

Verteilung und Funktion immunkompetenter Zellen
während der Entwicklung und des Absetzens
im jejunalen Schweinedarm

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologe Andreas Post

geboren am 18.04.1969 in Merseburg

Gutachter: Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter
Prof. Dr. Jürgen Zentek

eingereicht am 22.08.2011

verteidigt am 17.02.2012

1	<u>EINFÜHRUNG</u>	8
1.1	ALLGEMEINE EINFÜHRUNG IN DAS DARMIMMUNSYSTEM	8
1.2	DAS SCHWEIN ALS MODELLTIER FÜR DAS DARMIMMUNSYSTEM	11
1.2.1	ENTWICKLUNG, MORPHOLOGIE UND DARSTELLUNG IMMUNKOMPETENTER STRUKTUREN	12
1.2.2	VERÄNDERUNGEN DURCH DAS ABSETZEN DER FERKEL UND FRAGESTELLUNGEN	21
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	25
2.1	HERKUNFT, ENTNAHME, KRYOKONSERVIERUNG VON GEWEBEPROBEN	25
2.2	HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITT-PRÄPARATEN	26
2.3	IMMUNHISTOLOGISCHE FLUORESZENZFÄRBUNGEN	27
2.3.1	FÄRBEPROTOKOLL	28
2.4	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	29
2.4.1	FÄRBEPROTOKOLL	30
2.5	ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN; KLONIERUNG	31
2.5.1	VERMEHRUNG VON <i>E. COLI</i> ZUR VERVIELFACHUNG VON PLASMIDEN	31
2.5.2	PRÄPARATIVE PLASMIDISOLIERUNG AUS <i>E. COLI</i>	31
2.5.3	RESTRIKTION VON PLASMIDEN UND DNS-FRAGMENTEN	32
2.5.3.1	Verwendete Restriktionsendonukleasen	32
2.5.3.2	Agarose Gelelektrophorese	32
2.5.3.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.5.4	LIGATION VON PLASMIDEN UND DNA-FRAGMENTEN	32
2.5.5	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	33
2.5.6	SELEKTION VON TRANSFORMANTEN	33
2.5.7	HERSTELLUNG UND LAGERUNG VON STAMMKULTUREN	33
2.5.8	ISOLATION VON GESAMT-RNS AUS ZELLKULTUREN	34
2.5.9	UMSCHREIBEN VON (M)RNS IN (C)DNS DURCH REVERSE TRANSKRIPTION	35
2.5.10	AMPLIFIKATION VON DNS-FRAGMENTEN DURCH PCR	36
2.5.11	BESTIMMUNG VON RNS- UND DNS-KONZENTRATIONEN	36
2.5.12	VORSICHTSMAßNAHMEN BEIM ARBEITEN MIT RNS	36
2.6	HERSTELLUNG VON DIG-MARKIERTEN RNS-SONDEN	37
2.6.1	VORBEREITUNG DER TEMPLATE-DNS	37
2.6.2	ENTFERNUNG VON 3`-ÜBERHÄNGEN AN DER TEMPLATE-DNS	37
2.6.3	AUFREINIGUNG DER TEMPLATE-DNS DURCH PHENOL-CHLOROFORM-FÄLLUNG	38
2.6.4	IN-VITRO-TRANSKRIPTION ZUR HERSTELLUNG DIG-MARKIERTER RNS	38
2.6.5	RNS-SONDENAUFBEREITUNG DURCH LiCl-FÄLLUNG	39

2.7	KONTROLLE DER DIG-MARKIERTEN RNS-SONDEN	39
2.7.1	AGAROSE-FORMALDEHYD-RNS-GELCHROMATOGRAPHIE	40
2.7.2	RNS-TRANSFER DURCH VAKUUM-BLOT (NORTHERN-BLOT)	40
2.7.3	DETEKTION VON DIG-MARKIERTER RNS AUF NYLONMEMBRAN	40
2.8	IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH) MIT DIG-MARKIERTEN RNS-SONDEN	41
2.8.1	VORBEREITUNG DER GEFRIERDÜNNNSCHNITTE	41
2.8.1.1	Fixierung	42
2.8.1.2	Permeabilisierung	42
2.8.1.3	Acetylierung	42
2.8.1.4	Dehydrierung	42
2.8.2	IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH) (WILLIAMS ET AL. 1999)	42
2.8.3	STRINGENZWÄSCHE	43
2.8.4	DETEKTION DER MRNS-SONDEN	43
2.9	MIKROSKOPIE UND AUSWERTUNG	44
2.9.1	MIKROSKOPIE UND FOTOGRAFIE	44
2.9.2	ZÄHLUNG, AUSWERTUNG UND STATISTIK	45
<u>3</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>51</u>
3.1	ANSCHNITT JEJUNUM UND DARSTELLUNG DER BASALMEMBRAN	51
3.1.1	ÜBERSICHT ANSCHNITT	51
3.1.2	DARSTELLUNG DER BASALLAMINA	52
3.2	TEIL1 - KOLOKALISATION VON M- UND IMMUNKOMPETENTEN ZELLEN	55
3.2.1	VERTEILUNG VON CY90 ⁺ ZELLEN	59
3.2.2	VERTEILUNG VON CD45 ⁺ ZELLEN UND BEZUG ZU M-ZELLEN	62
3.2.3	VERTEILUNG VON CD2 ⁺ ZELLEN UND BEZUG ZU M-ZELLEN	65
3.2.4	VERTEILUNG VON CD4 ⁺ ZELLEN UND BEZUG ZU M-ZELLEN	70
3.2.5	VERTEILUNG VON CD8 ⁺ ZELLEN UND BEZUG ZU M-ZELLEN	72
3.2.6	VERTEILUNG VON MHCII ⁺ ZELLEN UND BEZUG ZU M-ZELLEN	76
3.2.7	VERTEILUNG VON IG ⁺ ZELLEN UND BEZUG ZU M-ZELLEN	79
3.2.8	VERTEILUNG VON SWC3 ⁺ ZELLEN UND BEZUG ZU M-ZELLEN	82
3.2.9	ZUSAMMENFASSUNG TEIL 1	85
3.3	TEIL 2 - VERTEILUNG VON CD3⁺, CD4⁺ UND CD8⁺ ZELLEN	89
3.3.1	CD3 ⁺ ZELLEN IM JEJUNUM	90
3.3.2	CD4 ⁺ ZELLEN IM JEJUNUM	95
3.3.3	CD8 ⁺ ZELLEN IM JEJUNUM	98
3.3.4	DARSTELLUNG CD3, CD4 UND CD8 DURCH FLUORESCENZFÄRBUNGEN	102
3.3.5	ZUSAMMENFASSUNG CD3/4/8 T-ZELL-VERTEILUNG IN DOM UND ZOTTEN	104

3.4	TEIL 3 IN-SITU-HYBRIDISIERUNG VON IL2-, IL4-, IL10- UND IFNγ-MRNS	105
3.4.1	VERTEILUNG VON IL2-MRNS ⁺ ZELLEN	105
3.4.2	VERTEILUNG VON IL4-MRNS ⁺ ZELLEN	109
3.4.3	VERTEILUNG VON IL10-MRNS ⁺ ZELLEN	112
3.4.4	VERTEILUNG VON IFN γ -MRNS ⁺ ZELLEN	114
3.4.5	ZUSAMMENFASSUNG ISH	116
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>119</u>
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>142</u>
<u>6</u>	<u>AUSBLICK</u>	<u>146</u>
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>148</u>
<u>8</u>	<u>ANHANG</u>	<u>169</u>
8.1	ÜBERSICHT: BENUTZTE GERÄTE	169
8.2	TABELLEN	170
8.3	ZUR FÄRBUNG VERWENDETE LÖSUNGEN	173
8.4	NÄHRMEDIUM FÜR <i>E. COLI</i>	176
8.5	ZUR ISH VERWENDETE LÖSUNGEN	177
<u>9</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>180</u>
	<u>ERKLÄRUNG</u>	<u>183</u>

1 Einführung

1.1 *Allgemeine Einführung in das Darmimmunsystem*

Ohne ein funktionierendes Abwehrsystem kann sich kein Lebewesen im Kampf um die Ressourcen dieser Welt gegen die mannigfaltige Konkurrenz behaupten. Es ist von essentieller Bedeutung für jedes Individuum Strategien und Mechanismen zu besitzen, um sich von schädigenden Einflüssen der Umwelt abgrenzen, freihalten und eventuell befreien zu können.

Hauptbestandteile des Immunsystems sind in erster Linie alle immunkompetenten Zellen, welche in der Lage sind sich im Individuum aktiv zu bewegen, zu orientieren und/oder zu platzieren, sowie die humoralen Bestandteile wie Plasmaproteine, Komplementfaktoren und Zytokine, die sich eher passiv verbreiten und in den Interstitien sowie im Blutstrom zirkulieren können. Von grundlegender Bedeutung für die Erfüllung der Aufgaben des Immunsystems ist die Möglichkeit, dass immunkompetente Zellen neu gebildet werden können und ein Teil von ihnen die Fähigkeit zur klonalen Expansion besitzt. Die Lebensdauer der einzelnen Zellen kann dabei von wenigen Stunden bis zu vielen Monaten oder auch Jahren reichen (El Albani et al. 2010; Germain et al. 2008; Amanna und Slifka 2010). Die Funktionen der oben genannten Komponenten sind außerdem von morphologischen Strukturen abhängig. Dadurch wird eine Wirkung im Immunsystem allererst ermöglicht und/oder wesentlich effizienter gemacht. Zudem bedingen sie den geordneten Ablauf dieses Prozesses. So sind, neben den primären lymphatischen Organen, wie z.B. dem Thymus oder dem Knochenmark (Medulla ossium rubra) als Bildungsorte der immunkompetenten Zellen (speziesabhängig), die sekundären lymphatischen Organe wie die Milz, die reichlich vorhandenen Lymphknoten sowie die innerhalb der Gewebe liegenden Lymphfollikel in die Kreisläufe der Organismen eingeordnet (Janeway und Travers 1997). Das Immunsystem realisiert komplexe Abwehrvorgänge, welche das Individuum vor Infektionen, verschiedensten Noxen aus der Umwelt und eigenen entarteten Zellen schützen. Obwohl grundsätzlich zwar funktionell ein ursprünglicheres angeborenes Immunsystem von einem höher entwickeltem adaptiven Immunsystem unterschieden werden kann, wobei sich ersteres hauptsächlich durch das Wirken von phagozytierenden Granulozyten und Makrophagen manifestiert und letzteres insbesondere durch den Einfluss der Lymphozyten realisiert, ist letztendlich das Zusammenspiel beider Komponenten für die umfangreichen Leistungen des menschlichen Immunsystems entscheidend (Pancer und Cooper 2006).

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sind Bestandteile des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT). Je nach Lokalisation im Organismus lassen sich spezielle mukosaassoziierte lymphatische Gewebe differenzieren. Abgesehen von konjunktiva-, tränen- und speicheldrüsenassoziierten lymphatischen Gewebe wird auch nasopharyngeales, laryngeales, bronchus-, magenmucosa- und darmassoziiertes lymphatisches Gewebe neben dem Lymphgewebe des Waldeyerschen Rachenringes voneinander abgegrenzt (Liebler-Tenorio und Pabst 2006). Insbesondere Teile des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) werden in dieser Arbeit näher untersucht. Lymphatisches Gewebe des MALT befindet sich in direkter Nähe zur mukosalen Oberfläche und stellt sich durch Lymphfollikel und T-Zell-dominierte interfollikuläre Areale dar. Die primären bzw. sekundären Follikel, also Follikel ohne und mit Keimzentrum, bestehen aus Netzwerken follikulär dendritischer Zellen, welche zentral hauptsächlich von B-Lymphozyten ausgefüllt sind. Im Mantelbereich eines Follikels befinden sich neben B-Zellen vermehrt auch T-Zellen und Makrophagen. Im mukosaassoziierten lymphatischen Gewebe können die follikulären Strukturen solitär oder in Aggregaten auftreten. Das die Follikel überdeckende Epithel ist von Lymphozyten infiltriert. Dieses kann morphologisch differente, auf Antigenaufnahme spezialisierte Zellen enthalten. Diese spezialisierten Zellen werden, basierend auf ihrer Morphologie in den Peyerschen Platten (PP) des Dünndarmes als M-Zellen (**m**icrofold oder **m**embrane cells) bezeichnet (Miyazawa et al. 2006; Owen 1999; Pabst 1987). Im Bereich der Epithelien werden die Antigene den immunkompetenten Zellen durch M-Zellen und/oder dendritische Zellen zugänglich gemacht, es gibt hier keine afferenten Lymphgefäße. Inwieweit die Epithelzellen selbst aktiv oder passiv, trans- oder intraepithelial am Transport der potentiellen Antigene beteiligt sind, lässt sich trotz der Bedeutung dieser Frage nicht eindeutig beantworten und ist nach wie vor Gegenstand aktueller Forschungen (Artis 2008; Farhadi et al. 2003; Hossain und Hirata 2008; Lapointe et al. 2009; Sewekow et al. 2008). Wie z.B. bei den tonsillären Gebilden des Waldeyer Rachenringes, sind die beschriebenen Strukturen entweder prinzipiell in definierten Regionen vorhanden oder sie kommen zwar grundsätzlich, aber an unterschiedlichen Lokalisationen, wie etwa die PP im Jejunum, vor. Außerdem können sie, wie beispielweise im bronchusassoziierten lymphatischen Gewebe (BALT) durch Antigenexposition spontan entstehen. Zirkulierende Lymphozyten erreichen das MALT über spezialisierte hochendotheliale Venulen in den interfollikulären Arealen. Die Immigration von Lymphozyten ist gewebespezifisch und wird über entsprechende Rezeptoren im Endothel der Venulen reguliert (Brandtzaeg und Pabst 2004). Die charakteristische Organisation des MALT muss abgegrenzt werden von lokalen Lymphozytenin-

filtrationen ohne eine entsprechende Kompartimentierung und ohne einen vergleichbar direkten Bezug zum Epithel.

