht-autoreaktiven Lymphknoten zu erfassen und mit Veränderungen in den CED-Lymphknoten zu vergleichen.

4.1. Humane nicht-autoreaktive Lymphknoten zeigen in-vivo keine morphologische oder funktionelle Alteration

Im ersten Abschnitt dieser Diskussion sollen Morphologie der Lymphknoten und als deren mögliche Ursache die funktionelle Analyse der CD4⁺-T-Zell-Zytokinexpression reflektiert werden.

Die immunologischen Vorgänge im Lymphknoten führen zu dessen charakteristischen histologischen Bild mit der Ausbildung von T-Zell-Zone, B-Zell-Zone und Keimzentren. In der zunächst durchgeführten Untersuchung der nicht-autoreaktiven, mesenterial (mLK) bzw. cervical (pLK) lokalisierten Lymphknoten lassen sich bezüglich der Proliferation und Keimzentrenausbildung unabhängig von ihrer Lokalisation im menschlichen Körper ähnliche Aktivitätszustände nachweisen. Um zu untersuchen, inwiefern eine bestimmte Ausprägung des CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieu mit der makroskopischen Lokalisation und der mikroskopischen lymphonodalen Morphologie korreliert, erfolgte die Bestimmung der Zytokinexpression sowohl in mesenterialen als auch cervicalen (peripheren) Lymphknoten. In den Gesamtlymphknotenschnitten, die alle Kompartimente repräsentieren, zeigt sich ein von der makroskopischen Lokalisation

4. Diskussion

unabhängig ausgeprägtes Zytokinmilieu. Um zu analysieren, ob Unterschiede beim Vergleich der Kompartimente (innerhalb desselben Lymphknotens) bestehen, erfolgte die Isolierung mittels der Laser-Mikrodissektion. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, die humanen Lymphknoten auf Kompartimentenebene ohne zuvor durchgeführte in-vitro Stimulation oder exogene bzw. endogene Einflüsse in-vivo zu untersuchen [62, 63, 64, 65, 66]. In der vorliegenden Arbeit lassen sich einzelne Unterschiede im Zytokinmilieu beim Vergleich der Kompartimente innerhalb eines Lymphknotens nachweisen. Jedoch finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich des jeweiligen Kompartimentes in Abhängigkeit von der makroskopischen (also mesenterialen oder cervicalen) Lokalisation. Hierdurch würde das eingangs dargestellte histologische Bild, das sich nicht unterschiedlich präsentiert, erklärt werden. Eine Beeinflussung der beschriebenen Zytokinexpression durch das Operationstrauma dürfte ausgeschlossen werden, da alle Darm-Lymphknoten aus Operationspräparaten, die im Rahmen von minimalinvasiven chirurgischen Operationen (MIC) laparoskopisch entfernt wurden, stammten. Hierbei macht man sich nicht nur den Vorteil der kürzeren postoperativen Hospitalisierungsphase [67, 68], sondern auch die geringere proinflammatorische Zytokinexpression durch das weniger ausgeprägte Operationstrauma zu nutze [69, 70, 71, 72, 73]. Die als periphere Proben gewonnenen cervicalen Lymphknoten wurden in den ersten 10 Minuten nach dem Hautschnitt entnommen, so dass von keiner wesentlichen bzw. dem Tiermodell entsprechenden Beeinflussung der Expressionsmuster auszugehen ist. Somit scheint die Lokalisation im Lymphsystem keinen Einfluss auf das histologische und molekularbiologische Bild zu haben.

Die gewonnenen Ergebnisse scheinen denen im Ratten-Modell gewonnenen Daten über das $CD4^+$ -T-Zell-Milieu zu widersprechen, da sich kein spezifisches Expressionsmilieu für eine $CD4^+$ -T-Zell-Subpopulation im mLK und pLK ausbildet. In diesem Modell konnte für mesenteriale Lymphknoten eine TH2-Dominanz in der B-Zell-Zone sowie für periphere Lymphknoten eine TH1-Dominanz in der T-Zell-Zone festgestellt werden [23]. Diese Differenzen zwischen Tiermodell und den Ergebnissen in humanen Lymphknoten lassen sich auf das Alter der Lymphknoten bzw. auf das Patientenalter zurückführen. Die menschlichen Lymphknoten stammen von Patienten, in denen die Lymphknoten bereits an mehreren Immunreaktionen beteiligt waren. Somit ist das histologische Bild und die Zytokinexpression das Resultat der einzelnen Immunreaktionen in den Lymphknoten.

Desweiteren ist die Entwicklung des Immunsystems im menschlichen Organismus zu beachten. Vertebraten werden mit Keimzentrums-freien Lymphknoten, in den ein TH2-Milieu herrscht, geboren [60]. Die Besiedlung mit der Mund- und Darmflora führt zu einem Ausgleich zwischen den $CD4^+$ -Subpopulationen, also dem Rückgang der TH2-Dominanz [74]. Ursache des ausgeglichenen Zytokinmilieus ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen dendritischen Zellen, Stromazellen und den $CD4^+$ -T-Lymphozyten

in den Lymphknoten. Aktuell geht man davon aus, dass DC hauptsächlich für das Zytokinmilieu und die Steuerung der $CD4^+$ -T-Zellen verantwortlich sind. Schließlich stellt das Ratten-Modell einen artifiziellen und wahrscheinlich keimreduzierten Zustand dar, bei dem es erst spät oder nur unvollständig zu einem Ausgleich zwischen den TH-Zell-Populationen kommen kann.

Das ausbalancierte Zytokinmilieu zwischen den einzelnen Lymphknotenkompartimenten lässt einen dritten Diskussionsansatz zu. Ziel des Organismus ist die Wahrung der Integrität gegenüber Krankheitserregern sowie die periphere Toleranz gegenüber der kommensalen Flora. Hierfür bedient er sich eines weit verzweigten Immunsystems, das eine Immunbalance aufbaut. Hierbei stellen die Lymphknoten das Zentrum der peripheren Toleranz dar, während das mukosale Lymphgewebe (z.B. Peyer Plaques im Darm oder Tonsillen im Hals-Rachen-Raum) für die lokale Erhebung des Immunstatus und der angeborenen Immunantwort verantwortlich ist [75]. Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass die orale Toleranz von den mLK ausgeht und die Peyer Plaques für diesen Vorgang nicht benötigt werden [76]. Das ausgeglichene Zytokinmilieu repräsentiert in diesem Zusammenhang eine auf die Entstehung von Autoimmunerkrankheiten präventiv wirkende Toleranz. Wenn sich das $CD4^+$ -T-Zell-Zytokinmilieu verändert, können als Folge Infektionen, Allergien und Autoimmunerkrankungen entstehen [60, 61].

Zusammenfassend gleichen sich humane nicht-autoreaktive Lymphknoten histologisch und molekularbiologisch unabhängig von ihrer Lokalisation. Dies stellt nicht nur das Resultat der abgelaufenen Immunreaktionen dar, sondern vor allem die bestehende Immunbalance im lymphatischen System. Eine Veränderung im $CD4^+$ -T-Zell-Zytokinmilieu könnte den Verlust dieser Balance darstellen und die Induktion von Autoimmunerkrankungen initiieren.

4.2. Das in-vivo IL-4 dominierte Zytokinmilieu von Colitis ulcerosa Lymphknoten deutet auf den Verlust der peripheren Toleranz hin

Die mesenterialen Lymphknoten sind für die Abwehr von Pathogenen sowie die Wahrung der peripheren Toleranz im lymphatischen System des Darms essentiell [60]. Eine Veränderung der Balance im $CD4^+$ -T-Zell-Zytokinmilieu kann Autoimmunerkrankungen initiieren [60, 61]. In zahlreichen Untersuchungen konnte bereits der Verlust der Balance zwischen konkurrierenden TH-Zell-Populationen (TH1/TH2/TH17) in der Darmmukosa von CED-Patienten nachgewiesen werden [77]. Die drainierenden Lymphknoten wurden bei diesen Untersuchungen meist vernachlässigt, obwohl sie als Schaltstellen des Gleichgewichtes zwischen den TH-Zell-Populationen im intestinalen Immunsystem

4. Diskussion

angesehen werden [60, 75]. Vor diesem Hintergrund soll im Folgenden diskutiert werden, inwieweit dieses beschriebene Gleichgewicht in den vorliegenden, drainierenden Lymphknoten von CED-Patienten gestört ist.

Morphologisch und molekularbiologisch zeigten die CU-Lymphknoten die stärksten Veränderungen. Es konnte in der durchgeführten Analyse der histologischen Veränderungen eine deutliche T-Zell-Zonen-Hyperplasie in den CU-Lymphknoten nachgewiesen werden. Ein Korrelat für die histologischen Veränderungen konnte in der Zytokinexpression in den Gesamtlymphknotenschnitten nicht erbracht werden. Erst durch die Isolation der einzelnen Kompartimente durch die Laser-Mikrodissektion konnten die in-vivo Veränderungen in der Zytokinexpression aufgezeigt werden. Besonders zeigte sich in den Zytokinuntersuchungen die verstärkte Expression des TH2-Zytokins IL-4 in den Kompartimenten von CU-Patienten gegenüber der Kontroll- und MC-Gruppe.