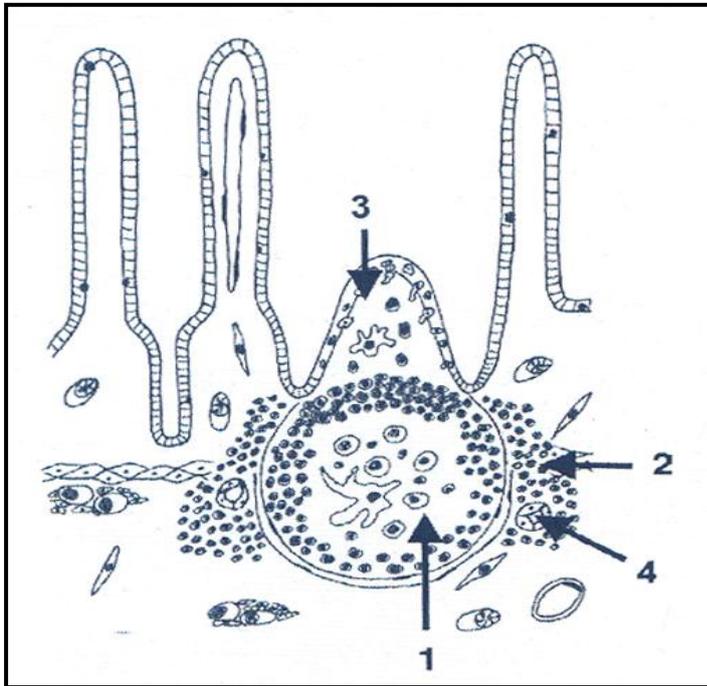


Abbildung 1: Morphologische Charakteristik des MALT (aus Liebler-Tenorio und Pabst 2006)

1: Mantelzone eines Follikels; 2: Interfollikuläre Zone; 3: Dom; 4: hochendotheliale Venule

Abbildung 1 zeigt die typische morphologische Charakteristik des im Fokus der Arbeit stehenden mukosa- bzw. darmassoziierten lymphatischen Gewebes. Diese Strukturen sind speziesspezifisch und individuell in unterschiedlicher Anzahl und Lokalisation im Darmrohr vorhanden (Nickel 1999). Funktionell und räumlich kann der induktive Charakter des GALT gegen die resultierenden Effektoraufgaben innerhalb und außerhalb des Darmrohres abgegrenzt werden. Kennzeichnende Effektorfunktion adaptiver Immunantworten für die Mukosa ist die Sekretion von Immunglobulin A (IgA) an ihre Oberfläche (Brandtzaeg und Pabst 2004). In Kombination mit Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie z.B. die Schleimseznierung durch die Becherzellen und ein steter Abtransport des Schleimfilmes inklusive aller potentiell pathogenen Bestandteile, kommt ein wirkungsvoller Schutz zustande. Die Bindung potentieller Pathogene durch IgA verhindert einerseits eine Schädigung der Organismen durch Adhäsion und Invasion von viralen, bakteriellen und mykotischen Mikroorganismen bzw. Schädwirkungen durch deren Toxine, erlaubt und befördert aber andererseits auch deren Aufnahme bei Vorhandensein entsprechender IgA-Rezeptoren. So können die mukosalen Oberflächen geschützt und zeitgleich der luminalen Inhalt „überwacht“ sowie notwendige Immunantworten vorbereitet bzw. intensiviert werden (Favre et al. 2005; Mantis et al. 2002).

Mukosal im GALT auftretende Antigene können durch B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen aufgenommen, speziell in PP sowie auch allen anderen Bereichen der Mukosa den immunkompetenten Zellen präsentiert werden und mit der Lymphe in die nachgeschalteten immunsytemmodulatorischen Lymphknotenstationen und Organe gelangen (Hopkins et al. 2000; Pape et al. 2007). So können notwendige mukosale sowie systemische Antworten ausgelöst und erhalten werden, ohne dass eine Erregerinvasion oder Intoxikation stattgefunden hat.

Zentraler Dreh- und Angelpunkt in der Regulation der adaptiven Immunantworten im GALT sind neben dem Wirken der dendritischen Zellen auch die vielfältigen Funktionen der T-Lymphozyten (Rothkötter et al. 1999; Saalmüller et al. 2002). Die intestinale Schleimhaut stellt eine immens große Oberfläche dar, an der permanent zwischen Nahrungsaufnahme mit entsprechender immunologischer Toleranz oder Ausbildung einer adäquaten Immunantwort gegen (potentielle) Pathogene über deren Antigene entschieden werden muss. Durch mannigfaltige Umwelteinflüsse, wie z.B. Wasser, Futter und Umgebung, ändert sich unablässig mehr oder weniger stark das Aufkommen und das Verhältnis (potentiell) pathogener Strukturen und anderer apathogener Bestandteile im Darmrohr und damit am GALT. Die aus den Kontakten der intestinalen Schleimhaut mit den luminal existierenden Umweltkomponenten resultierenden Reaktionen des Immunsystems sind Anpassungsleistungen des Individuums an seine Umwelt und bilden die Grundlage für dessen Konkurrenzfähigkeit und Fitness. Genau an diesen Prozessen setzt die vorliegende Arbeit an und geht der Frage nach, wie und in welchem Ausmaß sich Umwelteinflüsse auf die Verteilung und Funktion immunkompetenter Zellen im jejunalen Schweinedarm auswirken.

1.2 Das Schwein als Modelltier für das Darmimmunsytem

Das Schwein qualifiziert sich als Modelltier für die Forschung am Gastrointestinaltrakt insbesondere durch seine relativ gute Vergleichbarkeit mit dem Menschen. Das Schwein ist ein Omnivor, dessen Futterspektrum und Verdauungsvorgang weitaus besser mit dem Nahrungsspektrum und der Digestion eines Menschen verglichen werden kann als es etwa bei Mäusen, Ratten und Kaninchen der Fall ist. Darüber hinaus steht das Schwein auch aufgrund vergleichbarer Größenverhältnisse und großer physiologischer Ähnlichkeiten zum Menschen im Fokus der Forschungen zum Thema Xenotransplantation (Rothkötter et al. 2002; Sachs 1994). Auch das Immunsystem des Schweines ist, trotz speziesspezifischer Eigenheiten, wie z.B. der inversen Lymphknotenstruktur, in vielen Facetten dem humanen System vergleichbar (Binns

1982). Beispielsweise ähnelt sich die Verteilung der Toll-like Rezeptoren beim Schwein und beim Menschen, während dies etwa auf Mäuse nicht zutrifft (Facci et al. 2010).

Die Länge eines Schweinedarmes beträgt in etwa das 15-fache der Körperlänge. Bei einem adulten Tier entspricht dies 16 bis 21 Meter. Wie bei allen Säugetieren kann ein Intestinum tenue (Dünndarm) von einem Intestinum crassum (Dickdarm) differenziert werden. Dabei lässt sich der Dünndarm weiter in ein Duodenum, das Jejunum sowie das Ileum unterteilen. Im Dickdarm unterteilt man Colon und Rektum, außerdem kann ein Caecum abgegrenzt werden, welches im Gegensatz zum Menschen keine Appendix vermiformes besitzt. Von luminal nach serosal besteht die Darmwandung aus der Tunica mucosa (Schleimhaut) mit der Lamina epithelialis mucosae (Epithel), der Lamina propria mucosae und der Lamina muscularis mucosae, dieser folgt die Tela submucosae (Submukosa) als Grenze zur Tunica muscularis mit dem Stratum circulare und dem Stratum longitudinale. Abschließend bildet die Tunica serosa (Bauchfell) mit der Lamina propria serosae und dem Mesothelium serosae die Oberfläche der Peritonealhöhle. Die Länge des Dünndarmes neugeborener Ferkel beträgt 2 bis 4 Meter (Pond und Mersmann 2001).

1.2.1 Entwicklung, Morphologie und Darstellung immunkompetenter Strukturen

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit interessierenden immunkompetenten Strukturen kurz charakterisiert und mögliche Nachweis- und Analysemethoden aufgezeigt werden.

Die 1677 vom Schweizer Anatomen Johann Conrad Peyer beschriebenen Strukturen wurden 1851 als lymphatisches Gewebe erkannt. Seit 1928 kennt man unterschiedliche Entwicklungsmuster von jejunalen und ilealen Peyerschen Platten. Dass hier die spezifische Induktion der mukosalen Immunantwort (IgA-Sekretion) durch „antigensammelnde bzw. antigendurchschleusende M-Zellen“ stattfindet, wird seit 1960 diskutiert (Griebel und Hein 1996).

Das Schwein gehört mit den Schafen, Kühen, Ziegen, Hunden, Pferden und Menschen zu der Gruppe von Organismen, die eine pränatale Entwicklung von Peyerschen Platten im Dünndarm zeigen. Demgegenüber weisen Kaninchen, Ratten, Mäuse und Hühner eine solch zeitige Ausbildung dieser immunkompetenten Strukturen nicht auf. Beim Schwein treten frühestens ab dem 50. Tag der Gestation einzelne lokale lymphoide Infiltrationen in der jejunalen Lamina propria auf und um Tag 90 bis 100 bilden sich erste Follikel. Ab Tag 95 bis zur Geburt entwickeln die fetalen Schweine im Schnitt 18 Peyersche Platten, postnatal steigt diese Anzahl nur noch leicht an (z.B. 23 +/- 3,3 jejunale PP mit sieben Monaten (Pabst et al. 1988))

und liegt letztendlich individuell bei 20 bis 30 jejunalen PP. Das markanteste Längenwachstum der PP findet in den letzten zehn Tagen der Gestation und postnatal von Tag 1 bis 42 (plus ~170%) statt. Danach nimmt die Länge der PP bis zum 18. Monat nur noch um etwa 8% zu. Ab Tag 21 bis 35 postnatal besitzen die PP mit separaten T- und B-Zell-Arealen, Domarealen sowie primären und sekundären Follikeln alle Reifemerkmale. Trotz Ausnahmen und individueller Unterschiede ist die Anzahl von PP im proximalen Darm im Schnitt größer als im distalen Abschnitt. Die individuelle Lokalisation vor allem der jejunalen PP bleibt während Wachstum und Entwicklung in Relation erhalten. Die ilealen PP weisen allerdings eine altersabhängige Involution auf (Chapman et al. 1974; Kruml et al. 1970; Makala et al. 2000; Makala et al. 2001; Rothkötter und Pabst 1989). Ileale PP Follikel erscheinen mehr längsoval und erreichen im Alter von zwei Monaten bei konventionell gehaltenen Schweinen eine durchschnittliche Ausdehnung von 0,86 mm Höhe und 0,71 mm Breite. Die jejunalen PP Follikel des Schweines sind in diesem Alter insgesamt größer und treten etwas abgeflachter mit durchschnittlich 0,89 mm Höhe, aber 1,06 mm Breite auf. Dabei muss aber noch berücksichtigt werden, dass die interfollikulären Zonen der jejunalen PP durch ihre größere Ausdehnung etwa doppelt so viel Raum bieten. Es muss zudem festgestellt werden, dass die Anzahl der im Ileum vorhandenen Follikel mit etwa 78.000 deutlich höher liegt als die Gesamtanzahl der ~9.000 Follikel im Jejunum (Andersen et al. 1999; Barman et al. 1997; Charentantanakul und Roth 2006; Pabst 1987).

Um die immunkompetenten Strukturen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes abbilden, auswerten und beschreiben zu können, werden entsprechende Zellmarker benötigt. Neben einer histochemischen Übersichtsfärbung mit z.B. Methylenblau, lassen sich auch alle DNS-haltigen Strukturen (Zellkerne) mit DAPI anfärben. DAPI interkaliert in die DNS und fluoresziert blau, wenn es mit ultraviolettem Licht angeregt wird (Kapuscinski 1995).

Die in das Epithel integrierten M-Zellen sind speziesspezifisch in unterschiedlichem Maße und auch in differenten Lokalisationen vorhanden. In der Maus können die M-Zellen etwa durch den Marker *Ulex europaeus* (Stechginster) Agglutinin (UEA-I) dargestellt werden und erreichen im follikelassoziierten Epithel einen Anteil von ~ 50% im Bezug auf die Enterozyten. Im Kaninchen lassen sich die M-Zellen durch die Markierung von Vimentin darstellen und beim Schwein gelingt dies ebenfalls durch die Benutzung von Antikörpern gegen das Intermediärfilament Zytokeratin 18 als Marker. Hier werden etwa 30% der Zellen des Domepithels gekennzeichnet (Brandtzaeg und Pabst 2004; Gebert et al. 1994a; Gebert et al. 1994b; Gebert et al. 1996; Gebert und Bartels 1995).

Ein CD45-Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase der hämatopoetischen Zellen als Leukozytenmarker kann die Verhältnisse immunkompetenter zu allen anderen nicht direkt immunkompetenten Zellen (Epithel-, M- bzw. Becherzellen, Fibrozyten, Paneth-Zellen, glatte Muskelzellen etc.) der entsprechenden Kompartimente aufzeigen. CD45 als Leukozytenmarker beinhaltet alle Lymphozyten inklusive der natürlichen Killerzellen, den Granulozyten sowie den Zellen des Monozyten-Makrophagensystemes. Dadurch sind noch weitere Differenzierungen von Subtypen möglich (Binns et al. 1995).

Die Lymphozyten lassen sich weiter in B-, T- und die natürlichen Killerzellen unterteilen. Die Markierung von T-Zellen kann zum einem z.B. durch das in die Adhäsion und Aktivierung von T-Zellen involvierte Oberflächenmolekül CD2 erfolgen (Pescovitz et al. 1994a). Das 50 kDa transmembranale Glykoprotein fungiert als Adhäsionsmolekül mit CD58 als Liganden (Saalmüller et al. 1989). CD2⁺ Zellen können die weiteren Subklassen von CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ doppelt positiven, CD4⁻/CD8⁻ doppelt negativen, TcR- $\alpha\beta$ -, TcR- $\gamma\delta$ - Zellen, T- und natürlichen Killerzellen beinhalten (Piriou-Guzylack und Salmon 2008).

Zum anderen lässt sich der CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex als spezifischerer Marker zur Darstellung von T-Zellen nutzen. Der CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex ist ein multi- und polypeptider Membrankomplex aus hochvariablen, antigenbindenden heterodimeren T-Zell-Rezeptoren ($\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$) und invarianten CD3 Signalpeptidketten ($\epsilon, \delta, \gamma, \zeta$) (Kuhns et al. 2006). Während die Proteine CD3 ϵ , CD3 δ und CD3 γ extrazelluläre Domänen besitzen, vermittelt das homodimere, hauptsächlich im Zytoplasma liegende Protein CD3 ζ über spezielle tyrosinbasierende Aktivierungsmotive (ITAMs) den Kontakt zu zytosolischen Proteintyrosinkinasen und initiiert so die weitere Signalkaskade (Malissen und Malissen 1996). Monoklonale Antikörper gegen Epitope der extrazellulären CD ϵ Domäne können T-Zellen mit $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren erkennen. Die Dichte von CD3 auf CD2⁺ und CD8⁺ Zellen ist relativ gering und heterogen, während sie auf CD2⁻ und CD8⁻ Zellen höher und eher homogen ist (Pescovitz et al. 1998a; Piriou-Guzylack und Salmon 2008; Yang et al. 1996).

Eine weitere Abgrenzung der u.a. im Fokus dieser Arbeit stehenden T-Zellen lässt sich nach der Expression ihrer Korezeptoren durchführen. So wird CD4 hauptsächlich auf extrathymischen T-Helferzellen exprimiert (Pescovitz et al. 1998b). Extrathymische T-Helferzellen beinhalten einfach CD4⁺ Zellen und CD4⁺/CD8⁺ doppelt positive Zellen (Charentantanakul und Roth 2006; Saalmüller et al. 1989; Zuckermann und Gaskins 1996). Außerdem existieren stark CD4⁺ interferonproduzierende dendritische Zellen im peripheren Blut (Summerfield et al. 2003).

CD8 kann entweder als Homo- oder Heterodimer auf den Zellen exprimiert werden (Jonjic und Koszinowski 1984; Pescovitz et al. 1984). Monoklonale Antikörper gegen ein Epitop auf der 35 kDa α -Kette gerichtet, markieren Thymozyten, periphere T-Zellen sowie natürliche Killerzellen. CD8 stark positive Zellen sind den zytotoxischen T-Zellen zuzuordnen. CD8 schwach positive Zellen, welche gleichzeitig CD4 exprimieren (= doppelt positive) gehören der Subfraktion der Gedächtnis-T-Zellen an (Pescovitz et al. 1985; Pescovitz et al. 1994b; Saalmüller et al. 1987; Saalmüller et al. 2002; Zuckermann 1999). Die meisten der $\gamma\delta$ -T-Zellen sind, bis auf eine kleine Minorität, CD8⁻ (Yang und Parkhouse 1996; Yang und Parkhouse 1997).