Die vergrößerte T-Zell-Zone der CU-Lymphknoten lässt auf eine primäre T-Zell-Antwort schließen. Ähnliche Zusammenhänge wurden bei bereits bei T-Zell dominierten Dermatosen nachgewiesen [7]. In dieses Bild passt ebenfalls die im Verhältnis verkleinerte Keimzentrumsfläche. Die fehlenden histologischen Veränderungen in den Lymphknoten von MC-Patienten bieten zwei Interpretationsmöglichkeiten. Erstens ist es möglich, dass die Lymphknotenmorphologie nicht immer mit der Krankheitsaktivität einhergehen muss [78, 79]; zweitens können die fehlenden Veränderungen auch auf ein mangelndes molekularbiologisches Korrelat im Sinne der Zytokinexpression schließen lassen [8, 80].

Der Ursprung der histologischen Veränderungen, die in den CU-Lymphknoten nachgewiesen wurden, liegt in dem vorherrschenden Zytokinmilieu. Dieses war in der Darmmukosa beider Entitäten der CED Ziel intensiver Forschung mit unterschiedlichen Ergebnissen. Während das erhöhte TH1/Th17-Zytokinmilieu in der Mukosa von MC-Patienten als Ursprung der autoreaktiven Immunantwort identifiziert wurde [39, 51], ist bei der CU die Datenlage über das vorherrschende Zytokinmilieu sehr heterogen [47, 48, 50, 81]. In-vivo Daten über das CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieu in den drainierenden Lymphknoten von CU liegen bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht vor. Aber die Lymphknoten stellen den Ursprungsort der pathophysiologischen Veränderungen dar, da in ihnen die T-Zellen ausdifferenzieren, in die Darmmukosa migrieren und dort die proinflammatorischen Zytokine sezernieren.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene verstärkte IL-4 Expression, die sich nur nach Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion in-vivo nachweisen lässt, deutet auf ein TH2-Zytokinmilieu hin. IL-4, dessen mRNA posttranskriptionell durch Stabilisation reguliert wird [82], besitzt multiple biologische Effekte auf unterschiedliche Zellen in der Pathogenese der CU [29]. Die verstärkte IL-4 Expression kann im allgemeinen über eine autokrine Schleife morphologisch die CD4⁺-T-Zell-Hyperplasie und -Differenzierung induzieren [28, 29]. Dies ist konkludent mit der in der vorliegen-

4. Diskussion

den Arbeit nachgewiesenen T-Zell-Zonen Hyperplasie in CU-Lymphknoten. Funktionell jedoch generiert die erhöhte Expression von IL-4 eine TH2-gewichtete, prädominant humorale Immunantwort. In diesem Rahmen kommt es zu einer verstärkten Antikörper-Produktion sowie zum Klassenwechsel der Antikörper zu IgG und IgE. Konform zu der von mir nachgewiesenen humoral ausgerichteten Immunreaktion lassen sich im Darm-lumen von CU-Patienten erhöhte Antikörper-Konzentrationen von IgG (jedoch nicht von IgA) nachweisen [36]. Diese Antikörper sind vorwiegend gegen zytoplasmatische Proteine der kommensalen Darmflora gerichtet. Als Ursache für die erhöhte lumina-le Antikörper-Konzentration bei CU-Patienten wird eine alterierte mukosale Barriere diskutiert [83], welche zu einer exacerbierten Immunreaktion gegen kommensale Bak-terien im Darm führt, die nach Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit am ehesten TH2-gewichtet und humoraler Natur ist.

Aktiviert TH2-Zellen sind nach Migration für das IL-4 und IL-5 Zytokinmilieu in der Darmmukosa von CU-Patienten verantwortlich [47, 48]. Über IL-4 können Makro-phagen und basophile Granulozyten zur Degranulation angeregt und der Entzündungs-prozess unterhalten werden [29, 84]. Als Quelle der vermehrten IL-4 Sekretion können neben den T-Zellen auch basophile Granulozyten, Mastzellen, NK-T-Zellen und DC an-genommen werden [10, 18, 25, 26, 27, 28, 31, 33, 34]. Welche Zellpopulation den Haupt-anteil an der IL-4-Sekretion übernimmt, müssen nachfolgende Untersuchungen klären. Ebenfalls müssen weitere Studien klären, welches pathogene Agens für die vermehrte IL-Expression verantwortlich ist. Einen Einfluss der zum Operationszeitpunkt beste-henden antiinflammatorischen Therapie auf das CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieu dürfte in diesem Zusammenhang nicht angenommen werden, da diese entweder keinen direkten Einfluss auf die mRNA-Expression bzw. T-Zell-Effektorfunktion hat [8, 85, 86, 87] oder langfristig vor der Operation abgesetzt wurde [8, 80].

Die aufgrund der mukosalen Barrierestörung beobachtete vermehrte IL-4 Expression und die soeben beschriebene TH2-induzierte Inflammation kann die Entstehung von kolorektalen Karzinomen begünstigen [88]. In diesem Zusammenhang konnte bereits nachgewiesen werden, dass IL-4 die Apoptose und die durch die Chemotherapie indu-zierten Zelltod hemmt [89]. Im Mausmodell bestehen darüber hinaus Hinweise, dass IL-4 die Tumormetastasierung fördern kann [88]. Osawa et al. konnten im Mausmodell nachweisen, dass nach Induktion einer CU in den IFN- γ defizienten, TH2-dominierten Mäusen gegenüber den IL-4 defizienten, TH1-dominierten Tieren die Inzidenz für ko-lorektale Karzinome signifikant erhöht war [90]. Neben IL-4 wird IL-6 eine Karzinom fördernde Wirkung zugeschrieben, da es die Proliferation, das Apoptoseverhalten und die Angiogenese in der Malignomentstehung negativ beeinflusst [18, 89, 91]. Dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene IL-4-Dominanz in CU-Lymphknoten erstmals auch im Menschen auf die Karzinomentstehung hinweist, zeigt sich daran, dass die Mehrheit der CU-Patienten aufgrund von Metaplasien operiert wurde.

4. Diskussion

Die in-vivo Untersuchungen der Lymphknotenkompartimente von MC-Patienten konnten kein TH1/TH17 Zytokinmilieu, wie es für die Darmmukosa und für die drainierenden Lymphknoten postuliert wird [39, 51, 77], nachweisen. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass besonders im Fall der Analysen der drainierenden Lymphknoten die Zellen in-vitro und nach Stimulation untersucht wurden. Als Konsequenz der fehlenden Veränderungen im Zytokinmilieu zeigt sich das oben diskutierte histologische Korrelat. Ob sich die Ergebnisse durch Stimulation der Zellen nach Isolation mittels Laser-Mikrodissektion reproduzieren lassen, müssen nachfolgende Analysen klären.

Zusammenfassend unterscheidet sich der drainierende Lymphknoten von CU-Patienten durch eine T-Zell-Zonen-Hyperplasie und eine verstärkte in-vivo IL-4-Expression von nicht-autoreaktiven bzw. MC-Lymphknoten. Die IL-4 dominierten CU-Lymphknoten stellen zum einen den Ursprungsort für das Zytokinmilieu in der Darmmukosa dar. Zum anderen lassen sie erstmals die Charakterisierung der übersteigerten Immunreaktion gegen Kommensalen zu, welche TH2-gewichtet ist und deren humorale Natur bei CU-Patienten bereits beschrieben wurde. Desweiteren kann die IL-4-Expression mit der Karzinomentstehung assoziiert sein oder auf diese hinweisen. Um diese Hypothese weiter zu untermauern sollte das CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieu in den kolorektalen Karzinomen von CU-Patienten in Folgestudien untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC), entstehen aus einer komplexen Interaktion zwischen genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren sowie konsekutiver Alteration des Immunsystems. Die aus dieser autoreaktiven Inflammation resultierenden Komplikationen bedeuten für die betroffenen Patienten eine lebenslange medikamentöse Therapie, rezidivierende Krankenhausaufenthalte und eine deutliche Einschränkung ihrer Lebensqualität. Die nachgewiesenen Zytokine deuten im Fall der CU auf ein TH2 und in der MC-Gruppe auf ein TH1/TH17 dominiertes Zytokinmilieu hin. Jedoch ist die Datenlage in der CU-Gruppe noch nicht vollständig geklärt und Bestandteil aktueller Diskussion. Jedoch ist bisher nur wenig über den Ort der CD4⁺-T-Zell-Differenzierung, die lokalen mesenterialen Lymphknoten, bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, neben dem histologischen Erscheinungsbild der mesenterialen Lymphknoten von CED-Patienten das Zytokinmilieu in-vivo zu charakterisieren und mit nicht-autoreaktiven Lymphknoten zu vergleichen.

Es wurden jeweils jeweils sechs humane mesenteriale (mLK) und sechs periphere (pLK), nicht-autoreaktive Lymphknoten sowie sechs CU- bzw. fünf MC-Lymphknoten untersucht. Mit Hilfe der immunhistochemischen Proliferations- (MIB-1) und CD3-T-Zell-Färbung wurde die Proliferationsdichte in der T-Zell- und B-Zell-Zone sowie die Kompartimentenflächen computergestützt bestimmt. Für die molekularbiologische Untersuchung des CD4⁺-T-Zell-Zytokinmilieus wurden sowohl ganze Lymphknotenschnitte als auch die Lymphknotenkompartimente (T-Zell-Zone, B-Zell-Zone und Keimzentrum) mittels Kryosektion und Laser-Mikrodissektion gewonnen. Auf Basis der mRNA-Expression wurden mittels real-time RT PCR die TH1- (IL-2, IL-12p40 und IFN- γ), TH2- (IL-4 und IL-5) sowie die Treg- bzw. TH17-Zytokine (FoxP3, RoR γ t, TGF- β , IL-6, IL-10 und IL-17) analysiert. Zur Validierung der Kompartimentenisolation wurden die T-Zell- und B-Zellmarker CD3, CD19 und CD38 genutzt.

Die nicht-autoreaktiven Lymphknoten weisen nach Isolation der Kompartimente mittels Laser-Mikrodissektion eine unterschiedliche Zytokinexpression in der T-Zell- und B-Zell-Zone auf, die zuvor in den Gesamtlymphknotenschnitten nicht nachweisbar war. Hierbei zeigen sich Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den einzelnen Zytokinen. Im Vergleich der nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten zeigt sich sowohl in der histologischen als auch in der molekularbiologischen Betrachtung der CD4⁺-T-Zell-Zytokine keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Der

5. Zusammenfassung

Vergleich der CED-Lymphknoten mit den nicht-autoreaktiven mesenterialen Lymphknoten zeigt bereits morphologisch eine vergrößerte T-Zell-Zone und verkleinerte Keimzentrumsfläche in der CU-Gruppe. Nach Isolation der einzelnen Kompartimente kann in den CED-Lymphknoten eine verstärkte CD4⁺-T-Zell-Zytokinexpression (T-Zell-Zone: IL-6, IL-17; B-Zell-Zone: CD25, FoxP3, IL-6 und IL-17) nachgewiesen werden. Insbesondere das TH2-Zytokin IL-4 wird im Gegensatz zur Kontrollgruppe und den MC-Lymphknoten deutlich stärker in den Kompartimenten von CU-Lymphknoten exprimiert.

Humane nicht-autoreaktive Lymphknoten gleichen sich histologisch und molekularbiologisch unabhängig von ihrer Lokalisation im Lymphsystem. Anders als im Tiermodell kann keine Präferenz für ein dominierendes CD4⁺-T-Zell-Zytokin nachgewiesen werden. Dies stellt nicht nur das Resultat der abgelaufenen Immunreaktion in den Lymphknoten dar, sondern vor allem die Immunbalance im lymphatischen System. Eine Veränderung im CD4⁺-T-Zell-Zytokinemilieu könnte einen Verlust dieser Balance darstellen und die Induktion von Autoimmunerkrankungen initiieren. Dies zeigt sich durch die Veränderungen im Zytokinemilieu in den CED-Lymphknoten. Die Ergebnisse konnten erstmals in-vivo immunologische Veränderungen in humanen Lymphknoten von CU-Patienten nachweisen, die den Ursprungsort für das Zytokinemilieu und die konsekutiven immunpathologischen Vorgänge in der Mukosa darstellen können. Die Ergebnisse zeigen eine TH2-Dominanz in den CU-Lymphknoten. Diese Veränderungen könnten Auswirkungen auf die Malignomentstehung im Fall der CU haben. Die Erkenntnisse über die Veränderungen des CD4⁺-T-Zell-Zytokinemilieus in den humanen Lymphknotenkompartimenten von CU-Patienten eröffnen neue Strategien in Bezug auf die Immunpathologie, die Diagnostik sowie auf die Entwicklung neuer immunmodulatorischer Therapiekonzepte.

Literaturverzeichnis

- [1] Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 521–533 (2003).
- [2] Podolsky, D. Inflammatory bowel disease. *N.Engl.J.Med.* **347**, 417–429 (2002).
- [3] Boirivant, M. & Cossu, A. Inflammatory bowel disease. *Oral Dis* **18**, 1–15 (2012).
- [4] Herold, G. *Innere Medizin* (Heorld Verlag, Bernhard-Falk-Straße 27, 50737 Köln, 2007).
- [5] Renz-Polster, H., Krautzig, S. & Braun, J. *Basislehrbuch Innere Medizin* (Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, Karlstraße 45, 80333 Münchene, 2006).
- [6] Hanauer, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* **12 Suppl 1**, S3–S9 (2006).
- [7] Böcker, W., Denk, H. & Heitz, P. U. *Pathologie* (Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, Karlstraße 45, 80333 München, 2004).
- [8] Aktories, K., Foerstermann, U., Hofmann, F. & Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, Karlstraße 45, 80333 München, 2005).
- [9] Ardizzone, S. & Porro, G. B. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs* **65**, 2253–2286 (2005).
- [10] Reiner, S. Development in motion: helper t cells at work. *Cell* **129**, 33–36 (2007).
- [11] Baumgart, D. & Carding, S. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**, 1627–1640 (2007).
- [12] Coombes, J., Robinson, N., Maloy, K., Uhlig, H. & Powrie, F. Regulatory t cells and intestinal homeostasis. *Immunol.Rev.* **204**, 184–194 (2005).
- [13] van Driel, I. & Ang, D. Role of regulatory t cells in gastrointestinal inflammatory disease. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **23**, 171–177 (2008).

- [14] Matsushita, M. *et al.* Appendix is a priming site in the development of ulcerative colitis. *World J.Gastroenterol.* **11**, 4869–4874 (2005).
- [15] Matsushita, M., Uchida, K. & Okazaki, K. Role of the appendix in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflammopharmacology.* **15**, 154–157 (2007).
- [16] Shih, D. & Targan, S. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J.Gastroenterol.* **14**, 390–400 (2008).
- [17] Gerseemann, M., Wehkamp, J. & Stange, E. F. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* **271**, 421–8 (2012).
- [18] Hoffmann, J. C., Kroesen, A. J. & Klump, B. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Handbuch für Klinik und Praxis* (Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14, 70469 Stuttgart, 2009).
- [19] Snoeck, V., Goddeeris, B. & Cox, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* **7**, 997–1004 (2005).
- [20] Lüllmann-Rauch, R. *Histologie* (Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14, 70469 Stuttgart, 2003).
- [21] Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**, 2066–2078 (2009).
- [22] Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V. Induction and effector functions of t(h)17 cells. *Nature* **453**, 1051–1057 (2008).
- [23] Kalies, K., Bleszenohl, M., Nietsch, J. & Westermann, J. T cell zones of lymphoid organs constitutively express th1 cytokine mrna: specific changes during the early phase of an immune response. *J.Immunol.* **176**, 741–749 (2006).
- [24] Kamradt, T. & Mitchison, N. A. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* **344**, 655–664 (2001).
- [25] Muraille, E. & Leo, O. Revisiting the th1/th2 paradigm. *Scand.J.Immunol.* **47**, 1–9 (1998).
- [26] Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A. Functional diversity of helper t lymphocytes. *Nature* **383**, 787–793 (1996).
- [27] Agnello, D. *et al.* Cytokines and transcription factors that regulate t helper cell differentiation: new players and new insights. *J.Clin.Immunol.* **23**, 147–161 (2003).
- [28] Mosmann, T. & Sad, S. The expanding universe of t-cell subsets: Th1, th2 and more. *Immunol.Today* **17**, 138–146 (1996).

- [29] Thomson, A. W. & Lotze, M. T. *The Cytokine Handbook - Volume 1*, vol. 4 (Academic Press - An Imprint of Elsevier Science, 84 Theoblad's Road, London WC1X8RR, UK, 2003).
- [30] Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. *Immunobiology: The Immune System in health and disease*, vol. 7th Edition (Garland Science Publishing, 29 West 35th Street, New York, NY 10001-2299, USA, 2008).
- [31] Kaiko, G., Horvat, J., Beagley, K. & Hansbro, P. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper t-cell response? *Immunology* **123**, 326–338 (2008).
- [32] Bouguen, G., Chevaux, J.-B. & Peyrin-Biroulet, L. Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* **17**, 547–556 (2011).
- [33] Amsen, D. *et al.* Direct regulation of gata3 expression determines the t helper differentiation potential of notch. *Immunity*. **27**, 89–99 (2007).
- [34] Fang, T. *et al.* Notch directly regulates gata3 expression during t helper 2 cell differentiation. *Immunity*. **27**, 100–110 (2007).
- [35] Brandtzaeg, P., Carlsen, H. S. & Halstensen, T. S. The b-cell system in inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* **579**, 149–167 (2006).
- [36] Macpherson, A., Khoo, U. Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J. & Bjarnason, I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* **38**, 365–375 (1996).
- [37] Noronha, A. M. *et al.* Hyperactivated b cells in human inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol* **86**, 1007–1016 (2009).
- [38] Ouyang, W., Kolls, J. & Zheng, Y. The biological functions of t helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. **28**, 454–467 (2008).
- [39] Liu, Z.-J., Yadav, P.-K., Su, J.-L., Wang, J.-S. & Fei, K. Potential role of th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **15**, 5784–5788 (2009).
- [40] Rouse, B. & Suvas, S. Regulatory t cells and immunity to pathogens. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **7**, 1301–1309 (2007).
- [41] Ito, T. *et al.* Two functional subsets of foxp3+ regulatory t cells in human thymus and periphery. *Immunity* **28**, 870–80 (2008).