Die Immunglobulintragenden B-Zellen des Schweines lassen sich durch den Einsatz eines Antikörpers, welcher an ein Epitop der leichten λ -Kette bindet, visualisieren (Denham et al. 1998; Sinkora et al. 2001).

Antigene, die aus Richtung Darmlumen ins Körperinnere gelangen, können von CD3⁺ $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten nur im Kontext mit MHC I- oder II-Glykoproteinen erkannt werden. Einfluss auf die Vorgänge im Immunsystem entsteht durch die Bindung eines Antigen + MHC-Komplexes mit dem T-Zell- und seinen Korezeptoren, den CD3-, CD4- und/oder CD8-Molekülen. Abhängig von Herkunft und Größe werden entweder 12 bis 25 Aminosäuren große exogene Peptidfragmente, die in Phagosomomen degradiert wurden, über MHC II an CD4⁺ T-Zellen oder 8 bis 9 Aminosäuren lange endogene Peptidfragmente aus dem Zytosol über MHC I an CD8⁺ T-Zellen präsentiert (Diaz et al. 2005; Soderholm et al. 2006). MHC I ist, außer auf den Erythrocyten und Zellen des neuralen Systemes, auf allen Körperzellen exprimiert. Im Gegensatz dazu wird MHC II in den Adulten nur auf den antigenpräsentierenden Zellen, zu denen die Makrophagen, die B-Lymphozyten, Mikroglia- und dendritische Zellen gehören, exprimiert (Basta et al. 1999; Carrasco et al. 2001; Van der Stede et al. 2005). Durch die Verwendung eines Antikörpers gegen eine Determinante auf dem 28/30 kDa MHC II-DR α Heterodimer sind die entsprechenden MHC II⁺ Zellen des Schweines nachzuweisen und können im Kontext des GALT dargestellt werden (Haverson et al. 1998).

Zur Abgrenzung von myeloiden Zellen kann ein anti-SWC3-Antikörper gegen ein signalregulierendes Protein (SIRP; CD 172a) verwendet werden. Mit diesem Antikörper sind Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten darstellbar (Alvarez et al. 2000; Lunney et al. 1994; Piriou-Guzylack und Salmon 2008). Monozyten exprimieren, im Gegensatz zu den konventionellen, plasmazytoiden und dendritischen Zellen im Blut, hohe Mengen von CD 172a (Summerfield et al. 2003).

Folgende Abbildung stellt den Zusammenhang von Leukozyten und den Subtypen in einer Übersicht dar.

Zusammenhang von Leukozyten und Subtypen

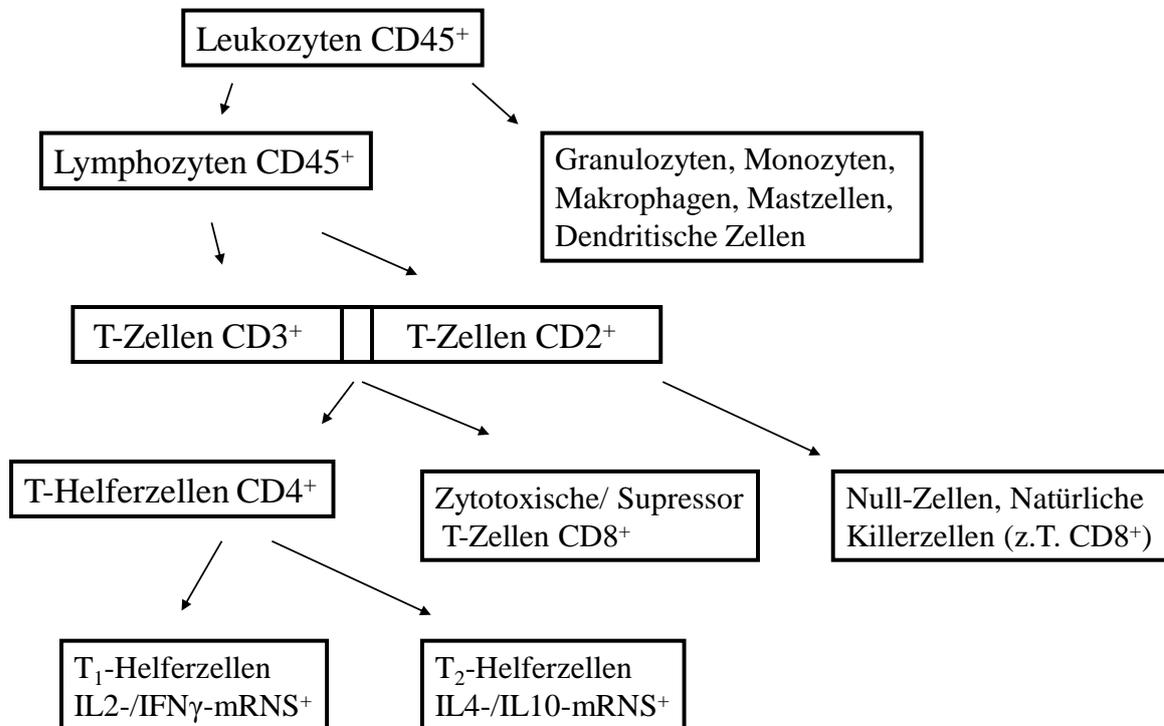


Abbildung 2: Zusammenhang von Leukozyten und Subtypen

Die Übersicht zentralisiert die u.a. im Fokus dieser Arbeit stehenden T-Zellen und stellt einen Bezug zu ihrer Funktion im Dienste der möglichen adaptiven Immunantworten, die letztendlich entweder zur Ausbildung einer Toleranz gegenüber oder zur Entfernung bzw. Neutralisation eines Immunogens führen, dar. Eine elementare Rolle spielen dabei die $CD4^+$ T-Helferzellen durch deren Expression und Sekretion von Zytokinen eine Initiation sowie Steuerung der Immunantwort erfolgt.

Zytokine stellen eine Gruppe von zellregulatorischen Proteinen dar, die außer von T-Zellen auch von anderen Zelltypen, wie z.B. Epithelzellen, dendritischen Zellen und B-Zellen, exprimiert werden können. Sie spielen eine wichtige Rolle in allen physiologischen Immunantworten. Zytokine sind aber auch involviert in pathologische Prozesse, wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa und besitzen gleichwohl ebenfalls therapeutisches Potential. Zytokine existieren als Lymphokine, Monokine, Interleukine sowie Interferone und haben folgende

gemeinsame Eigenschaften. Ihr Molekulargewicht liegt unter 80 kDa und als sekretierte Proteine sind sie oft glykosyliert. Sie regulieren Amplitude und Dauer von Immunität und Inflammation. Sie werden üblicherweise nur transient und lokal produziert, wobei ihre Wirkung eher auf auto- sowie parakrinem statt endokrinem Wege erfolgt. Sie interagieren mit zytokin-spezifischen hochaffinen Rezeptoren an den Zelloberflächen (nur 10 bis 10.000 pro Zelle) und sind so potent, dass Konzentrationen im picomolaren Bereich für ihre Wirkung ausreichen. Ihre Bindung an der Zelloberfläche führt unweigerlich zu Veränderungen der zellulären RNS- und Proteinsynthese. Die einzelnen Zytokine besitzen überlappende regulatorische Funktionen (Balkwill und Burke 1989).

Ein Hauptaugenmerk liegt in der vorliegenden Arbeit auf vier Zytokinen, welche bei der Differenzierung der Immunantwort entweder in Richtung Toleranz/ humorale Immunität (Th2) oder zellvermittelte Inflammation (Th1) eine entscheidende Rolle spielen.

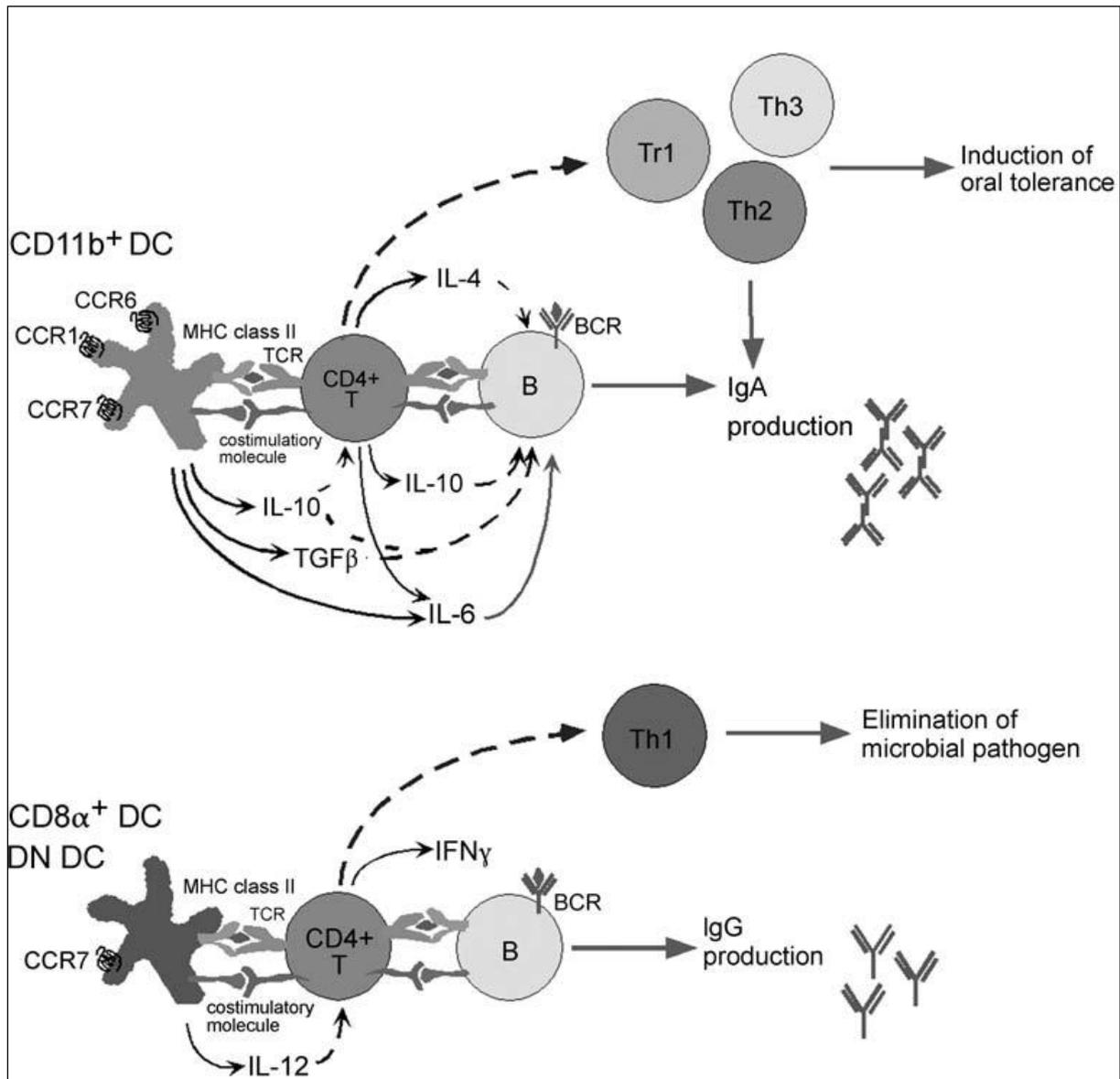


Abbildung 3: Mögliche Mechanismen der Immuninduktion in PP nach Sato und Iwasaki (2005)

(DN) DC: (doppelt negative) dendritische Zelle; CCR: Chemokin-Rezeptor; BCR: B-Zell-Rezeptor; TCR: T-Zell-Rezeptor; Th: T-Helferzelle; Tr: T-regulatorische Zelle

Voraussetzung für die in Abbildung 3 dargestellten funktionellen Interventionen der $CD4^+$ T-Helferzellen ist ihr Vorkommen in ausreichender Anzahl. Dazu ist, nach Antigenaufnahme, -prozessierung und MHC-abhängiger Präsentation der antigenen Peptidfragmente durch beispielsweise dendritische Zellen zunächst eine Antigenerkennung an T-Zellrezeptoren inklusive Aktivierung über kostimulatorische Signale, gefolgt von einer klonalen Expansion entsprechend relevanter T-Zellen nötig. In diesem Zusammenhang ist Interleukin 2, produziert von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen, als typisches Th1-Zytokin entscheidend in der Generation und Regulation einer adaptiven Immunantwort (Burmester und Pezzutto 1998; Romagnani 1997; Smith 1988).

Als proinflammatorisch wirkendes Glykoprotein kann Interferon γ nach Antigenkontakt von $CD4^+$ Th1-Zellen, $CD8^+$ Zellen, dendritischen und natürlichen Killerzellen exprimiert werden. Neben der Supprimierung der Aktivität von Th2-Zellen, ist eine weitere Hauptaufgabe die Aktivierung von Makrophagen. Außerdem wird die Antigenpräsentation durch Einfluss auf die Synthese von MHC I- und MHC II-Molekülen gefördert und der Antikörper-Klassenwechsel von IgM zu IgG positiv und zu IgE negativ beeinflusst (Brett et al. 1992; Paludan 1998; Youakim und Ahdieh 1999).

Gegenspieler einer inflammatorischen Immunantwort ist das Interleukin 4, welches von $CD4^+$ T-Zellen und auch von Mastzellen gebildet werden kann. Es steht funktionell im Dienste der Entwicklung einer Immunantwort vom Th2-Typ und ist somit beteiligt an der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, der Antikörperproduktion und dem Schutz vor extrazellulären Antigenen und Mikroorganismen (Netea et al. 2005; Neurath et al. 2002; Paludan 1998; Romagnani 1997).

Wie Interleukin 4 gehört auch Interleukin 10 zu den antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen, kann von T-Helferzellen und Monozyten gebildet werden und verhindert regulatorisch pathogene Th1- sowie Th2-Antworten gegen kommensale Mikroorganismen (Netea et al. 2005; Romagnani 1997; Sartor 2006).

Die qualitative sowie quantitative Differenzierung der leukozytären, lymphatischen, nichtlymphatischen, immunkompetenten und anderer nichtimmunkompetenter Zellen der oben beschriebenen Strukturen erfordert neben den speziesabhängig unterschiedlichen Markern auch diverse Untersuchungsmethoden. Eine weit verbreitete Methodik sind durchflusszytometrische Messungen fluoreszenzmarkierter Zellen beispielsweise kombiniert mit dem sequentiellen Verdau eines differenzierten intestinalen Gewebes. Im Ergebnis lassen sich damit z.B. Zellpopulationen in ihrer chronologischen Entwicklung verfolgen. Dabei lässt sich aber der räumliche Bezug der Zellen zueinander nur noch begrenzt nachvollziehen. Die Mikroskopie und bildliche Darstellung markierter differenzierbarer Zellen in ihrem natürlichen Gewebeverbund lassen eine qualitative und quantitative Auswertung während einer zeitlichen Entwicklung sowie in begrenztem Umfang eine räumliche Interpretation zu und sind daher ein weiterer methodischer Pfeiler in der wissenschaftlichen Aufklärung nicht nur der intestinalen immunkompetenten Strukturen (Gutman und Weissman 1972; Makala et al. 2001; Rothkötter et al. 1994).

Neben allgemeinen und speziellen histochemischen Färbungen lassen sich verschiedene Zelltypen durch immunhistochemische Verfahren sowie idealerweise durch Mehrfachfluoreszenz-Mikroskopie demonstrieren.

In Ergänzung zu den oben beschriebenen Untersuchungsmethoden zur qualitativen Darstellung und der Ermöglichung von quantitativen Auswertungen zur Entwicklung diverser Zellsysteme innerhalb der beschriebenen immunkompetenten Strukturen, können durch die Methodik der (nichtradioaktiven) In-situ-Hybridisierung (isH) zusätzliche Erkenntnisse zu funktionellen Zuständen auf transkriptionaler Ebene gewonnen werden. Die Technik der isH besitzt den Vorteil, dass funktionelle Zustände bestimmter Zelltypen im Gewebe-Kontext veranschaulicht und ausgewertet werden können (Bao et al. 1993; Braun et al. 2004; Cappello et al. 1992; Hines und Frazier 2000; Vitolo et al. 1993; Woywodt et al. 1994).

Ziel dieser Arbeit ist eine intensive qualitative sowie quantitative Darstellung und Betrachtung immunologisch relevanter Zellen im morphologischen Kontext in einem funktionell besonders relevanten Areal *in vivo*.

Dazu wurden speziell PP- sowie Zottenareale ohne Follikel aus den jejunalen Darmabschnitten der Versuchstiere untersucht. Im jejunalen Darmabschnitt findet der erste großflächige längeranhaltende Kontakt mit luminalen Nahrungsbestandteilen sowie aufgenommenen Mikroorganismen, deren Abbauprodukten wie auch Exotoxinen usw. nach der Magenpassage und dem anschließenden pH-Wechsel im Duodenum statt. Man kann davon ausgehen, dass nach initialer mechanischer Zerkleinerung und fortgesetztem biochemischen Aufschluss durch Speichel-, Magen-, Gallen- und Pankreasdrüsenabsonderungen im jejunalen Dünndarm neben bereits voll verdauten Metaboliten auch noch reichlich immunogene, antigene, potentiell pathogene, unverdaute Strukturen und komplette tote sowie vitale Mikroorganismen und Partikel vorhanden sind und Kontakt mit der Darmwand haben können (Stokes et al. 2006).

Gegenüber den anderen Darmabschnitten ist hier zudem die darmwandschützende Mukusschicht am dünnsten und die Aufnahmeraten aus dem Lumen sind am höchsten (Atuma et al. 2001; Hedemann et al. 2007).

Ein weiterer Grund für die Auswahl der mukosaassoziierten lymphatischen Gewebe des jejunalen Darmabschnittes als Untersuchungsgegenstand in dieser Arbeit ist der Umstand, dass im Vergleich zu den ilealen PP wesentlich mehr Lymphozyten in die jejunalen Peyerschen Platten einwandern und hier *in situ* einen höheren Proliferationsindex besitzen (Pabst und Binns 1989; Rothkötter et al. 1991; Rothkötter und Pabst 1989).

1.2.2 Veränderungen durch das Absetzen der Ferkel und Fragestellungen der Arbeit

In der heutigen stark wachstumsorientierten und industrialisierten Fleischproduktion werden 53% der Ferkel bereits mit 25 bis 28 Lebenstagen (LT) und 17% mit weniger als 25 LT abgesetzt. Der Absetzvorgang geschieht in der Natur eigentlich diskret und dauert bis zu 12 Wochen, verbunden mit einer schrittweisen Integration in den Familienverband (Hühn et al. 2007). Neben der Trennung vom Muttertier sind die abrupte Futterumstellung, der plötzliche Umgebungswechsel, die Konfrontation mit wurffremden Ferkeln und daraus resultierende Aggressionen die Hauptstressoren für die abgesetzten Ferkel (Reiners et al. 2007). Durch diese Einflüsse kommt es zu einem vermehrten Auftreten von gastrointestinalen Pathologien nach dem Absetzen. Diese gehen auch mit einer erhöhten Mortalitätsrate einher (Zabielski et al. 2008). Nachdem der Einsatz von Antibiotika zur Optimierung der Fleischproduktion innerhalb der EU 2006 verboten wurde, kam es zu erhöhten Verlusten in der Ferkelindustrie. Die Forschung konzentriert sich aktuell auf die Wirkung von förderlichen (z.B. Probiotika) und schädlichen (z.B. Verunreinigungen durch Toxine wie DON (Maresca et al. 2008)) Futterkomponenten auf die Darmwand, den Darminhalt und die Entwicklung, wie etwa die Gewichtszunahme, um durch gezielten Einsatz bzw. Vermeidung die Verluste letztendlich kompensieren zu können (De Walle et al. 2010; Gutierrez 2010).

Das autochtone mikrobielle Ökosystem im Schweinedarm ist durch das Absetzen großen qualitativen und quantitativen Veränderungen ausgesetzt. Dies ist wirtspezifisch und durch Futter sowie Umweltfaktoren beeinflusst. Die maximal geschätzte Anzahl unterschiedlicher Spezies im Darmlumen liegt allerdings bei 400 bis 1.000 und kann auch mit PCR- und 16S rRNA-basierten Methoden kaum genau erfasst werden. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora kann, wie zumindest an einigen ausgewählten Spezies gezeigt wurde, z.B. durch Einsatz von Pre- und Probiotika nicht nur während des Absetzprozesses positiv beeinflusst werden (Kemal Isik 2004; Konstantinov et al. 2004; Konstantinov et al. 2008).

Untersuchungen an durchfallerkranken Tieren zeigten, dass unabhängig von Hygiene-, technischen und immunpräventiven Maßnahmen in fast allen Beständen säugender und abgesetzter Ferkel Enteropathogene wie Coronavirus, Rotaviren, enterotoxische *E. coli* (ETEC) sowie die einzelligen Parasiten *Isospora suis* und *Cryptosporidium parvum* (Kokzidiosen) im Faezes nachweisbar sind (Wieler et al. 2001). Bei Durchfallerkrankungen neugeborener bzw. frisch abgesetzter Ferkel lässt sich häufig der enteropathogene Stamm *E. coli* „Abbottstown“ nachweisen (Chidlow und Porter 1979; NADIS 2009).

Aktuelle Studien zeigen auch, dass die Domestikation von *Sus scrofa* mit einer langsameren Organentwicklung einhergeht. Im Intestinum manifestiert sich dies z.B. in verringerter mitotischer Aktivität in den Krypten und verstärkter Apoptose von Enterozyten. Fehlende biologisch aktive Substanzen im Futter der Sauen sowie die Fütterung mit Milchersatz statt Sauenmilch sind unter anderem verantwortlich. Aufgrund von Produktionsoptimierung stark verkürzte Säugeperioden durch das sehr frühe Absetzen im Alter von 21 bis 28 Lebenstagen (und sogar noch eher), tragen dazu bei, dass die negativen Effekte, wie z.B. modifizierte Enzyme, zu Veränderungen in der intestinalen Mukosabarriere und damit zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Infektionen und Mortalitätsraten der Ferkel bis zu 10% führen können (Zabielski et al. 2008).

Verschiedene Studien kommen bei der Beurteilung von Entwicklung und Verteilung diverser immunkompetenter Zellen und Lymphozyten in den darmassoziierten lymphatischen Geweben von Jejunum und Ileum zum Teil zu unterschiedlichen Ergebnissen (Barman et al. 1997; Bianchi et al. 1992; Binns und Licence 1985; Rothkötter et al. 1994; Rothkötter und Pabst 1989). Als Ursache dafür kommen u.a. Rasseunterschiede sowie genetische Differenzen, verschiedene Haltungskonditionen und die Benutzung differenter Antikörper in Betracht.

Die Veränderungen im Zusammenhang mit dem Absetzen der Ferkel vom Muttertier und dem damit verbundenen Ende der Ernährung durch Sauenmilch werden in der aktuellen Forschung meist aus ernährungsphysiologischen, futterstrategischen und entwicklungsorientierten Beweggründen untersucht. Arbeiten, die immunologische Vorgänge und Veränderungen bzw. Entwicklungen im GALT, an der Grenze von Lumen (= Umwelt) und dem Körperinneren in vivo abbilden, sind eher selten. Insgesamt existieren die meisten Daten zur Untersuchung der Strukturen und Funktionen des GALT aus in vitro Zellkultur-Experimenten, FACS-Analysen, PCR-Techniken basierend auf Gewebelysaten sowie Hybridisierungen von Northern- bzw. Southern-Blots, welche letztendlich keine direkten Rückschlüsse auf die ursprünglichen in situ/ in vivo Situationen und Lokalisationen der untersuchten Zellsysteme zulassen. In diesen Untersuchungen sind die Zellen auch aus ihrem natürlichen Milieu/ Mikroenvironment und damit dessen Einfluss entfernt.

In dieser Arbeit wurden mit den methodischen Mitteln der Immunhistochemie im Zusammenhang mit der (Fluoreszenz-) Mikroskopie auf qualitativer sowie quantitativer Ebene und der In-situ-Hybridisierung auf dem funktionellen Level folgende Untersuchungen in drei Teilbereichen durchgeführt:

➤ **Teil 1**

Qualitativ-semiquantitative Analyse der Kolo-kalisation von M- und immunkompetenten Zellen sowie die Verteilung derselben im Kontext des Absetzens im Vergleich von jejunalem Dom- und Zottenareal

(am Beispiel von drei Schweinen)

➤ **Teil 2**

Qualitativ-quantitative Analyse der CD3-, CD4- und CD8 positiven T-Zellpopulationen von Dom- und Zottenareal im Kontext des Absetzens

(fünf Gruppen mit je vier Schweinen)

➤ **Teil 3**

Qualitativ-funktionelle Analyse der Zytokinproduktion auf transkriptionaler Ebene durch In-situ-Hybridisierung mittels RNS-Sonden im Kontext des Absetzens

(fünf Gruppen mit je vier Schweinen)

Der Fokus lag dabei auf den Entwicklungen und Veränderungen der untersuchten immunkompetenten Zellen des jejunalen Schweinedarmes im Kontext des Absetzens. Im Einzelnen wurden die experimentellen Effekte durch das Absetzen, die unterschiedlich langen Einflusszeiten von Futter und Sauenmilch sowie die Wirkung von pathogenen Faktoren direkt auf das Epithel und in Abgrenzung dazu auf die tiefer gelegenen Bereiche der Lamina propria jenseits der Basalmembran betrachtet. Dabei wurde grundsätzlich zwischen den funktionell immuninduktiven Domarealen und den Zottenarealen als Effektorbereich differenziert. Wie in Kapitel 2 Material und Methoden unter 2.9 beschrieben, wurden zu diesem Zweck unterschiedliche Kompartimente definiert und miteinander verglichen.

Das Absetzen der Ferkel geht mit einer Veränderung und Steigerung der Antigenexposition im Darmlumen sowie anderen stressenden Einflüssen einher. Das Immunsystem muss sich anpassen und entwickeln, um befähigt zu werden adäquate Immunantworten zur Beseitigung, Ausschaltung und Erkennung luminaler (potentiell) pathogener Antigene, Toxine und harmloser Nahrungsmittelbestandteile entwickeln zu können. In den beschriebenen Kontaktzonen zwischen Umwelt und Immunsystem werden im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen gestellt:

In welchen Verhältnissen stehen die Zellen innerhalb und zwischen den Kompartimenten zueinander, wie verändern sich diese durch das Absetzen? Wie und in welchem Umfang sind

die immunkompetenten Zellen mit den M-Zellen und Epithelzellen kolokalisiert? Mit besonderem Schwerpunkt auf die verschiedenen Populationen der T-Lymphozyten soll die Frage beantwortet werden, ob und wie sich die Relationen in den Kompartimenten durch den Prozess des Absetzens und die oben genannten Einflüsse verändern. Es soll weiterhin festgestellt werden, inwiefern durch mRNA-Nachweis mittels in-situ-Hybridisierung die Qualität der Immunantwort bzw. die Entwicklung des Immunsystems nachvollzogen werden kann. Lassen sich während des Absetzens und späterer Entwicklungsstadien in den untersuchten Kompartimenten bzw. in enger Beziehung dazu (Follikel, Interfollikularzone) funktionelle Prozesse am „Ort des Geschehens“ nachweisen? Welche unterschiedlichen Verteilungsmuster funktioneller Aktivität gibt es und kann in einzelnen Kompartimenten oder Arealen die vorherrschende Entwicklung zu einer Th1- bzw. Th2-Antwort auf transkriptionaler Ebene nachgewiesen werden?

Im Zusammenhang mit der Beantwortung der aufgeworfenen Fragen steht letztendlich zur Diskussion, wie der Schutz durch maternale Einflüsse (= Sauenmilch) auf die einzelnen Kompartimente und deren immunkompetenten Zellpool einwirkt und wie sich die Faktoren Alter, Futter und Pathogen im Verhältnis dazu auswirken. Durch die manuelle Markierung der Flächen und Auszählung der Zellen soll zudem ein hochwertiges Abbild der Verhältnisse im jejunalen Schweinedarm an einer entscheidenden Grenze zwischen Umwelt und Individuum geschaffen werden.

Die Arbeit liefert damit einen Beitrag dazu, sowohl die immunologischen Prozesse in den beschriebenen Arealen näher zu beleuchten als auch die zellulären Verhältnisse im jejunalen Schweinedarm genauer beschreiben zu können.

2 Material und Methoden

Neben einer modernen allgemeinüblichen Laborausstattung, inklusive der Möglichkeit und Berechtigung S1-Arbeiten nach dem Gentechnik-Gesetz durchzuführen, wurden die in der Übersicht im Anhang (siehe 8.1) aufgelisteten Geräte zur Durchführung der experimentellen Arbeiten genutzt.

2.1 Herkunft, Entnahme, Kryokonservierung von Gewebeproben

Das verwendete Probenmaterial stammt von insgesamt 24 Landrasseschweinen, die sich fünf verschiedenen Gruppen (aufgelistet in Tabelle 1) zuordnen lassen. Alle Tiere aus den Gruppen 1, 2, 3 und 5 waren zum Zeitpunkt der Tötung klinisch gesund. Die Schweine der Gruppe 4 sind nach dem Absetzen am 28. und 29. Lebenstag zusätzlich mit der Gabe von schweinepathogenen enterotoxischen *E.coli* „Abbottstown“ (O149:K91 K88) behandelt worden, besaßen zum Tötungszeitpunkt eine deutliche Durchfallssymptomatik und wurden als krank eingestuft (Konstantinov et al. 2008; Sarrazin et al. 2000; Wieler et al. 2001).

Schweinegruppen Nummer	Lebenstage	Sauenmilch (Tage)	Futter (Tage)	Gesundheits- zustand
1	28	28	-	gesund
2	39	39	-	gesund
3	39	28	10	gesund
4	39	28	10	krank
5	150	28	122	gesund

Tabelle 1: Übersicht Schweinegruppen

4 bis 5 Landrasse-Schweine pro Gruppe; krank = Durchfall nach Gabe von 10^{10} KbE *E.coli* „Abbottstown“ am 28. und 29. Lebenstag; konventionelles Ferkel- bzw. Schweinefutter

Im ersten Teil der Arbeit wurde jeweils ein Schwein aus den Gruppen 1, 3 und 5 im Hinblick auf die Kolokalisation von M-Zellen mit immunkompetenten Zellen genauer untersucht. Diese Schweine wurden dabei wie folgt bezeichnet:

- **Schwein 1:** 28 Lebenstage; nur Sauenmilch; aus Gruppe 1
- **Schwein 2:** 39 Lebenstage; 28 Tage Sauenmilch; 10 Tage konventionelles Futter; aus Gruppe 3
- **Schwein 3:** 150 Lebenstage; 28 Tage Sauenmilch; 122 Tage konventionelles Futter; aus Gruppe 5

Im zweiten und dritten Teil der Arbeit wurden je vier Schweine in allen fünf Gruppen getötet.