- [42] Kronenberg, M. & Rudensky, A. Regulation of immunity by self-reactive t cells. *Nature* **435**, 598–604 (2005).
- [43] Melgar, S. *et al.* Over-expression of interleukin 10 in mucosal t cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin.Exp.Immunol.* **134**, 127–137 (2003).
- [44] Uhlig, H. *et al.* Characterization of foxp3+cd4+cd25+ and il-10-secreting cd4+cd25+ t cells during cure of colitis. *J.Immunol.* **177**, 5852–5860 (2006).
- [45] Yu, Q. *et al.* Expression and functional characterization of foxp3+ cd4+ regulatory t cells in ulcerative colitis. *Inflamm.Bowel.Dis.* **13**, 191–199 (2007).
- [46] Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A. & Yamamoto-Furusho, J.-K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 4280–8 (2008).
- [47] Fuss, I. J. *et al.* Disparate cd4+ lamina propria (lp) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. crohn’s disease lp cells manifest increased secretion of ifn-gamma, whereas ulcerative colitis lp cells manifest increased secretion of il-5. *J Immunol* **157**, 1261–1270 (1996).
- [48] Rogler, G. & Andus, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J.Surg.* **22**, 382–389 (1998).
- [49] Stallmach, A. *et al.* Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in crohn’s disease. *Int.J.Colorectal Dis.* **19**, 308–315 (2004).
- [50] Bamias, G. & Cominelli, F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. *Curr.Opin.Gastroenterol.* **23**, 365–369 (2007).
- [51] Brand, S. Crohn’s disease: Th1, th17 or both? the change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate th17 cells in the pathogenesis of crohn’s disease. *Gut* **58**, 1152–1167 (2009).
- [52] Schreiber, S., Heinig, T., Thiele, H. G. & Raedler, A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **108**, 1434–44 (1995).
- [53] Jung, R., Soondrum, K. & Neumaier, M. Quantitative pcr. *Clin Chem Lab Med* **38**, 833–836 (2000).
- [54] *User Bulletin 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, 5791 Van Allen Way, PO Box 6482, Carlsbad, California 92008, 2001).
- [55] Spitz, M., Gearing, A., Callus, M., Spitz, L. & Thorpe, R. Interleukin-2 in vivo: production of and response to interleukin-2 in lymphoid organs undergoing a

- primary immune response to heterologous erythrocytes. *Immunology* **54**, 527–532 (1985).
- [56] Carter, R. B cells in health and disease. *Mayo Clin.Proc.* **81**, 377–384 (2006).
- [57] Rodriguez, C., Bellas, C. & Brieva, J. A. Human germinal centre b cells inhibit mitogen-induced proliferation of mantle zone b cells. *Scand J Immunol* **35**, 745–750 (1992).
- [58] Scott, P. & Kaufmann, S. The role of t-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol.Today* **12**, 346–348 (1991).
- [59] Holt, P. G. Environmental factors and primary t-cell sensitisation to inhalant allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. *Pediatr Allergy Immunol* **6**, 1–10 (1995).
- [60] Smith, P. M. & Garrett, W. S. The gut microbiota and mucosal t cells. *Front Microbiol* **2**, 111 (2011).
- [61] Wilson, C. B. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. *J Pediatr* **108**, 1–12 (1986).
- [62] Bonner, R. F. *et al.* Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* **278**, 1481,1483 (1997).
- [63] Burgemeister, R. New aspects of laser microdissection in research and routine. *J Histochem Cytochem* **53**, 409–412 (2005).
- [64] Curran, S., McKay, J. A., McLeod, H. L. & Murray, G. I. Laser capture microscopy. *Mol Pathol* **53**, 64–68 (2000).
- [65] Emmert-Buck, M. R. *et al.* Laser capture microdissection. *Science* **274**, 998–1001 (1996).
- [66] Nietsch, J. *Das Zytokinmilieu in den Kompartimenten der gesunden Rattenmilz: Veränderungen während einer lokalen Immunantwort.* Ph.D. thesis, Univerität zu Lübeck (2006).
- [67] Klarenbeek, B. R. *et al.* Laparoscopic versus open sigmoid resection for diverticular disease: follow-up assessment of the randomized control sigma trial. *Surg Endosc* **25**, 1121–1126 (2011).
- [68] Siddiqui, M. R. S., Sajid, M. S., Khatrri, K., Cheek, E. & Baig, M. K. Elective open versus laparoscopic sigmoid colectomy for diverticular disease: a meta-analysis with the sigma trial. *World J Surg* **34**, 2883–2901 (2010).

- [69] Leung, K. L. *et al.* Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial. *Ann Surg* **231**, 506–511 (2000).
- [70] Ordemann, J., Jacobi, C. A., Schwenk, W., Stosslein, R. & Müller, J. M. Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. *Surg Endosc* **15**, 600–608 (2001).
- [71] Schwenk, W., Jacobi, C., Mansmann, U., Böhm, B. & Müller, J. M. Inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections - results of a prospective randomized trial. *Langenbecks Arch Surg* **385**, 2–9 (2000).
- [72] Tang, C. L. *et al.* Randomized clinical trial of the effect of open versus laparoscopically assisted colectomy on systemic immunity in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* **88**, 801–807 (2001).
- [73] Wichmann, M. W. *et al.* Immunological effects of laparoscopic vs open colorectal surgery: a prospective clinical study. *Arch Surg* **140**, 692–697 (2005).
- [74] Feng, T., Elson, C. O. & Cong, Y. Microbiota: dual-faceted player in experimental colitis. *Gut Microbes* **1**, 388–391 (2010).
- [75] Kraal, G., Samsom, J. N. & Mebius, R. E. The importance of regional lymph nodes for mucosal tolerance. *Immunol Rev* **213**, 119–130 (2006).
- [76] Worbs, T. *et al.* Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* **203**, 519–527 (2006).
- [77] Sakuraba, A. *et al.* Th1/th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in crohn’s disease. *Gastroenterology* **137**, 1736–1745 (2009).
- [78] Cook, M. The size and histological appearances of mesenteric lymph nodes in crohn’s disease. *Gut* **13**, 970–972 (1972).
- [79] Skinner, J. M. & Whitehead, R. A morphological assessment of immunoreactivity in colonic crohn’s disease and ulcerative colitis by a study of the lymph nodes. *J Clin Pathol* **27**, 202–206 (1974).
- [80] Herman, S., Zurgil, N., Langevitz, P., Ehrenfeld, M. & Deutsch, M. Methotrexate selectively modulates th1/th2 balance in active rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* **26**, 317–323 (2008).
- [81] Tsukada, Y., Nakamura, T., Iimura, M., Iizuka, B. & Hayashi, N. Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis. *Am.J.Gastroenterol.* **97**, 2820–2828 (2002).

- [82] Dokter, W. H., Esselink, M. T., Sierdsema, S. J., Halie, M. R. & Vellenga, E. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the interleukin-4 and interleukin-3 genes in human t cells. *Blood* **81**, 35–40 (1993).
- [83] Vora, P., Shih, D. Q., McGovern, D. P. & Targan, S. R. Current concepts on the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**, 1451–1477 (2012).
- [84] Martinez, F. O., Helming, L. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* **27**, 451–483 (2009).
- [85] Atreya, I. & Neurath, M. F. Understanding the delayed onset of action of azathioprine in ibd: are we there yet? *Gut* **58**, 325–326 (2009).
- [86] Löffler G, P. P. E. *Biochemie und Pathobiochemie* (Springer Verlag, 2003).
- [87] Raddatz, D., Bockemuhl, M. & Ramadori, G. Quantitative measurement of cytokine mrna in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **17**, 547–557 (2005).
- [88] Li, Z., Chen, L. & Qin, Z. Paradoxical roles of il-4 in tumor immunity. *Cell Mol Immunol* **6**, 415–422 (2009).
- [89] Francipane, M. G. *et al.* Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res* **68**, 4022–4025 (2008).
- [90] Osawa, E. *et al.* Predominant t helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer* **118**, 2232–2236 (2006).
- [91] Culig, Z. Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 308–314 (2011).

Abbildungsverzeichnis

1	Operationspräparate von CU- und MC-Patienten	2
2	Feedbacksystem des intestinalen Immunsystems	4
3	Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen . . .	7
4	Versuchsablauf	10
5	Kryosektion	12
6	Laser-Mikrodissektion	14
7	Immunhistochemische Proliferations- und T-Zell-Färbung der nicht-auto- reaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten	21
8	Proliferation in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone in nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten	22
9	CD4 ⁺ -T-Zell-Zytokin-Expression in Gesamtlymphknotenschnitten von nicht-autoreaktiven mLK und pLK	24
10	$\frac{CD3}{CD19}$ Ratio und $\frac{CD38}{CD19}$ Ratio in den Kompartimenten von nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten	25
11	Zytokinexpression in der T-Zell- und B-Zell-Zone von nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten	27
12	TH1- und TH2-Zytokinexpression in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone von nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten	28
13	Treg- und TH17-Zytokinexpression in der T-Zell-Zone und B-Zell-Zone von nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten . .	29
14	T-Zell-Zonenfläche von nicht-autoreaktiven mesenterialen und CED - Lymphknoten	31
15	$\frac{CD3}{CD19}$ -Ratio und $\frac{CD38}{CD19}$ -Ratio in den Lymphknotenkompartimenten von CU und MC Patienten	33
16	Expressionsveränderungen in den Kompartimenten der drainierenden CED-Lymphknoten	34
17	Verstärkte IL-4-Expression in den Kompartimenten der drainierenden Lymphknoten von CU-Patienten	35

Tabellenverzeichnis

1	Charakteristika der CED	3
2	Antikörper der Immunhistochemie	13
3	Immunhistochemische Färbungen	13
4	cDNA-Mastermix Ansatz	16
5	real-time RT-PCR Ansatz	16
6	Untersuchte Zytokine	16
7	Temperaturprogramm der real-time RT-PCR	17
8	Geschlechts- und Altersverteilung des Patientenkollektivs	20
9	Keimzentren der nicht-autoreaktiven Lymphknoten	22
10	CD4 ⁺ -T-Zell-Zellmarker und -Zytokinexpression im Keimzentrum von humanen nicht-autoreaktiven mesenterialen und peripheren Lymphknoten	30
11	Präoperative antiinflammatorische Therapie	31
12	Proliferation und Keimzentrenausbildung in humanen CED-Lymphknoten	32