Die Schweine der Gruppen 1 bis 4 wurden durch eine intrakardiale Injektion mit T61[®] (Intervet; Unterschleißheim) getötet (Janczyk et al. 2009). Bei den 150 Tage alten Tieren der Gruppe 5 erfolgte die Tötung nach Betäubung mit Bolzenschussgerät durch Ausbluten. Im weiteren Verlauf wurde das gesamte Eingeweidepaket entnommen und für die Probenentnahme zur Verfügung gestellt.

In jedem Fall wurden proximales Jejunum, distales Ileum und Colon identifiziert. An der antimesenterialen Darmseite wurden hauptsächlich in den ersten zwei Dritteln des proximalen Jejunums aboral Peyersche Platten aufgesucht und entsprechende Darmstücke exzidiert. Diese wurden nach Bedarf mit physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig gespült, um eventuell vorhandenen Darminhalt zu entfernen. Aus den so vorbereiteten Proben wurden direkt kleinere Gewebestücke ausgeschnitten, welche sofort in flüssigen Stickstoff verbracht wurden und entsprechend konserviert werden konnten. Die Gewebefragmente mit einem Durchmesser von etwa 0,5 bis 0,8 cm und einer Länge von ca. 0,5 bis 2 cm wurden in vorgekühlte 2 ml Kryoröhrchen überführt und letztendlich bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Auf diese Weise wurden standardmäßig Proben vom proximalen/distalen Jejunum mit/ohne Peyerschen Platten, Ileum inklusive Peyerscher Platten, Colon und mesenterialen Lymphknoten entnommen. Gelegentlich wurden auch andere Gewebe- bzw. Organproben von Milz, Pankreas, Leber, Herz, Skelettmuskel und Ohrknorpel entnommen und ebenso kryokonserviert.

2.2 Herstellung von Gefrierschnitt-Präparaten

Zur Herstellung von Gefrierschnittpräparaten wurden die benötigten kryokonservierten Gewebelöckchen mindestens 30 Minuten vor der weiteren Nutzung, zur Akklimatisation, aus der -80 °C Lagerung in den auf -20 °C temperierten Arbeitsraum des Kryostaten (siehe 8.1) verbracht. Die Gewebelöcke wurden in entsprechender Orientierung zur Anfertigung von Querschnitten durch den Darm mittels Einfriermedium (Jung, Leica) auf das Gewebetisch-

chen aufgeklebt und in die Schneidevorrichtung eingespannt. Die nun angefertigten 5 μm dicken Gefrierschnitte wurden mit Superfrost Plus Objektträgern (Menzel-Gläser; ThermoScientific) vom Schnitttisch aufgenommen und für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Durch sofortige Kontrolle am Mikroskop wurde möglichst sichergestellt, dass die angefertigten Darmquerschnitte die gewünschten Dom- und Zottenareale in ausreichendem Maße enthalten. Die so angefertigten Gefrierschnitt-Präparate konnten sofort weiterverarbeitet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert werden. Zur speziellen Präparation von Gefrierschnitten für die isH mit RNS-Sonden siehe 2.8.1.

2.3 Immunhistologische Fluoreszenzfärbungen

Sämtliche immunhistologischen Fluoreszenzfärbungen fanden an folgenden drei Schweinen statt (siehe auch 2.1).

- **Schwein 1:** 28 Lebenstage; nur Sauenmilch; entspricht Gruppe 1
- **Schwein 2:** 39 Lebenstage; 28 Tage Sauenmilch; 10 Tage konventionelles Futter; entspricht Gruppe 3
- **Schwein 3:** 150 Lebenstage; 28 Tage Sauenmilch; 122 Tage konventionelles Futter; entspricht Gruppe 5

Von kryokonservierten Gewebeproben dieser Schweine wurden, wie unter 2.2 beschrieben, serielle Gewebeschnitte hergestellt. Es wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Dreifach-Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Zur besseren Übersicht wurden alle Zellkerne durch eine DAPI-Kernfärbung dargestellt (Kapuscinski 1995). Zusätzlich wurden auf ausgewählten Präparaten die in Tabelle 3 aufgeführten Marker in Mehrfach-Fluoreszenzfärbungen dargestellt.

Marker 1	Marker 2	Marker 3
DAPI	Cy 90	CD 45
DAPI	Cy 90	CD 2
DAPI	Cy 90	CD 4
DAPI	Cy 90	CD 8
DAPI	Cy 90	MHCII DR
DAPI	Cy 90	sIg
DAPI	Cy 90	SWC 3

Tabelle 2: Übersicht Dreifach-Fluoreszenz-Färbungen mit Darstellung der M-Zellen

Kontroll-, Einzel- und Doppelfärbungen sowie Isotypkontrollen sind nicht dargestellt. Durch die verwendete Software Axiovision 4.6 konnten die Einzelbilder einer Mehrfachfluoreszenzaufnahme beliebig zu- und abgeschaltet werden. Die sekundäre Farbdarstellung der Marker 2 und 3 ist z.T. different.

Marker 1	Marker 2	Marker 3
DAPI	Laminin	CD 8
DAPI	CD 21	Autofluoreszenz
CD 3	CD 4	CD 8

Tabelle 3: Übersicht der Mehrfach-Fluoreszenz-Färbungen ohne M-Zell-Darstellung

Kontroll-, Einzel- und Doppelfärbungen sowie Isotypkontrollen sind nicht dargestellt. Durch die verwendete Software Axiovision 4.6 konnten die Einzelbilder einer Mehrfachfluoreszenzaufnahme beliebig zu- und abgeschaltet werden. Die sekundäre Farbdarstellung der Marker ist zum Teil different.

2.3.1 Färbeprotokoll

Fixierung und Blockierung

- 90 sec in Methanol-Aceton bei 4 °C (Küvette) fixieren
- mindestens 5 min in TBS-Tween spülen, TBS-Tween zwischendurch auswechseln
- Präparate in feuchte Kammer legen und 50 µl 5% Schweineserum zur Blockierung auf jedes Präparat pipettieren
- 15 min auf Schüttler inkubieren
- 5 min in TBS-Tween spülen

1. Antikörper

- Präparate in feuchte Kammer legen
- 50 µl (bzw. je 25 µl bei Mehrfachfärbungen) der Antikörper in entsprechender Konzentration auf Präparat pipettieren (siehe Tabelle 10 im Anhang)
- 2 Stunden bei 4 °C auf Schüttler inkubieren
- 5 min in TBS-Tween spülen

2. Antikörper

- Präparate in feuchte Kammer legen
- 50 µl (bzw. je 25 µl bei Mehrfachfärbungen) der Antikörper in entsprechender Konzentration auf Präparat pipettieren (siehe Tabelle 11 im Anhang)
- 1 Stunde bei 4 °C auf Schüttler inkubieren
- 5 min in TBS-Tween spülen

Konjugate

- 50 µl des Konjugates in entsprechender Konzentration auf Präparat geben (siehe Tabelle 12)
- 30 min auf Schüttler inkubieren
- mindestens 5 min in TBS-Tween spülen

DAPI-Kernfärbung (Kapuscinski 1995)

- 50 µl DAPI 1: 10 in AK-Verdünnungspuffer auf Präparat geben
- 2 min inkubieren
- 2x 5 min in TBS-Tween spülen

Die sekundären fluoreszenzkonjugierten Antikörper sowie die fluoreszierenden Konjugate wurden vor Verwendung bei 4 °C und 12.400 U/min abzentrifugiert. Dadurch sollte die Verschleppung von fluoreszierenden Partikeln auf das Präparat verhindert werden. Die gefärbten Präparate wurden mit dem Eindeckmedium für Fluoreszenz (siehe Anhang) sowie Deckgläschen (Menzel-Gläser; ThermoScientific) der entsprechenden Größe eingedeckelt, mit handelsüblichem farblosem Nagellack versiegelt und bei 4 °C dunkel gelagert.

Die Methoden zur qualitativen und quantitativen Auswertung sind unter 2.9 beschrieben.

2.4 Immunhistologische Färbungen

Die für die immunhistologischen Färbungen verwendeten Gefrierschnitt-Präparate wurden entweder wie unter 2.2 beschrieben frisch angefertigt oder es wurden entsprechende, bei -20°C aufbewahrte Präparate verwendet. Gelagerte Gefrierschnitt-Präparate wurden vor der weiteren Verwendung mindestens zwei Stunden getrocknet. Zur Unterteilung der Objektträger und zur Begrenzung der eingesetzten Volumina wurden die Gefrierschnitte mit einem

PAP-Pen (Dako) nach Bedarf umkreist. Aufgrund enzymatischer Tätigkeit der Alkalischen Phosphatase bilden sich letztlich mit dem Diazoniumsalz „Fast Blue“ leicht detektierbare blauviolette Azofarbstoff-Komplexe.

2.4.1 Färbeprotokoll

Fixierung und Blockierung

- 90 sec in Methanol-Aceton bei 4 °C (Küvette) fixieren
- mindestens 5 min in TBS-Tween spülen, TBS-Tween zwischendurch auswechseln
- Präparate in feuchte Kammer legen und 50 µl 5% Schweineserum zur Blockierung auf jedes Präparat pipettieren
- 15 min auf Schüttler inkubieren
- 5 min in TBS-Tween spülen

1. Antikörper

- Präparate in feuchte Kammer legen
- 50 µl des Antikörpers in entsprechender Konzentration auf Präparat pipettieren (siehe Tabelle 10 im Anhang)
- 30 min auf Schüttler inkubieren
- 5 min in TBS-Tween spülen

2. Antikörper

- Präparate in feuchte Kammer legen
- 50 µl des Antikörpers in entsprechender Konzentration auf Präparat pipettieren (siehe Tabelle 11 im Anhang)
- 30 min auf Schüttler inkubieren
- 5 min in TBS-Tween spülen

AP-Konjugat

- Präparate in feuchte Kammer legen
- 50 µl AP-Egg-White Avidin (Jackson Immuno Research) 1: 50 auf Präparat geben
- 30 min auf Schüttler inkubieren
- mindestens 5 min in TBS-Tween spülen
- währenddessen 2 mg Fast Blue in 4 ml APAAP-Substrat lösen, 5 min stehen lassen und anschließend filtrieren (möglichst frisch einsetzen)

Enzymatische Reaktion- Substratumsatz

- je 50 µl der filtrierten Fast Blue-Lösung (gelblich) auf die Präparate geben
- ca. 20 min inkubieren, Farbumschlag beobachten!
- Fast Blue in den Sondermüll abspülen
- 5 min in TBS-Tween spülen

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Eindeckmedium Glycergel (Dako) sowie Deckgläschen (Menzel-Gläser; ThermoScientific) der entsprechenden Größe eingedeckelt, mit handelsüblichem farblosem Nagellack versiegelt und bei Raumtemperatur gelagert.

Die Methoden zur qualitativen und quantitativen Auswertung sind unter 2.9 beschrieben.

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren; Klonierung

2.5.1 Vermehrung von *E.coli* zur Vervielfachung von Plasmiden

Die zur Vermehrung von *E. coli* benötigten Nährmedien wurden bei 121 °C für mindestens 20 Minuten autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wie Antibiotikazusätze wurden sterilfiltriert (Spritzenfilter 0,22 µm Porengröße; Roth). Festen Medien wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf <60 °C nach Bedarf das/die nötige/n Antibiotika laut Tabelle 15 (siehe Anhang) zugegeben. Die Medien wurden steril in Petrischalen gegossen und bis zur Verwendung dunkel bei 4 °C gelagert. Den flüssigen Medien wurden die Antibiotika kurz vor der Verwendung steril zugegeben.

Die Zellanzucht erfolgte ausgehend von Glycerin-Stammkulturen oder Einzelkolonien eines Ausstriches. Dazu wurden unter entsprechendem Selektionsdruck 5 bis 30 ml Kulturen bei 37°C im Schüttelinkubator bei 250 U/min in Über-Nacht-Kulturen angezogen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 5.000 g für 10 min.

2.5.2 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die für Restriktionsanalysen, Sequenzierungs- und Klonierungsarbeiten sowie in-vitro-Transkriptionen nötige Plasmid-DNS aus den verschiedenen *E. coli*-Stämmen wurde mittels des Nucleobond AX Kit (Macherey-Nagel) nach Protokoll aus den Zellernten isoliert. Dabei wurde die an Silikat-Säulen gebundene Plasmid-DNS letztendlich in Volumina von 30 bis

100 µl H₂O bidest eluiert, die Konzentration bestimmt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Restriktion von Plasmiden und DNS-Fragmenten

Die Restriktion von DNS, durch entsprechende Enzyme erfolgte zu analytischen Zwecken in 20 µl- und zu präparativen Verwendungen in 100 µl-Ansätzen. Dabei wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffersysteme benutzt. Der Verdau fand in der Regel für ein bis zwei Stunden statt. Den Restriktionsansätzen wurden die nach Herstellerangaben benötigten Enzymmengen zugegeben. Der vollständige Restriktionsverdau wurde anschließend durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel kontrolliert.

2.5.3.1 Verwendete Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme wurden zur Klonierung, wie zur Linearisierung von Plasmiden in Vorbereitung für in-vitro-Transkriptionen benutzt.

Je nach Anwendung wurden entweder 20, 50 oder 100 µl Einzel- oder Doppelverdaue in den mitgelieferten Puffersystemen nach Herstellerangaben für 60 bis 90 Minuten durchgeführt.

2.5.3.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten zu analytischen und präparativen Zwecken erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern, die mit einem ein- bis zweiprozentigen Agarosegel beschickt wurden. Durch bereits dem Agarosegel zugegebenem Ethidiumbromid konnten die DNS-Banden mittels Geldokumentationssystem (FluorChem; Alpha Innotech Corporation) dokumentiert und ausgewertet werden.

2.5.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNS-Fragmente einer bestimmten Größe, welche in Klonierungsstrategien weitere Verwendung finden sollten, wurden aus dem Gel unter möglichst geringer UV-Belastung auf einem UV-Lichttisch ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen) laut Protokoll isoliert. Die Elution der DNS-Fragmente erfolgte in 20 bis 30 µl H₂O bidest.

2.5.4 Ligation von Plasmiden und DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNS-Molekülen wurde die drei- bis fünffache Menge vom Insert gegenüber dem Vektor eingesetzt, wenn ein Fragment in einen Vektor integriert werden sollte. Die Ligation wurde mit T4 DNS-Ligase (Fermentas) durchgeführt und lief für ein oder 16 Stun-

den bei 22 bzw. 8 °C in einem Ansatz nach Herstellerangaben ab. Die mitgelieferten Puffer enthielten die benötigten Konzentrationen an ATP. Zu Kontrollzwecken wurden Ansätze ohne Insert-DNS mitgeführt.

2.5.5 Transformation von *E. coli*

Um die bei der Ligation neu geschaffenen Plasmide in *E. coli* zu transformieren, wurde das Transform Aid Bacterial Transformations Kit von Fermentas verwendet. Basierend auf der Erzeugung chemischer Kompetenz konnte – von original *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ Über-Nacht-Kulturen (siehe Anhang) ausgehend – die Transformationen nach Herstellerprotokoll erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei wurden 5 bis 15 µl aus den Ligationsansätzen eingesetzt und außerdem Kontrollen ohne Ligationsansatz mitgeführt.

2.5.6 Selektion von Transformanten

Zur Auswahl der plasmid- und inserthaltigen Klone wurde das Verfahren der Blau-Weiß-Selektion verwendet. Grundsätzlich basierend auf dem Vorgang der α -Komplementation, wird hier eine Blau-Färbung der positiven Klone durch Umsatz des Substrates X-Gal (Fermentas) verhindert. Dies geschieht dadurch, dass eine DNS-Insertion in die Multiple Cloning Site des Vektors die erfolgreiche Expression des lacZ-Gens, also die α -Komplementation und damit auch den letztendlichen Substratumsatz verhindert. Daher wurden zur weiteren Anzucht nur weiße Kolonien, welche unter dem Selektionsdruck durch Ampicillin/Tetracyclin bzw. Kanamycin/Tetracyclin entstanden sind, übertragen (gepickt). Um Kontaminationen von plasmid- und insertnegativen Klonen, die sich unter den gepickten weißen Kolonien befunden haben könnten, zu vermeiden, wurden die positiven Kolonien/ Klone nochmals durch fraktionierten Ausstrich vereinzelt bevor Sie zur Herstellung von Stammkulturen vermehrt wurden. Selektierte, vereinzelt und vermehrte Klone wurden außerdem durch einen Restriktionsverdau der isolierten Plasmide und anschließende analytische Agarosegelelektrophorese auf das Vorhandensein eines Inserts in der entsprechenden Größe vor der weiteren Verwendung getestet.

2.5.7 Herstellung und Lagerung von Stammkulturen

Positiv selektierte Klone wurden in selektiven 30 ml Kulturen angezogen und anschließend bei 5.000 g für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem LB-Medium (siehe

Anhang) resuspendiert. In vorbereiteten 2 ml Kryoröhrchen (Roth) wurde die Zellsuspension 1:1 mit dem Schutzstoff – steriles 30%iges Glycerin (Sigma) – gründlich gemischt. Nach einer Eindringphase von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Stammkulturen anschließend in einem isopropanolgefüllten Einfriercontainer (Nalgene) langsam bei -80 °C eingefroren und gelagert. Die Herstellung und Lagerung dieser gentechnisch veränderten Organismen wurde gemäß den Vorschriften des Gentechnikgesetzes dokumentiert.

Alle in der Tabelle 13 im Anhang aufgeführten Plasmide wurden bzw. waren in den Laborstamm *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' von Stratagene (Genotype: $\Delta(mcrA)183\ \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173\ endA1\ supE44\ thi-1\ recA1\ gyrA96\ relA1\ lac$ [F' *proAB lacIqZ* Δ M15 Tn10 (Tetr)]) transfiziert. Dieser Stamm wurde zur Herstellung von Stammkulturen sowie zur Vermehrung der Plasmide benutzt.

2.5.8 Isolation von Gesamt-RNS aus Zellkulturen

Bei den Arbeiten zur Isolation von Gesamt-RNS wurden die unter 2.5.12 aufgeführten Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen eingehalten.

1. Homogenisierung

- je 10^7 Zellen wurden in 1 ml TRIZOL (Quiagen) durch mehrfaches Aufziehen mittels einer 1 ml-Spritze homogenisiert

2. Phasenseparation

- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- pro ml TRIZOL 0,2 ml Chloroform (Roth) und 15 s kräftig schütteln
- 3 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 15 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugieren

3. RNS- Präzipitation

- wässrige obere Phase in neues Röhrchen überführen
- (rosa untere Phase u.U. in DNS-Separation weiterverarbeiten)
- 0,5 ml Isopropylalkohol pro ml TRIZOL hinzugeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 10 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugieren

4. Waschen der RNS

- Überstand durch vorsichtiges Abkippen verwerfen
- Pellet in 75% Ethanol waschen (~2 ml Ethanol pro 1 ml TRIZOL); vortexen
- bei 7.500 g 5 min bei 4 °C zentrifugieren

5. Resuspendieren der RNS

- Pellet trocknen lassen
- Pellet in 10-50 µl RNasefreiem DEPC-Wasser aufnehmen

Die isolierte RNS-Menge wurde durch Konzentrationsmessung (siehe 2.5.11) bestimmt, die Konzentration gegebenenfalls auf 1 µg/µl eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.5.9 Umschreiben von (m)RNS in (c)DNS durch reverse Transkription

Die Umschreibung von isolierter RNS in DNS erfolgte durch reverse Transkription während einer PCR (RT-PCR) unter Verwendung von Oligo-dT-Primern. Dabei wurden die unter 2.9.12 aufgeführten Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen eingehalten. Es wurde das „RevertAidTM -Kit“ (Fermentas) mit der M-MuLV Reverse Transkriptase, welche eine niedrige Ribonuklease H-Aktivität besitzt, verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurden Gesamt-RNS und Oligo-dT-Primer gemischt, mit Wasser verdünnt und die Sekundärstrukturen der RNS für 5 min bei 70 °C denaturiert. Nach Vereinigung mit dem Nukleotide- und dem Enzym-Ansatz wurde die cDNS nach untenstehendem Protokoll in einem PCR Thermoblock (Eppendorf) synthetisiert.

Syntheseprotokoll:

60 min	42 °C
10 min	70 °C (Inaktivierung des Enzymes)
10 min	20 °C
dann auf	4 °C

Den 20 µl Ansätzen wurden je 80 µl DEPC-H₂O zugegeben und diese wurden so bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.5.10 Amplifikation von DNS-Fragmenten durch PCR

DNS-Insert-Fragmente zur Klonierung in Vektoren wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, um ausreichend Material zu gewinnen. Dabei wurde die Taq-Polymerase (Fermentas) mit 5 U/ μ l nach Herstellerangaben verwendet. Die zugehörigen Puffersubstanzen enthielten hierbei bereits die benötigten und optimierten Konzentrationen von $MgCl_2$ und KCl. Der dNTP-Mix wurde in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben, die benötigten Primer (siehe Anhang Tabelle 14) mit jeweils 100 pmol/ μ l. Die Amplifikation erfolgte in einem PCR Thermoblock (Eppendorf) nach untenstehendem Syntheseprotokoll.

PCR-Syntheseprotokoll:

Denaturierung	initial 5 min 95 °C, dann 30 sec 95 °C
Annealing	30 sec 55 °C
Elongation	30- 45 sec 72 °C; Endelongation 5 min 72 °C
Zyklen	30- 33

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, dargestellt, kontrolliert und dokumentiert. Aus präparativen Gelen wurden die DNA-Fragmente zur weiteren Verwendung wie beschrieben isoliert.

2.5.11 Bestimmung von RNS- und DNS-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von DNS- sowie RNS-Molekülen erfolgte mittels photometrischer Messung. Bei Unterscheidung von RNS und DNS sowie Eingabe des Verdünnungsfaktors resultierte eine automatische Berechnung der Konzentrationen durch das Photometer SmartSpec 3000 (Biorad). Ansonsten konnte durch visuellen Vergleich von Bandenintensitäten bekannter und unbekannter Nukleinsäurekonzentrationen im Agarosegel der Gehalt grob abgeschätzt werden.

2.5.12 Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit RNS

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch allgegenwärtige und sehr stabile RNasen wurden grundsätzlich folgende Maßnahmen eingehalten:

- Sämtliche Plastik- und Einwegmaterialien wie z.B. Pipettenspitzen und Tubes wurden zertifiziert RNase-frei erworben.
- Glasmaterialien wurden bei 180 °C für 8 Stunden gebacken.
- Hitzeempfindliche Plastikmaterialien wurden mit 1%iger (v/v) Wasserstoffperoxidlösung für 30 min behandelt und mit DEPC-Wasser gespült, um vorhandene RNasen zu inaktivieren.
- Angesezte Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNasen mit DEPC behandelt und autoklaviert.
- Es wurden möglichst RNase-freie Chemikalien verwendet.
- Sensible Ansätze, wie z.B. RNS in-vitro-Transkriptionen, wurden mit einem RNase-Inhibitor-Cocktail (Fermentas) versetzt.
- Sämtliche RNS Arbeiten wurden an einem separaten RNS-Arbeitsplatz durchgeführt.
- Nötige Arbeiten mit RNasen wurden in anderen Räumlichkeiten durchgeführt.

2.6 Herstellung von DIG-markierten RNS-Sonden

Sämtliche Arbeiten zur Herstellung DIG-markierter RNS-Sonden wurden unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen durchgeführt (siehe 2.5.12).

2.6.1 Vorbereitung der Template-DNS

Zur Herstellung der Template-DNS wurden jeweils die entsprechenden plasmidtragenden *E. coli*-Stämme vermehrt. Mit der Zellernte einer unter selektivem Antibiotikadruck gewachsenen 30 ml LB-Medium-Kultur wurde eine Plasmidpräparation mit dem Nucleobond AX Kit (Macherey-Nagel) zur Gewinnung der Plasmid-DNS als Template für die in-vitro-Transkription durchgeführt. Die ringförmige Template-Plasmid-DNS wurde durch einen Restriktionsverdau linearisiert (siehe 2.5.3), um später in der in-vitro-Transkription definierte Sondenlängen zu erhalten. Die benutzten Restriktionsenzyme sind im Anhang in Tabelle 16 aufgelistet.

2.6.2 Entfernung von 3'-Überhängen an der Template-DNS

Da die benutzten Restriktionsenzyme KpnI und SacI 3'-Überhänge produzieren, wurden diese hier durch die T4-DNS-Polymerase 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fermentas) abgebaut

(Sambrook et al. 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual). Dazu wurde die Reaktion für 5 min bei Raumtemperatur nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme im Restriktionsansatz nach Zugabe von 2 mM dNTP Mix durchgeführt. Die Exonuklease-Aktivität wurde ebenfalls durch Hitzeinaktivierung bei 75 °C für 10 min gestoppt.

2.6.3 Aufreinigung der Template-DNS durch Phenol-Chloroform-Fällung

Um Verunreinigungen der Template-DNS durch Proteine zu beseitigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Fällung durchgeführt. Der Ansatz mit dem linearisierten Plasmid wurde hierzu mit einer Phenol-Chloroform-Lösung (Rotiphenol, Roth) Verhältnis 1:1 gemischt und bis zum Entstehen einer milchigen Lösung für eine Minute mittels Vortexer stark geschüttelt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 12.000 g wurde die DNS-haltige obere wässrige Phase abgenommen und die organische Phase mit den Verunreinigungen verworfen. Die wässrige Phase wurde erneut im Verhältnis 1:1 mit Chloroform (Roth) gemischt und für eine Minute gevortext. Eine zweite Phasentrennung erfolgte durch eine weitere Zentrifugation bei Raumtemperatur und 12.000 g für zwei Minuten. Die abgenommene DNS-haltige wässrige Phase wurde zur Fällung der Template-DNS mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (Sigma) sowie einem Volumen vorgekühltem Isopropanol (Roth) gemischt. Die Fällung fand über Nacht bei -20 °C statt. Die ausgefallene Template-DNS wurde für 15 min bei 4 °C und 15.000 g pelletiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl kaltem 70% Ethanol (Roth) gewaschen und erneut für 15 min bei 4 °C und 15.000 g zentrifugiert. Anschließend konnte, nach kompletter Entfernung des Ethanols durch Trocknung bei 37 °C, das Pellet in 10 µl RNase-freiem DEPC-Wasser aufgenommen werden. Es wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt und die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte auf Eis oder bei -20 °C.

2.6.4 In-vitro-Transkription zur Herstellung DIG-markierter RNS

Die Herstellung der DIG-markierten RNS-Sonden fand während einer in-vitro-Transkription nach folgendem Protokoll statt:

In-vitro-Transkriptionsansatz (einfach; 20 µl)

1 µg linearisierte aufgereinigte Plasmid-DNS	x µl
10x Transkriptionspuffer (Roche)	2 µl
10x DIG-RNS-Labeling-Mix (Roche)	2 µl

RNase-Inhibitor (Fermentas)	1 μ l
RNase-freies DEPC-H ₂ O	x μ l
RNS-Polymerase T3 oder T7 (Fermentas)	1 μ l

Je nach zur Verfügung stehender Template-DNS-Menge wurden zur Optimierung der Ausbeute einfache, doppelte bzw. dreifache Ansätze realisiert. Die Reaktion lief für 90 bis 120 min bei 37 °C und wurde durch die anschließende weitere Aufbereitung der Sonde (LiCl-Fällung) gestoppt.

Aus den Tabellen 16 und 17 im Anhang ist zu entnehmen, welche Kombination von linearisiertem Plasmid (Angabe des Restriktionsenzymes) und passender viraler Polymerase zur Herstellung welcher DIG-markierten RNS-Sonde führt.

Außerdem wurden zu Kontrollzwecken RNS-Sonden ohne DIG-Markierung hergestellt. Dazu wurde der DIG-RNS-Labeling-Mix durch einen entsprechenden Mix mit unmarkierten Nucleotiden ersetzt.

2.6.5 RNS-Sondenaufbereitung durch LiCl-Fällung

Die während der in-vitro-Transkription synthetisierte Sonden-RNS wurde durch eine folgende LiCl-Fällung aufgereinigt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 4 M LiCl sowie 1 Volumen kaltes Isopropanol (–20 °C) und kräftigem Schütteln (Vortexer) wurde gleichzeitig die in-vitro-Transkription gestoppt. Die Sonden-RNS wurde über Nacht bei –20 °C gefällt. Die ausgefallene RNS wurde für 20 min bei 4 °C und 12.000 g pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 μ l kaltem 70% Ethanol (–20 °C) gewaschen und erneut für 20 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Nach restloser Entfernung des Ethanols wurde die Sonden-RNS in 20- 30 μ l RNasefreiem DEPC-Wasser aufgenommen. Die Sondenkonzentration wurde bestimmt, auf vergleichbare Konzentrationen eingestellt und aliquotiert. Aliquots zur zeitnahen Verwendung wurden bei –20 °C aufbewahrt oder längerfristig bei –80 °C gelagert. Die Funktionalität der Sonden wurde wie unter 2.7 beschrieben getestet.

2.7 Kontrolle der DIG-markierten RNS-Sonden

Zur Kontrolle der hergestellten Sonden wurde ein Northern-Blot mit anschließender Detektion der DIG-markierten RNS-Sonde durchgeführt. Auf diese Weise konnte die korrekte Größe der Sonden überprüft und ihre grundsätzliche Detektierbarkeit nachgewiesen werden. Um zusätzlich die Signalstärke besser abschätzen zu können, wurde außerdem ein Dot-Blot mit

Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:10.000 in RNS-Verdünnungspuffer (siehe Anhang, Benutzte Puffer und Lösungen) angefertigt.