A. Abkürzungsverzeichnis

APPAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle
°C	Grad Celcius
CASC-3	Cancer Candidate 3 (Housekeeping Gen)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
Ct	Cycle of threshold, Schwellenwert
CU	Colitis ulcerosa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithioeitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HEV	Hochendotheliale Venule
IDC	Interdigitierende dendritische Zelle
IFN	Interferon

A. Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
MC	Morbus Crohn
MHC	Major histocompatibility Complex
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mLK	Mesenterialer Lymphknoten
mM, M	Millimolar, Molar
nm	Nanometer
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NK-Zell	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphate buffered saline (Puffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pLK	Peripherer Lymphknoten
RNA	Ribonukleinsäure
RoR γ t	Rar-Related Orphan Receptor
RT	Raumtemperatur
TBS-T	Tris buffered saline Tween-20 (Puffer)
TGF	Transforming Growth Factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TH-Zellen	T-Helferzellen (CD4 ⁺ Lymphozyten)
TI-Ag	Thymus-independent Antigen

A. Abkürzungsverzeichnis

TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
U	Unit (Einheit)

B. Materialien

Chemikalien, Medien und Kits

Aceton, 99,8%, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APAAP, Maus, Monoklonal	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
	2% (v/v) N,N-Dimethylformamid
APAAP-Substrat	0,02% Naphtol AS-MX Phosphat
	0,1 mM Levamisole in 0,1 M TRIS, pH 8,2
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC-H ₂	0,1% DEPC (v/v) in Aqua bidest.
Einbettmedium, Tissue-Tek®	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Eindeckmittel, AQUATEX®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, 99,8%	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fast Blue BB Salt, Fast Red TR	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Formaldehydlösung, 37%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutardialdehydlösung, 25%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

B. Materialien

Levamisole	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol, 99,9%, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9 %, steril	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
Natriumhydroxid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Naphtol AS-MX Phosphat	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PFA 4%	4% PFA in PBS
Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins / Biotinylated	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen (Clone TEC-3)	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
TBS-Tween	0,05 M TRIS, 0,05% (w/v) Tween®20,
0,86% (w/v) NaCl in Aqua bidest., pH 7,6	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Toluidinblau	Waldeck GmbH & Co., Münster, Deutschland
Toluidinblau-Lösung (0,1%)	0,1% (w/v) Toluidinblau, 1% (v/v) Methanol,
15% (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O	

Tween®20

Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland

Glas- und Kunststoffmaterialien

Falcon®-Gefäße, 15 ml

BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg,
Deutschland

96 Well Multiply®-PCR-Platten,

Polypropylen mit Klebefolie

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Reaktionsgefäße, 0,5 und 1,5 ml,
Polypropylen

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Folienobjektträger, P.A.L.M.

Microlaser Technologies AG, Bernried,
Deutschland

PALM® Membrane Slides,

Polyethylenaphthalat, 1 mm

Microlaser Technologies AG, Bernried,
Deutschland

Geräte

Mikroskop Leitz Laborlux 12

Leitz, Wetzlar, Deutschland

Objektiv NPL FLUOTAR Phaco2
40x/0.70 - 160/0.17

Leitz, Wetzlar, Deutschland

PALM® MicroBeam, PALM® Ro-
boSoftware (Mikrodissektion)

P.A.L.M. Microlaser Technologies AG,

Bernried, Deutschland

Real-Time PCR, ABI PRISM® 7000

Sequence Detection System

Applied Biosystems, Darmstadt, Deutsch-
land

Real-Time PCR, ABI PRISM® 7900

B. Materialien

Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Serienschnittmikrotom,	
CM300 Kryostat	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Jung, Deutschland
Vakuumkonzentrationszentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage, OHAUS® Adventurer™	
AR0640, Messgenauigkeit 0,1 mg	Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland
Waage, Kern 440-51N,	
Messgenauigkeit 1 g	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, MiniSpin®Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Primer

Primer	Hersteller	Produktlänge(bp)
CASC-3	SuperArray	166
IFN- γ	SuperArray	129
IL-4	SuperArray	150
IL-10	SuperArray	188

Primer	Sequenz	Produktlänge (bp)
IL-2 for	5'- AAG AAT CCC AAA CTC ACC AGG AT -3'	86
IL-2 rev	5'- TCT AGA CAC TGA AGA TGT TTC AGT TCT G -3'	

B. Materialien

Primer	Sequenz	Produktlänge (bp)
IL-5 for	5'- CAT TTG AGT TTG CTA GCT CTT GGA -3'	73
IL-5 rev	5'- CCA ATG CAC TTG TGG GAA TTT -3'	
IL-6 for	5'- CCA GGA GCC CAG CTA TGA AC -3'	64
IL-6 rev	5'- CCC AGG GAG AAG GCA ACT G -3'	
IL-12p40 for	5'- ACG GTC ATC TGC CGC AAA -3'	79
IL-12p40 rev	5'- CCC ATT CGC TCC AAG ATG AG -3'	
IL-17 for	5'- GGT CAA CCT GAA CAT CCA TAA CC -3'	101
IL-17 rev	5'- CAT TGC GGT GGA GAT TCC A -3'	
FoxP3 for	5'- CAC CTG GCT GGG AAA ATG G -3'	63
FoxP3 rev	5'- GGA GCC CTT GTC GGA TGA T -3'	
ROR γ t for	5'- CAT CTC CAG CCT CAG CTT TGA -3'	108
ROR γ t rev	5'- TGT CTT GGT CCC CCA GAA GT -3'	
TGF- β for	5'- TCA GCT CCA CGG AGA AGA ACT -3'	104
TGF- β rev	5'- GTT GGC ATG GTA GCC CTT GG -3'	
CD3 for	5'- CAT CCC AAA GTA TTC CAT CTA CTT TTC -3'	70
CD3 rev	5'- CCC AGT CCA TCC CCA GAG A -3'	
CD19 for	5'- AGG ACT GGT GGC TGG AAG GT -3'	67
CD19 rev	5'- CAA GGG AAC ACA GGC AGA AGA -3'	
CD25 for	5'- AAC CTC CAC CAT GGG AAA ATG -3'	81
CD25 rev	5'- GGA CGC ACT GAT AAT AAA CCA TCT G -3'	

C. Rohdaten

Patientenkollektiv

		Männlich	Weiblich	Gesamt	Alter zum Operationszeitpunkt [Jahre]
Gesund	<i>mLK</i>	2	4	6	64 ± 15
	<i>pLK</i>	4	2	6	73 ± 8
Erkrankt	<i>CU</i>	4	2	6	46 ± 16
	<i>MC</i>	4	1	5	39 ± 6

Präoperative antiinflammatorische Medikation

		<i>Gesund</i>	<i>CU</i>	<i>MC</i>
Glukokortikoide	<i>Systemisch</i>	-	1	2
	<i>Lokal</i>	-	1	-
Azathioprin		-	2	3
Mesalazin (5-ASA)		-	3	-
Methotrexat		-	-	1
Immunmodulatorische Therapie (Infliximab etc.)		-	-	-
Keine medikamentöse Therapie		6		1

Zellproliferation auf 1000 μm^2

		T-Zell-Zone	B-Zell-Zone
pLK	Mittelwert	0,75	0,43
	Std.-Abw.	0,19	0,11
mLK	Mittelwert	0,84	0,47
	Std.-Abw.	0,17	0,17
CU	Mittelwert	0,62	0,35
	Std.-Abw.	0,19	0,18
MC	Mittelwert	0,86	0,34
	Std.-Abw.	0,25	0,12

Fläche der Lymphknotenkompartimenten

		T-Zell-Zone	B-Zell-Zone	Keimzentrum
pLK	Mittelwert	24.940.000	1.428.265	65.090
	Std.-Abw.	9.748.285	1.052.074	34.582
mLK	Mittelwert	6.648.726	1.046.809	42.846
	Std.-Abw.	5.727.253	750.428	17.537
CU	Mittelwert	18.614.697	1.756.548	30.000
	Std.-Abw.	10.017.076	905.762	9.011
MC	Mittelwert	9.928.568	577.635	36.175
	Std.-Abw.	4.625.610	353.393	18.077