2.7.1 Agarose-Formaldehyd-RNS-Gelchromatographie

Analog zu Punkt 2.5.3.2 Agarose Gelelektrophorese wurden auch hier 1% ige Agarosegele zur Detektion und Dokumentation der per in-vitro-Transkription hergestellten Sonden verwendet. Um die einzelsträngigen RNS-Moleküle an intramolekularen Wechselwirkungen zu hindern und linear zu halten, wurde als Denaturierungsmittel Formaldehyd verwendet. Die Aldehydgruppen des Formaldehyds bilden hier mit den Aminogruppen der Nukleotidbasen Schiffsbasen, so dass diese nicht mehr zur Bildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stehen. Für den Gellauf wurde MOPS-Puffer als Elektrodenpuffer verwendet. Vor Beladung der Geltaschen erfolgte für 5 min ein Pre-Run.

2.7.2 RNS-Transfer durch Vakuum-Blot (Northern-Blot)

Um die RNS aus dem Agarosegel auf einer Nylonmembran weiter bearbeiten zu können, wurde ein RNS-Transfer mittels Vakuum Blotsystem (Vacu-Blot VB21; Whatmann Biometra) durchgeführt. Dazu wurde das RNS-Gel für 2 x 15 min mit DEPC-H₂O unter leichtem Schütteln (Wipptisch) gewässert und anschließend für weitere 15 min mit 10x SSC-Puffer (siehe Anhang; Benutzte Puffer und Lösungen) ebenfalls unter leichtem Schütteln für den Blot äquilibriert. Die Nylonmembran (SensiBlot+, Fermentas) und das Filterpapier (3 mm dick, Whatmann Biometra) in entsprechender Größe wurden ebenso mit 10x SSC-Puffer vorbereitet. Der Vakuum-Blot wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut und der RNS-Transfer fand bei einem Unterdruck von 200 bis 400 mbar für 1 h 40 min mit 10x SSC als Laufpuffer statt. Um eine kovalente Bindung der RNS an die Nylonmembranen zu erreichen, wurden die Membranen vom Vakuum-Blot sowie vom Dot-Blot (siehe 2.11) zuerst für 15 min bei 70 °C im Wärmeschrank getrocknet, dann in Folie (Saran) eingeschlagen und für 1 min auf dem UV-Transilluminator (UV Flächenstrahler N36 M; Benda) bestrahlt.

2.7.3 Detektion von DIG-markierter RNS auf Nylonmembran

Zur Detektion der DIG-markierten Moleküle auf der Nylonmembran wurden zuerst die unspezifischen Bindungen durch eine 30-minütige Waschung mit PBS-Puffer inklusive 3% BSA blockiert. Zum Nachweis der DIG-Markierung wurden die Membranen für 90 min mit einem

Anti-DIG-Fab-Fragment und konjugierter Alkalischer Phosphatase (1: 750 in PBS + 3% BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in PBS-Puffer erfolgte eine fünfminütige Äquilibration der Membranen in APS-Puffer. Sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte fanden unter leichtem Schütteln auf einem Wipptisch statt. Ohne Schütteln fand die Färbereaktion mit frisch angesetzter Substratlösung (NBT/ BCIP) in APS-Puffer statt. Die Reaktion wurde beobachtet und bei ausreichender Färbung nach etwa 3 bis 5 min dekantiert und die Reaktion mit H₂O bidest gestoppt werden. Die luftgetrockneten Membranen wurden ausgewertet und dokumentiert. Die hergestellten RNS-Sonden ohne DIG-Markierung konnten durch diesen Immunoblot nicht nachgewiesen werden, hier kann nur auf die entsprechenden Banden im Agarose-Formaldehyd-RNS-Gel verwiesen werden.

Sämtliche hier und in der In-situ-Hybridisierung zur Detektion der DIG-markierten RNS verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

2.8 In-situ-Hybridisierung (isH) mit DIG-markierten RNS-Sonden

Zum Nachweis transkribierter Zytokin-mRNS in einem Gefrierschnitt-Präparat wurde eine in-situ-Hybridisierung durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass die RNS-RNS-Bindung stärker als eine DNS-RNS-Hybrid- bzw. eine DNS-DNS-Bindung ausfällt, wurden dazu selbst hergestellte DIG-markierte RNS-Sonden (siehe 2.6 + Tabellen 16 und 17 im Anhang) verwendet.

Sämtliche Bedingungen der einzelnen isH, wie z.B. untersuchte Gewebe, verwendete Sonden, entsprechende Salzkonzentrationen der Puffer und Hybridisierungslösungen, die passenden Hybridisierungs- und Stringenzwäsche-Temperaturen etc., wurden mittels standardisierten Protokollblättern erfasst und dokumentiert.

2.8.1 Vorbereitung der Gefrierdünnschnitte

Um die zur Anfertigung von Kryodünnschnitten notwendigen RNase-freien Objektträger mit entsprechenden Haftungseigenschaften zu erhalten, wurden diese in einer Lösung von 5 ml 3-Aminopropyltriethoxysilane (AES; Sigma) in 250 ml Aceton (Roth) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 2x in DEPC-H₂O für je 10 min gewaschen, abschließend für 8 h bei 180 °C gebacken, steril verpackt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Prinzipiell wurden für die isH 12 µm dicke Gefrierdünnschnitte angefertigt und so auf den Objektträgern positioniert, dass es nachfolgend möglich war, mehrere Gewebeanschnitte mit

einem passenden Rahmen (in situ Frame, Fisher Scientific; 30, 60 oder 120 μ l) zu umkleben. Die angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden anschließend für 90 min getrocknet, dann sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Gelagerte Objektträger wurden nach dem Auftauen nochmals für 60 min getrocknet.

2.8.1.1 Fixierung

Zur Fixierung des Gewebes wurden die Objektträger in einer Küvette mit frisch hergestellter 4% Paraformaldehydlösung für 10 bis 60 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 3 mal für je 5 min mit PBS-Puffer gewaschen.

2.8.1.2 Permeabilisierung

Um das fixierte Gewebe für die Sonden zugänglicher zu machen, wurden die Gewebe für 5 min in frisch angesetztem 0,4% Triton X-100 in PBS-Puffer inkubiert und anschließend für 5 min mit PBS-Puffer gewaschen.

2.8.1.3 Acetylierung

Zur Neutralisierung positiv geladener Moleküle und um zu verhindern, dass die Sonden später an die Objektträgerbeschichtung unspezifisch binden, wurden die Gewebe für 10 min mit einer 0,1 M TEA-Lösung, welcher frisch 0,25% Acet-Anhydrid (Sigma) zugesetzt wurde, behandelt.

2.8.1.4 Dehydrierung

Zur Entwässerung der Gewebe wurden die Objektträger für jeweils 3 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50, 70, 90 und 100% Ethanol behandelt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte für mindestens 10 min getrocknet und alsdann mit entweder 30, 60 oder 120 μ l Rahmen (in situ Frame, Fisher Scientific) versehen.

2.8.2 In-situ-Hybrisierung (isH) (Williams et al. 1999)

Für die eigentliche in-situ-Hybridisierung wurden die benötigten RNS-Sonde-Aliquots langsam auf Eis aufgetaut. Die DIG-markierten RNS-Sonden wurden in Konzentrationen von 0,5-10 ng/ μ l der entsprechenden auf 60 °C vorgewärmten 2x Hybridisierungslösung zugegeben und gut durchmischt. Das ebenfalls auf 60 °C vorgewärmte Dextranulfat-Formamid wurde im Verhältnis 1:1 zugegeben, nochmals gut durchmischt und weiter für mindestens 5 min bei 60 °C inkubiert. Je nach Rahmengröße wurden nun 30, 60 oder 120 μ l der RNS-Sondenhaltigen Hybridisierungslösung in die Rahmen pipettiert. Zu Kontrollzwecken wurden zusätz-

lich Hybridisierungslösungen ohne RNS-Sonden oder/und mit RNS-Sonden ohne DIG-Markierung verbracht. Im Anschluss wurden die Rahmen möglichst luftblasenfrei mit Deckeln versehen. Durch diese Maßnahme wurde verhindert, dass während der isH Teile der Pufferlösung verdunsten und Konzentrationsverschiebungen auftreten. Die Hybridisierung fand dann über Nacht in einem programmierbaren Hybridisierungsofen (Omnislide; Hybaid) nach folgendem Programm statt.

Omnislide-Hybridisierungs-Programm (allgemein)

Initial	10 min	80 °C
Temp.gradient	je 5 min	bei 75, 70, 65, 60, (55), (50), (45) °C
Hybrid.temperatur	über Nacht	45 - 55 °C

Je nach eingesetzter Sonde und experimentellem Ansatz unterschieden sich der Endpunkt des Temperaturgradienten (Werte in Klammern) und die letztendliche Hybridisierungstemperatur. Nach der Hybridisierung wurden Deckel samt Rahmen wieder vom Objektträger entfernt.

2.8.3 Stringenzwäsche

Zur Regulation der Stringenz und Optimierung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses wurde wie folgt eine Stringenzwäsche durchgeführt. Nach einer initialen Waschung mit 2x SSC-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur folgten weitere Waschschrte mit 1x und (0,6x), 0,5x, (0,4x), (0,2x) SSC-Puffer für ebenfalls je 10 min bei Raumtemperatur. Die anschließende entscheidende Stringenzwäsche fand bei einer Temperatur zwischen 58 bis 65 °C für 60 min im Wasserbad mit einem SSC-Puffer von 0,2x, 0,4x oder 0,6x statt. Die Salzkonzentrationen des SSC-Puffers der eigentlichen Stringenzwäsche wurden je nach RNS-Sonde sowie experimentellem Ansatz ausgewählt bzw. eingestellt und bestimmten so auch die niedrigste Salzkonzentration der vorangehenden Waschschrte (Werte in Klammern). Abschließend erfolgte ein letztes Waschen für 5 min bei Raumtemperatur mit 2x SSC-Puffer.

2.8.4 Detektion der mRNS-Sonden

Um störende Einflüsse durch einzelsträngige RNS-Moleküle auf dem Gewebeschnitt zu beseitigen, wurde ein 20-minütiger RNase A-Verdau (10 µg/ml RNase A in RNase-Puffer) bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Durch die Hybridisierung werden doppelsträngige RNS-Moleküle aufgrund der RNase A nicht abgebaut und bleiben für die anschließende Detektion

erhalten. Um die RNase-Reste gründlich zu entfernen, wurde fünf Mal für je 2 min mit 2x SSC-Puffer bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln gewaschen. Zur Äquilibrierung der Gewebe für die folgende Blockierung wurde im Anschluss noch drei Mal mit PBS-Puffer für je 2 min bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Blockierung fand für 30 min in einer feuchten Kammer mit 1% Schweineserum in PBS-Puffer statt. Danach wurden die Gewebe kurz mit PBS-Puffer gewaschen und zur Detektion der DIG-markierten RNS mit einem anti-DIG-AP-Fab-Fragment (Konzentration 1:200; siehe Tabelle im Anhang) in PBS-Puffer mit 1% Schweineserum für 90 min unter leichtem Schütteln in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Entfernung der anti-DIG-AP-Fab-Fragmente wurde anschließend drei Mal 5 min mit PBS-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen.

Die enzymatische Färbereaktion fand für 30 min bis 18 Stunden bei 37 °C im Wasserbad unter Lichtausschluss statt. Dazu wurden als Substrat für die alkalischen Phosphatase frisch hergestelltes NBT (400 µl/100 ml aus NBT-Stammlösung) und BCIP (332 µl/ 100 ml aus BCIP-Stammlösung) im APS-Puffer gemischt. Die Reaktion wurde überwacht und bei ausreichendem Signal-Hintergrund-Verhältnis mit H₂O bidest gestoppt. Schlussendlich wurden die Gewebe auf den Objektträgern mit Glyergel (Dako) luftblasenfrei eingedeckt und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung, Auswertung und Dokumentation gelagert.

2.9 Mikroskopie und Auswertung

2.9.1 Mikroskopie und Photographie

Zur qualitativen und quantitativen Auswertung der angefertigten Gewebeschnitte, immunhistochemischen Färbungen sowie der in-situ-Hybridisierungen wurden entweder das Primostar-Tischmikroskop (nur Durchlicht, für kurze Beurteilungen und Qualitätskontrollen) oder das computergestützte Axioplan 2 imaging Fluoreszenz-Mikroskop (beide Carl Zeiss AG) mit angeschlossener Kamera Spot Slider 2000 2.3.1 (Diagnostic Instruments Inc.) und die Axiovision 4.6-Software (Carl Zeiss AG) benutzt. Die Kamera produziert Bilder mit 1600 x 1200 Bildpunkten. Die FastBlue-Färbungen aus Teil 2 sowie die in-situ-Hybridisierungen im dritten Teil der Arbeit wurden im Durchlichtmikroskop ausgewertet. Es wurden Aufnahmen mit den Vergrößerungsfaktoren 50x, 100x, 200x und 400x erstellt. Für die Beurteilung der Ein- oder Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbungen aus dem ersten Teil der Arbeit wurden die in den Strahlengang einer Quecksilberdampfampe eingeschwenkten Filtersätze Nummer 01 und 49 für die Fluorochrome DAPI sowie Alexa 350, Nr. 09 und 10 für FITC sowie Alexa 488 und

Nr. 15 für TXRD (alle Carl Zeiss AG) verwendet. Aufnahmen wurden hier in den Vergrößerungsstufen 200x und 400x realisiert. Um die Fotoaufnahmen zu erstellen, wurde ausschließlich die kamerazugehörige Software Spot Advanced 4.09 benutzt.

Über eine Einbindung per Twain-Schnittstelle konnten die Aufnahmen zur weiteren Bearbeitung und Auswertung in die Axiovision-Software-Anwendung einbezogen werden. Alle Aufnahmen wurden als Pixelbilder entweder im *.tiff- oder Axiovision-eigenem *.zvi-Format gespeichert und ausgewertet. Diese Formate sind verlustfrei ineinander überführbar. Der Erhalt aller Informationen, vor allem der korrekten Pixelanzahl, war Grundlage für die zur Auswertung nötigen Flächenberechnungen. Dazu wurden jedem Bild die entsprechenden Skalierungsfiles, passend zum Vergrößerungsfaktor der Aufnahme, zugewiesen. Lediglich zu Dokumentations- und Darstellungszwecken wurden Kopien der Aufnahmen im komprimierten Zustand als *.jpg-Bild mit entsprechendem Informationsverlust gespeichert. Die Axiovision-Software-Anwendung ist in der Lage Mehrfach-Fluoreszenz-Aufnahmen, unter Erhalt der Einzelbilder, innerhalb einer *.zvi-Datei zu verwalten, einzeln zu bearbeiten und auszuwerten. Grundsätzlich wurden, zur Feststellung der Qualität der Gewebeschnitte sowie der Färbung die gesamten Schnittflächen betrachtet und beurteilt. Für die zur Auswertung bestimmten Aufnahmen wurden folgende Areale ausgewählt (siehe z.B. Abbildungen 18 und 19):

- **Domareal:** Lage über einem Follikel; zum Lumen hin und nach basal abgrenzbares Epithel
- **Zottenareal:** frei ins Lumen ragende Zotten mit abgrenzbarem Epithel
- **Follikel:** runde bis ovale Form; in Lamina propria bis Grenze zur Lamina muscularis gelegen; gegeneinander und gegen Umfeld deutlich abgrenzbar
- **Intrafollikuläre Zone:** Bereich lateral eines Follikels bzw. zwischen mindestens zwei Follikeln

Je nach experimentellem Ansatz und den Gegebenheiten der einzelnen Gewebeschnitte wurden möglichst alle typischen Domareale und eine Auswahl der anderen Areale, insbesondere der Zottenareale, fotografisch erfasst.