Einheit: μm^2

Zellmarker- und Zytokinexpression

Ganzer Lymphknotenschnitt

	pLK		mLK		CU		MC	
	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.
CD3	8,0705	1,4961	12,8920	7,5487	18,5251	8,0933	18,9678	7,2821
CD19	2,0597	0,4711	3,8148	2,1503	3,2198	0,9470	3,6754	1,6667
CD25	0,5137	0,2752	0,8760	0,4563	0,7334	0,2761	1,0269	0,4685
CD38	0,3637	0,1397	0,4991	0,4758	0,5575	0,4074	0,4270	0,1914
IgD	0,0081	0,0053	0,0167	0,0262	0,0170	0,0299	0,0069	0,0043
FoxP3	0,2499	0,0785	0,5332	0,4654	0,4368	0,2416	0,6291	0,3013
RoRγt	0,0165	0,0108	0,0239	0,0251	0,0182	0,0249	0,0373	0,0263
IL-2	0,0372	0,0206	0,0216	0,0110	0,0274	0,0216	0,0493	0,0230
IL-4	0,0038	0,0023	0,0089	0,0081	0,0052	0,0034	0,0826	0,1672
IL-5	0,0095	0,0030	0,0277	0,0258	0,0142	0,0069	0,0272	0,0090
IL-6	0,0637	0,0479	0,2092	0,1934	0,3516	0,4502	0,2187	0,1197
IL-10	0,0403	0,0215	0,0478	0,0244	0,0558	0,0380	0,0252	0,0172
IL-12p40	0,0060	0,0028	0,0103	0,0064	0,0193	0,0159	0,0120	0,0088
IL-17	0,1059	0,1048	0,0043	0,0047	0,0043	0,0075	0,0585	0,0417
IFN-γ	0,0773	0,0233	0,0480	0,0223	0,1015	0,0556	0,1352	0,0977
TGF-β	1,4993	0,4879	1,5484	0,9600	0,9864	0,6504	1,6538	0,8216

T-Zell-Zone

	pLK		mLK		CU		MC	
	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.
CD3	20,1259	9,7800	16,4001	7,9548	17,2758	14,0951	34,4242	27,1637
CD19	2,6384	1,7641	1,2050	0,7625	2,6299	2,1877	6,6855	13,4075
CD25	0,6153	0,1959	0,8817	0,3360	0,7797	0,3979	1,1467	0,7347
CD38	0,0754	0,0541	0,1367	0,1006	0,1908	0,2065	0,2206	0,2529
IgD	0,1648	0,2007	0,2696	0,3068	0,0877	0,0529	0,0814	0,0688
FoxP3	0,5079	0,2525	0,5393	0,2879	0,4280	0,3434	1,2012	0,8369
RoRγt	0,2021	0,2885	0,0865	0,0555	0,0622	0,0477	0,0825	0,0390
IL-2	0,1828	0,0707	0,1137	0,0408	0,2326	0,1857	0,3306	0,2831
IL-4	0,0167	0,0262	0,0304	0,0263	0,3106	0,1696	0,0087	0,0046
IL-5	0,1423	0,1453	0,0883	0,0332	0,3896	0,3000	0,1405	0,1521
IL-6	0,1254	0,0612	0,0728	0,0596	0,2799	0,2448	0,2377	0,0921
IL-10	0,0063	0,0072	0,0162	0,0146	0,0714	0,0708	0,0315	0,0248
IL-12p40	0,0949	0,0706	0,0437	0,0330	0,5041	0,3345	0,1275	0,1266
IL-17	0,0351	0,0284	0,0563	0,0814	0,0430	0,0236	0,0169	0,0139
IFN-γ	0,1696	0,1119	0,1088	0,0658	0,2316	0,2184	0,0912	0,0687
TGF-β	1,3013	0,7717	1,2449	0,5735	1,3866	1,0244	1,9741	1,7420

C. Rohdaten

B-Zell-Zone

	pLK		mLK		CU		MC	
	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.
CD3	6,7103	3,8452	3,8104	2,7635	11,7743	11,5315	13,5055	8,9042
CD19	10,8954	5,3465	9,0771	3,2957	20,6536	16,5980	19,6132	12,0744
CD25	0,4366	0,1514	0,3093	0,0732	1,3703	1,0780	1,1321	0,4560
CD38	0,0734	0,0494	0,0812	0,0817	0,1760	0,1738	0,3735	0,2663
IgD	0,0555	0,0448	0,1565	0,2584	0,0638	0,0653	0,4622	0,5447
FoxP3	0,2056	0,1546	0,2450	0,0765	0,5710	0,6935	0,5617	0,2774
RoRγt	0,0404	0,0291	0,0097	0,0082	0,0884	0,1164	0,0307	0,0250
IL-2	0,1186	0,0737	0,0970	0,0282	0,0537	0,0323	0,1859	0,1497
IL-4	0,0166	0,0183	0,0300	0,0217	0,3000	0,4061	0,0153	0,0123
IL-5	0,0597	0,0376	0,1935	0,1136	0,0852	0,0464	0,1017	0,0256
IL-6	0,2919	0,2719	0,2435	0,2637	0,6624	0,3989	0,6700	0,4347
IL-10	0,0375	0,0342	0,0397	0,0295	0,0828	0,0746	0,0068	0,0040
IL-12p40	0,0205	0,0121	0,0440	0,0397	0,4996	0,4558	0,0304	0,0268
IL-17	0,0302	0,0311	0,1012	0,1701	0,0456	0,0411	0,0311	0,0224
IFN-γ	0,1347	0,0364	0,1464	0,0256	0,1211	0,1156	0,2087	0,1313
TGF-β	1,6272	1,5340	0,6814	0,8627	3,6237	2,8067	3,7706	2,7378

C. Rohdaten

Keimzentrum

	pLK		mLK		CU		MC	
	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.
CD3	5,3196	2,6634	3,0555	2,9599	3,4371	2,3674	6,3940	2,0761
CD19	8,8493	2,4592	6,1996	4,0389	5,8639	4,0203	6,6832	3,2999
CD25	0,4950	0,2457	0,3865	0,1740	0,6699	0,2235	0,2535	0,1486
CD38	1,1916	1,4578	0,6612	0,3520	0,1884	0,1488	0,7188	0,5503
IgD	0,1302	0,1434	0,2456	0,2202	0,0984	0,0531	0,1178	0,1257
FoxP3	0,1004	0,0409	0,0762	0,0870	0,1064	0,0851	0,0427	0,0355
RoRγt	0,0174	0,0127	0,0672	0,0690	0,0348	0,0390	0,0244	0,0224
IL-2	0,0432	0,0141	0,0583	0,0361	0,0248	0,0079	0,0674	0,0605
IL-4	0,0237	0,0337	0,0105	0,0081	0,1363	0,0955	0,0071	0,0082
IL-5	0,0695	0,0765	0,0601	0,0394	0,3001	0,2375	0,0337	0,0141
IL-6	0,0640	0,0520	0,0791	0,0638	0,2667	0,3829	0,2089	0,3325
IL-10	0,0241	0,0186	0,0151	0,0128	0,0397	0,0325	0,0686	0,0373
IL-12p40	0,0117	0,0133	0,0694	0,0496	0,0616	0,0454	0,0128	0,0126
IL-17	0,0169	0,0149	0,0343	0,0365	0,0387	0,0330	0,0391	0,0447
IFN-γ	0,1214	0,0523	0,0708	0,0358	0,2721	0,1705	0,0530	0,0214
TGF-β	2,6912	2,5113	0,9394	0,7135	0,7699	0,6400	1,6113	0,6980

D. Ethikantrag

Es erfolgte vor Durchführung dieser Studie die Prüfung der Experimente durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck unter berufsethischen, medizinisch - wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten. Die Bewilligung ohne Bedenken erfolgte am 25.09.2006 (Aktenzeichen: 06-131).



Universität zu Lübeck
Institut für Anatomie
(Direktor: Prof. Dr. J. Westermann)

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Klinik für Chirurgie
(Direktor: Prof. Dr. H.-P.H.-P.Bruch)

Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck



Identifikationsnummer:					
------------------------	--	--	--	--	--

Die Verteilung der T_{H1}-spezifischen und T_{H2}-spezifischen Zytokine in den Kompartimenten des Lymphknotens

Patienteninformation

Bitte lesen Sie diese Patienteninformation sorgfältig durch. Ihr Arzt bzw. der Studienbetreuer wird mit Ihnen auch direkt über die Studie sprechen. Bitte fragen Sie Ihren Arzt bzw. den Studienbetreuer, wenn Sie etwas nicht verstehen oder wenn Sie zusätzlich etwas wissen möchten.

Diese Studie wird durch das Institut für Anatomie (Direktor: Prof. Dr. J. Westermann) der Universität zu Lübeck in Zusammenarbeit mit der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durchgeführt.

Ihre Ansprechpartner:

- Prof. Dr. J. Westermann (Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck); Telefon: 0451 / 500 4031
- D. Ellebrecht (Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck)
- Dr. C. Eckmann (Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck); Telefon: 0451 / 500 3622

Hintergrund der Studie

Das Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. J. Westermann), beschäftigt sich wissenschaftlich unter anderem mit der Erforschung der Bedeutung von T-Lymphozyten und ihrer Funktion bei einer Immunantwort des Körpers auf eindringende Keime. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Regulation dieser Helferzellen gelegt, um Wege zu finden, erwünschte Immunantworten zu verstärken und unerwünschte Immunantworten abzuschwächen.

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, (Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch) sollen die zuvor in verschiedenen Vorversuchen erworbenen Erkenntnisse über die Regulation der Immunantwort und hier ganz besonders die Stellung der T-Lymphozyten in diesem Regulationskreislauf am Menschen

Die Verteilung der T_{H1}-spezifischen und T_{H2}-spezifischen Zytokine in den Kompartimenten des Lymphknotens

untersucht werden.

Was ist das Ziel dieser Studie?

Bei dieser Studie sollen die Botenstoffe der T-Lymphozyten (so genannte Zytokine) in den Lymphknoten untersucht werden. Während Entzündungsreaktionen verändert sich nicht nur die Zahl der weißen Blutkörperchen, sondern auch die Konzentration ihrer Botenstoffe. Es soll ein Vergleich zwischen Lymphknoten, die sich in Ruhe befinden, und Lymphknoten, die sich in einer Entzündungsreaktion befinden (z.B. Colitis ulcerosa oder M. Crohn), erforscht werden. Des Weiteren ist ein Ziel, Botenstoff-Konzentrationen der T-Lymphozyten in Beziehung zum Krankheitsgeschehen zu setzen, um mögliche Vorhersagen über die Krankheitsursache und den Krankheitsverlauf machen zu können.

Für diese Studie werden Patienten ausgewählt, bei denen im Operationsgeschehen Lymphknoten ohnehin entfernt werden müssen, um diese in Zusammenarbeit mit der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, gezielt zu untersuchen.

Was möchten wir von Ihnen?

Wenn Sie an dieser Studie teilnehmen, werden die Ergebnisse der Lymphknoten-Untersuchung und Ihre übrigen klinischen Daten in pseudonymisierter Form (d. h. die persönlichen Daten werden getrennt von den medizinischen Daten gespeichert) in unsere Studien-Datenbank übernommen.

Um die erhobenen Daten möglichst umfassend auswerten zu können, sind ggf. Kooperationen mit anderen Forschungsinstitutionen geplant.

Selbstverständlich wird in diesem Fall die Weitergabe von Proben und Informationen an wissenschaftliche Partner ausschließlich in verschlüsselter Form erfolgen. Eine Weitergabe von Daten oder Proben an unberechtigte Dritte (insbesondere Arbeitgeber, Versicherungen) findet nicht statt.

Die erhobenen Daten und die Lymphknotenproben werden für 25 Jahre gespeichert bzw. verwahrt, um sie für spätere Untersuchungen oder Aufklärung von langfristigen Komplikationen zur Verfügung stellen zu können.

Für Sie entsteht kein finanzieller oder zusätzlicher zeitlicher Aufwand. Die Dauer der Studienteilnahme beschränkt sich auf Ihren Krankenhausaufenthalt.

Gibt es Risiken, Beschwerden oder Begleiterscheinungen?

Die Risiken bewegen sich in dem Rahmen, der für die jeweilige Operation gilt. Über diese Risiken werden Sie gesondert durch den Arzt, der die Operation durchführt, informiert. Für die Untersuchungen der Organe gibt es keine weiteren Risiken, da diese schon zuvor in der Operation entnommen wurden.

Welche Vorteile bringt die Studie für Sie?

Aufgrund der geplanten Untersuchung ergibt sich für Sie kein kurzfristiger Nutzen. Durch die gewonnenen Daten wird es in Zukunft möglich sein, entzündliche Prozesse besser beurteilen und neue Therapiestrategien festlegen zu können.

Welche Rechte haben Sie?

Sie haben das Recht, Auskunft über alle von Ihnen gespeicherten Daten zu erhalten (Auskunftsrecht). Sie haben weiterhin das Recht, Ihre Einwilligung zur Studienteilnahme zurückzuziehen (Widerrufsrecht). Außerdem bleiben Sie Eigentümer Ihrer in der Biomaterialbank gelagerten Lymphknotenproben (Eigentumsrecht). Das heißt, Sie haben uns Ihre Lymphknotenproben nur zur wissenschaftlichen Untersuchung zur Verfügung gestellt, aber

Die Verteilung der T_{H1}-spezifischen und T_{H2}-spezifischen Zytokine in den Kompartimenten des Lymphknotens

die Lymphknotenproben gehören Ihnen (soweit sie noch nicht für Analysen verbraucht wurde). Sie können jederzeit fordern, dass die noch von Ihnen vorhandenen Lymphknotenproben vernichtet werden.

Es ist möglich, dass sich in Zukunft eine kommerzielle Nutzung der Forschungsergebnisse ergibt. Mit Ihrer Einwilligung verzichten Sie auf das Recht an den aus Ihren Lymphknotenproben bestimmten Werten (Datenhoheit), auf das Recht an den mit diesen Daten erzielten wissenschaftlichen Ergebnissen (Urheberrecht) und auf das Recht zur wirtschaftlichen Verwertung dieser Erkenntnisse (insbesondere Patente).

Welche Daten werden über Sie gespeichert?

Es wird zwischen zwei Arten von Datensätzen unterschieden:

- Ihre *Stammdaten* beinhalten Name, Vorname, Geburtsdatum. Diese Daten sind nur dem studienausführenden Arzt und einem mit der Eingabe betrauten Mitarbeiter bekannt.
- Ihre *medizinischen Daten* enthalten alle Ihre klinischen Daten (z. B. Ihre Laborwerte, OP-Berichte, Medikamente) und die Daten der Lymphknotenuntersuchung.

Ihre medizinischen Daten werden getrennt von den Stammdaten unter einem Pseudonym (d.h. ohne direkten Bezug zu ihrer Person) gespeichert und analysiert. Auch die Lymphknotenproben werden pseudonymisiert gelagert. Dieses Pseudonym besteht aus einer Zahlenkombination von mehreren Ziffern. Die Zuordnung von medizinischen Daten zu persönlichen Daten (Stammdaten) ist nur über eine Referenzliste möglich.

Alle an der Datenerhebung, -verarbeitung und -auswertung beteiligten Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet.

Die Daten werden nur dem Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, und der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, zugänglich sein und werden nicht an unberechtigte Dritte (insbesondere Arbeitgeber, Versicherungen) weitergegeben.

Die Daten aus den medizinischen Daten und den Stammdaten werden für 25 Jahre im Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, gesichert verwahrt, um sie für eine eventuelle spätere Nachuntersuchung oder zur Aufklärung einer langfristigen Komplikation der anstehenden Operation zur Verfügung zu stellen. Die entnommenen Lymphknotenproben werden, soweit sie nicht durch die Analysen verbraucht werden, ebenfalls für 25 Jahre bei -80°C verwahrt.

Die Proben werden nach der 25 jährigen Verwahrung, soweit sie nicht zuvor in den Untersuchungen aufgebraucht wurden, autoklaviert und anschließend durch Verbrennung durch das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein entsorgt.

Wem sind die medizinischen Daten zugänglich?

Auf die in der Studien-Datenbank gespeicherten medizinischen Daten (ohne direkten Bezug zu ihrer Person), haben Wissenschaftler und Ärzte im Rahmen der Studie befristeten Zugriff.

Darüber hinaus können die pseudonymisierten Daten für die Durchführung von Forschungsprojekten an inhaltlich ähnlich ausgerichtete medizinische Forschungsnetze weitergegeben werden, wenn dies durch den Studienleiter geprüft und genehmigt wurde. Die Zuordnungsmöglichkeit verbleibt im Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck und der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Bei einer möglichen Publikation, d. h. der wissenschaftlichen Bekanntgabe der Studienergebnisse, wird aus den Daten nicht hervorgehen, wer an dieser Studie teilgenommen hat. Ein Bezug zu Ihrer Person kann nicht hergestellt werden.

Freiwilligkeit der Teilnahme

Selbstverständlich ist ihre Teilnahme an dieser Studie freiwillig. Sie können Ihr Einverständnis jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen. Dadurch entstehen Ihnen keinerlei

Die Verteilung der T_{H1}-spezifischen und T_{H2}-spezifischen Zytokine in den Kompartimenten des Lymphknotens

Nachteile in der weiteren Behandlung oder ärztlichen Versorgung.
Sollten Sie Ihr Einverständnis widerrufen, werden keine weiteren Daten über Ihre Person zum Zweck des oben genannten Projekts erhoben und aufgezeichnet. Sie haben das Recht, die Vernichtung aller über Sie gespeicherten Daten sowie eine Vernichtung Ihrer Lymphknotenproben (soweit sie noch nicht verbraucht ist) zu verlangen, sofern gesetzliche Bestimmungen der Vernichtung nicht entgegenstehen. Möglicherweise müssen allerdings aus Gründen der Wahrung gesetzlicher Dokumentationspflichten die bis zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Daten und Lymphknotenproben weiter verarbeitet und gespeichert werden. Es erfolgt dann eine Anonymisierung der Daten, d.h. eine Zuordnung zu Ihrer Person ist *nie* mehr möglich.

Gerne stehen wir Ihnen für weitere Rückfragen in einem persönlichen Gespräch zur Verfügung.



Universität zu Lübeck
Institut für Anatomie
(Direktor: Prof. Dr. J. Westermann)

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Klinik für Chirurgie
(Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch)

Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck



Identifikationsnummer:					
------------------------	--	--	--	--	--

Die Verteilung der T_{H1}-spezifischen und T_{H2}-spezifischen Zytokine in den Kompartimenten des Lymphknotens

Sehr geehrte Frau / Sehr geehrter Herr.....,

hiermit bitten wir Sie um ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung Ihrer Lymphknoten sowie Ihrer personenbezogenen und medizinischen Daten im Rahmen der oben genannten Studie.

Einwilligungserklärung

zur Teilnahme an der Erforschung Verteilung der TH1-spezifischen und TH2-spezifischen Zytokine in den Kompartimenten des Lymphknotens am Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. J. Westermann) und an der Klinik für Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Hiermit erkläre ich, dass ich mündlich und schriftlich über Zweck, Ablauf und Bedeutung dieser Studie sowie über die mit der Studie verbundenen Vorteile und Risiken aufgeklärt wurde und ausreichend Gelegenheit hatte, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit der/dem Ärztin/Arzt bzw. dem Studienbetreuer zu klären. Über meine Rechte bin ich informiert worden. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Studienteilnahme zu überdenken und frei zu treffen. Ich habe die mir vorgelegte Patienteninformation verstanden und eine Ausfertigung derselben und dieser Einwilligungserklärung erhalten.

Ich bin bereit, an dem o.g. Vorhaben teilzunehmen und bin insbesondere auch damit einverstanden, dass meine Lymphknotenproben für die Erforschung der Regulationsmechanismen der T-Lymphozyten in den Lymphknoten untersucht werden, und dass meine medizinischen und persönlichen Daten (Stammdaten) in einer Studien-Datenbank gemäß vorliegender Patienteninformation gespeichert werden.

Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der anstehenden Operation mehrere Lymphknoten, die im Operationsgeschehen ohne hin entfernt werden, untersucht werden, und dass diese Lymphknotenproben im Institut für Anatomie und in der Klinik für Chirurgie in pseudonymisierter Form verarbeitet, gelagert und für wissenschaftliche Zwecke analysiert werden dürfen.

Ich stimme zu, dass die Lymphknotenproben und meine medizinischen Daten unter der Verantwortung der oben genannten Institutionen für Studien mit allen wissenschaftlich in Betracht kommenden Fragestellungen in pseudonymisierter Form verwendet werden, insbesondere für die Untersuchung der

Die Verteilung der T_{H1}-spezifischen und T_{H2}-spezifischen Zytokine in den Kompartimenten des Lymphknotens

Zytokin-Verteilungsmuster in den Lymphknoten.

Ich bin einverstanden, dass zur weiteren Analyse und Auswertung der erhobenen Daten und Lymphknotenproben andere Forschungsinstitutionen beteiligt werden können und ich stimme zu, dass an diese Institutionen ggf. medizinische Daten oder Probenmaterial **mit Pseudonym** weitergegeben werden darf.

Ich bin damit einverstanden, dass meine persönlichen Daten (Name, Vorname, Geburtsdatum) - getrennt von den Gesundheitsdaten - gespeichert wird.

Ich bin damit einverstanden, dass die erhobenen Daten und die Lymphknotenproben für 25 Jahre verwahrt werden, um sie für eine eventuelle Nachuntersuchung oder Aufklärung von langfristigen Komplikationen, die für mich durch die anstehende Operation entstehen können, zur Verfügung stellen zu können.

Ich bin mir bewusst, dass ich für die Teilnahme an der Studie kein Entgelt erhalte.

Ich bin mit einer eventuellen kommerziellen Nutzung der Forschungsergebnisse dieser Studie und meiner Lymphknotenproben sowie meiner medizinischen Daten einverstanden und verzichte hiermit auf die möglicherweise entstehenden wirtschaftlichen Verwertungs- und Urheberrechte an den mir entnommenen Proben und den gewonnenen Daten. Ich bin mir bewusst, keinerlei Ansprüche auf Vergütung, Tantiemen oder sonstige Beteiligung an finanziellen Vorteilen oder Gewinnen zu haben, die möglicherweise auf der Basis der Forschung mit meiner Lymphknotenproben erlangt werden. Meine Persönlichkeitsrechte (insbesondere mein Recht auf Auskunft, Berichtigung, Widerspruch gegen die Weiterverarbeitung, Sperrung und Löschung meiner Daten sowie Vernichtung meiner Körpersubstanzen) bleiben hiervon unberührt.

Mir ist bekannt, dass ich auf Anfrage Auskunft über alle über mich gespeicherten Daten erhalte, wenn ich das wünsche.

Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten jederzeit widersprechen kann. Im Falle eines Widerrufs werden alle meine Daten sowie meine Lymphknotenproben vernichtet, sofern gesetzliche Bestimmungen der Vernichtung nicht entgegenstehen.

☐ **JA** ☐ **NEIN**

Information und Einwilligungserklärung zum Datenschutz Bei der oben genannten Studie werden persönliche Stammdaten und medizinische Daten (z.B. Ergebnisse der Operation) erhoben. Die Speicherung, Auswertung und Weitergabe dieser Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen in pseudonymisierter Form und setzt vor Teilnahme an der Studie folgende freiwillige Einwilligung voraus: Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Untersuchung Lymphknotenproben von mir eingelagert sowie analysiert und die daraus gewonnen Daten gespeichert und wissenschaftlich ausgewertet werden. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene medizinische Daten/Krankheitsdaten auf elektronischen Datenträgern ohne Namensnennung aufgezeichnet, gespeichert, verarbeitet und weitergegeben und dass diese medizinische Daten <i>ohne Namensnennung</i> über das Pseudonym mit meinen Lymphknotenproben korreliert und für wissenschaftliche Zwecke analysiert werden.	☐ JA ☐ NEIN
---	---

**Die Verteilung der T_{H1}-spezifischen und T_{H2}-spezifischen Zytokine in den
Kompartimenten des Lymphknotens**

Nachname: _____	Vorname: _____
Geburtsdatum: _____	Geburtsort: _____
_____ Ort, Datum (vom Patienten auszufüllen)	_____ Unterschrift der Patientin / des Patienten

Bestätigung des aufklärenden Arztes bzw. des Studienbetreuers

Die Patientin/der Patient, Frau/Herr.....wurde von mir über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Teilnahme an der o.g. Studie in mündlicher und schriftlicher Form aufgeklärt. Ihre/seine Fragen habe ich zu ihrer/seiner Zufriedenheit beantwortet. Die Patientin/der Patient hat ohne Zwang die Einwilligung in die Studienteilnahme erklärt. Ein Exemplar der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung wurde ihr/ihm ausgehändigt.

Folgende Fragen des Patienten wurden beantwortet:

Name des aufklärenden Arztes bzw. des Studienbetreuers (in Druckschrift): _____		
_____ Ort	_____ Datum	_____ Unterschrift des aufklärenden Arztes bzw. Studienbetreuers

E. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jürgen Westermann, der mir dieses spannende Thema für meine Doktorarbeit überlassen und mich auf dem Weg zu dieser Dissertation hervorragend unterstützt und beraten hat. Diese Unterstützung beinhaltet neben der materiellen und finanziellen Ausstattung für die Experimente auch die konkrete Planung und Auswertung der Versuche sowie die Arbeit an humanen Proben. Hierbei möchte ich die Arbeit an humanen Lymphknotenproben erwähnen, da sie aus meiner Sicht als ein spezielles Merkmal meine Arbeit charakterisiert.

Des Weiteren möchte ich Dr. med. vet. Maike Blessenohl und Dr. rer. nat. Kathrin Kalies für die guten Ideen und die Betreuung meines Promotionsvorhabens, das ohne ihre verlässliche Unterstützung in Planung, Durchführung und Auswertung in dieser Weise nicht hätte durchgeführt werden können. Zudem möchte ich mich bedanken bei Lidija Gutjahr, Marie-Luise Leppin, Karola von Lingelsheim und Petra Lau, die mir den Einstieg in die Methoden meiner Doktorarbeit durch kompetentes und geduldiges Lehren erleichterten, mich in speziellen Fragen der Experimentendurchführung unterstützten und so den Erfolg dieser Arbeit in nicht zu unterschätzenden Maß garantierten.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch, Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, und PD Dr. med. Ralf Eckmann, Klinikum Peine, und Prof. Dr. med. Feller und Dr. med. Florian Stellmacher, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, herzlich bedanken für ihre Unterstützung der Probengewinnung sowie weitere intellektuelle Anreize, die ich dank ihrer Anregung in meiner Arbeit verfolgen konnte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich auf dem langen Weg zu dieser Dissertation unterstützt und begleitet hat. Danke!

F. Lebenslauf

David Benjamin Ellebrecht

Geboren am 23. März 1982 in Lübeck

Eltern: Dr. med. Thomas Ellebrecht (Arzt)
Gudrun Ellebrecht, geborene Walter (Krankenschwester, Management)

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schul Ausbildung

1989 - 1993 Grundschole Lauerholz, Lübeck

1993 - 2002 Besuch des humanistischen Gymnasium *Katharineum zu Lübeck*, Abschluss: Abitur (Note: Sehr gut (1,4));
Auszeichnung für hervorragende Leistungen im Fach Physik

Zivildienst

August 2002 - Mai 2003 Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Hochschulausbildung

Oktober 2003 - November 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

August 2005 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum) gemäß
Approbationsordnung (Note: Sehr gut (1,5))

F. Lebenslauf

Seit August 2006

Dissertation im Institut für Anatomie in Zusammenarbeit mit der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bei Prof. Dr. med. J. Westermann: *"In-vivo Untersuchung des CD4⁺-T-Zell - Zytokinmilieus in den Kompartimenten von humanen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn Lymphknoten"*; gefördert durch das Promotionsstipendium Exzellenzmedizin (2006 - 2007)

Famulaturen / Praktisches Jahr

Medizinische Klinik II, UK-SH, Campus Lübeck (2006)
Chirurgische Gemeinschaftspraxis Dr. med. Ucke und Dr. Ellebrecht (2006)
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, UK-SH, Campus Lübeck (2007)
Klinik für Radiologie, UK-SH, Campus Lübeck (2007)
Klinik für chirurgische Orthopädie, Kantonsspital Sankt Gallen (2008)
Klinik für innere Medizin, Klinikum Neustadt (2009)
Klinik für Chirurgie, UK-SH, Campus Lübeck (2009)

Oktober / November 2009

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung gemäß Approbationsordnung (Gesamtnote: sehr gut)

Beruflicher Werdegang

Seit Dezember 2009

Assistenzarzt in der Klinik für Chirurgie, UK-SH, Campus Lübeck

Januar 2012

Qualifikation zum Arzt für Notfallmedizin