2.9.2 Zählung, Auswertung und Statistik

Um die Anzahl der zu differenzierenden Zellen korrekt erfassen und statistisch auswerten zu können, wurden sämtliche Marker⁺-Zellen per Hand durch Anklicken markiert und dabei au-

tomatisch durch die Axiovision-Anwendung erfasst und gezählt. Damit vergleichbare Daten generiert werden konnten, wurden alle erfassten Zellzahlen auf eine Normfläche von 10.000 μm^2 bezogen. Dazu wurden vor der Zellzählung, per Hand, folgende vier Flächen (Kompartimente) durch Umranden mit einem Flächen-Markierungswerkzeug der Axiovision-Anwendung festgelegt. Der Flächeninhalt in μm^2 wurde dabei automatisch berechnet.

- **Domepithel (DE):** Abgrenzung zum Lumen; Grenze im Bereich der Basallamina bis maximal zur Basis des Domes
- **Subepitheliales Domareal (SED):** basal der Basallamina bis maximal zur Basis des Domes
- **Zottenepithel (ZE):** Abgrenzung zum Lumen; Grenze im Bereich der Basallamina bis maximal zur Basis der Zotte
- **Zotten Lamina propria (LP):** basal der Basallamina bis maximal zur Basis der Zotte

Alle erfassten Zellen wurden je einer dieser Flächen zugeordnet, sofern sie deutlich innerhalb der Grenzen lagen. Die von der Axiovision-Anwendung automatisch registrierten Werte der Flächen und die zugehörigen Zellzahlen wurden in die MS Office Anwendung Excel importiert, dort auf die Normfläche von 10.000 μm^2 standardisiert und zur folgenden statistischen Auswertung mit dem Statistik-Programm SPSS 15.0 (SPSS Inc.) in entsprechenden Datensätzen zusammengefasst. Dabei wurden jedem Fall (= auf Fläche normierte Zellzahl) die entsprechenden Merkmale zugeordnet: Marker, Kompartiment, Gruppenzugehörigkeit, Tiernummer, Alter, Gesundheitszustand, Futter, Sauenmilch.

Außerdem wurden in begrenztem Umfang die Gesamtanzahl der Follikel in den Gewebeschnitten sowie der Anteil an Follikeln mit einem entsprechendem Domareal erhoben.

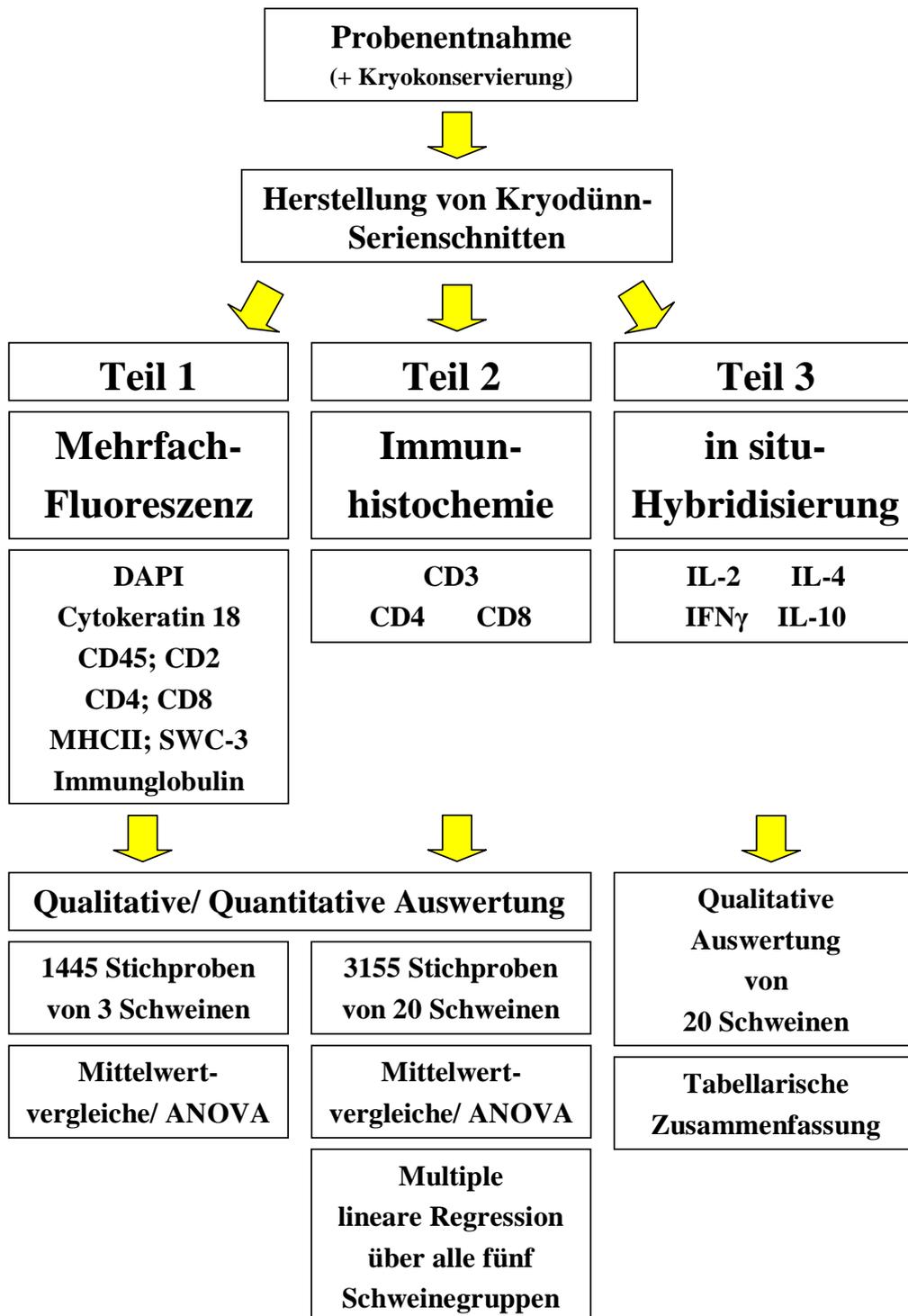


Abbildung 4a: Übersicht Stichprobenerhebung und Auswertung

Im ersten Teil der Arbeit (siehe Ergebnisse 3.2) wurden die Proben aus je einem Schwein der Gruppen 1, 3 und 5 (siehe 2.1) genauer untersucht. Zur Feststellung der durchschnittlichen Gesamtzellzahlen in den einzelnen oben aufgeführten Kompartimenten der Dom- und Zottenregionen wurden sämtliche durch die DAPI-Kernfärbung dargestellten Zellen in den entspre-

chend abgegrenzten Arealen gezählt. Pro Schwein und Marker (siehe Tabelle 2) wurden je 10 Dom- und je 4 (+/- 2) Zottenareale mit ihren Kompartimenten ausgezählt und so insgesamt 1.445 Stichproben ermittelt. Die Anzahl der Marker⁺ Zellen pro 10.000 μm^2 der einzelnen Kompartimente wurde zum einen in Bezug zu den ermittelten Gesamtzellzahlen der entsprechenden Kompartimente gesetzt und als prozentualer Wert angegeben. Zum anderen erfolgte eine statistische Auswertung durch einfache Mittelwertvergleiche für die entsprechenden Marker⁺-Zellen im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten. Dabei wurden entweder a) nur die Stichproben aus je einem Schwein verwendet, hier sind die gewonnenen Daten entsprechend repräsentativ für den jejunalen Darm des Individuums, oder es wurden b) die Strichproben aller drei Schweine zur Berechnung herangezogen, in diesem Falle sind die Daten in einem begrenzten Rahmen beispielhaft für die dargestellten jejunalen Darmkompartimente der untersuchten Landschweinrasse. Fehlerbalken wurden grundsätzlich als 95%iges Konfidenzintervall angegeben.

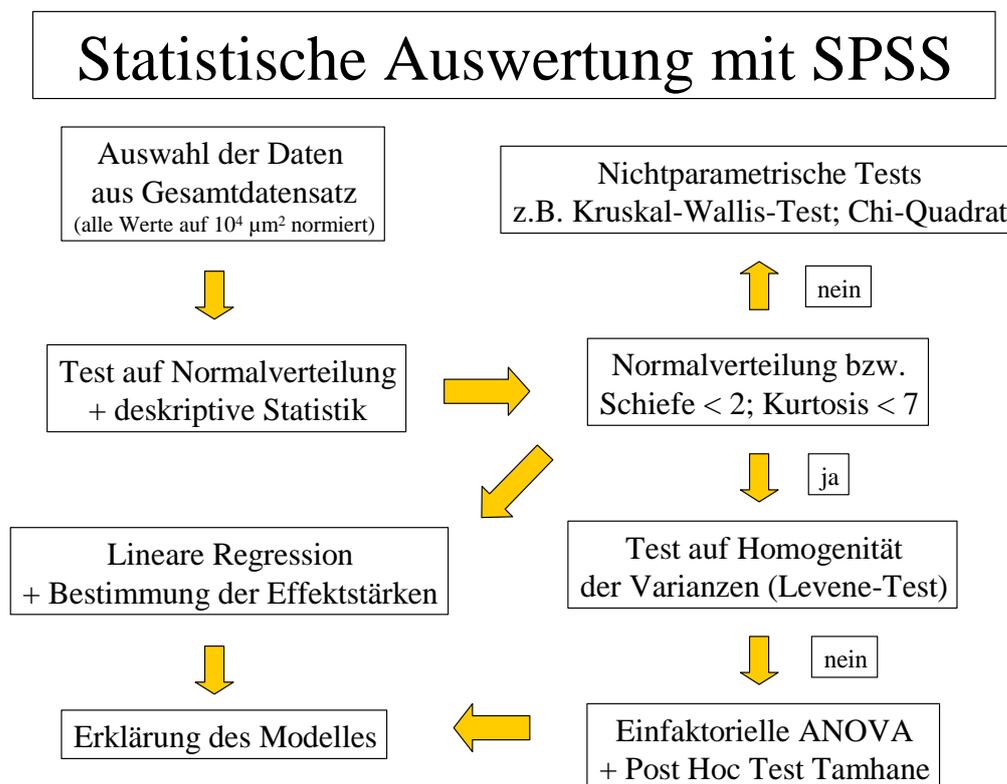


Abbildung 4b: Übersicht der statistischen Auswertung mit dem Programm SPSS

Im zweiten und dritten Teil der Arbeit wurden die Stichproben von jeweils vier Schweinen aus fünf differenten Gruppen (siehe 2.1) untersucht und ausgewertet.

Um die quantitativen statistischen Auswertungen im zweiten Teil der Arbeit (siehe Ergebnisse 3.3) durchführen zu können, wurden von jedem Schwein für jeden Marker und jedes Kompartiment jeweils 5 ± 3 Stichproben, wie oben beschrieben, fotografiert, ausgezählt, normiert und in den SPSS-Datensatz übertragen. Jedem Stichprobenwert wurden die Merkmale Schweinegruppe (nominal), Tiernummer (nominal), Marker (nominal), Areal (nominal), Kompartiment (nominal), Gesundheitszustand (*E. coli*) (nominal), Alter (metrisch), Sauenmilch (metrisch) und Futter (metrisch) zugeordnet (insgesamt 3155 Stichproben). Wie in Abbildung 4b in der Übersicht dargestellt, wurden zuerst die entsprechenden Daten aus dem Datensatz ausgewählt und zunächst deskriptiv ausgewertet. Anschließend wurden die Daten daraufhin überprüft, ob sie die Anforderungen für die durchzuführenden inferenzstatistischen, multivariaten Verfahren erfüllen. Für T-Test auf Mittelwertunterschiede, Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und Lineare Regressionsanalyse (Nosho et al. 2010; Zhu et al. 2009) müssen die Daten zumindest approximativ normalverteilt sein. Darüber hinaus sollten die Varianzen der zu prüfenden Variablen homogen sein. Die Prüfung auf Varianzgleichheit wurde mit Hilfe des Levene-Tests durchgeführt. Zur Analyse der Verhältnisse in den einzelnen Kompartimenten und der Unterschiede in den differenten Schweinegruppen wurde eine Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, die einen Vergleich mehrerer Gruppen ermöglicht. Da einige Daten die Voraussetzung der Varianzhomogenität nicht erfüllten, wurde anschließend der Tanhame Post-Hoc-Test T2 durchgeführt, der keine Varianzhomogenität voraussetzt. Fehlerbalken wurden dabei grundsätzlich als 95%iges Konfidenzintervall angegeben. Neben diesen Gruppenvergleichen wurde schließlich auf Basis der Werte sämtlicher Stichproben aller Schweine aus den fünf differenten Gruppen für die unterschiedlichen Marker eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen mehreren Variablen charakterisieren zu können. In das Regressionsmodell wurden die Zellzahlen in den einzelnen Kompartimenten als abhängige Variable sowie die Merkmale Alter, Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ als unabhängige, erklärende Variablen einbezogen, so dass eine Analyse des Zusammenhangs zwischen der beobachteten Zellzahl und den erhobenen äußeren Faktoren möglich ist. Für die einzelnen erklärenden Variablen wurden die standardisierten Beta-Koeffizienten angegeben, um die Stärke des Einflusses der jeweiligen Variable einschätzen zu können. Die Güte des Gesamtmodells wurde schließlich mit Hilfe des Bestimmtheitsmaßes R^2 (korrigiertes R^2 ; Determinationskoeffizient) angegeben, das anzeigt, wie gut die abhängige Variable durch die unabhängigen Variablen im Modell erklärt wird, indem die durch das Modell erklärte Varianz in das Verhältnis zur Gesamtvarianz gesetzt wird.

Erreichte bzw. knapp verfehlte Signifikanzniveaus werden entweder als p-Wert direkt im Text angegeben oder in Tabellen bei Werten mit $p \leq 0,05$ mit einem (*), Werten mit $p \leq 0,01$ mit zwei (**) und bei Werten mit $p \leq 0,001$ mit drei (***) Sternen gekennzeichnet.

Neben der quantitativen statistischen Auswertung wurden typische Bilder, wiederkehrende Muster sowie bemerkenswerte Einzelbeobachtungen qualitativ beschrieben, beispielhaft fotografiert, dokumentiert, dargestellt und tabellarisch zusammengefasst.

3 Ergebnisse

3.1 *Anschnitt Jejunum und Darstellung der Basalmembran*

3.1.1 Übersicht Anschnitt

Abbildung 5 zeigt beispielhaft einen aus Einzelbildern zusammengesetzten Dünnschnitt des jejunalen Schweinedarmes mit CD8⁺ Zellen zur Übersicht. Im linken Bildbereich sind 12, mit gelben Punkten markierte und innerhalb einer Peyerschen Platte liegende Follikel auf der antimesenterialen Darmseite hervorgehoben. Beispielhaft mit einem grünen Oval umrandet, sind einzelne Follikel, denen sich deutlich je ein typischer Dom zuordnen lässt. Insgesamt sind in diesem Anschnitt sechs typische Domareale so getroffen, dass sie auswertbar sind. Die rote Linie verläuft zur besseren Orientierung im Bereich der Tela submucosa und außerdem sind die in das Lumen des Darmrohres hineinragenden Kerckringfalten nachvollzogen. Die Kerckringfalten begrenzen nach links den Bereich der Peyerschen Platte mit den Follikeln und im rechten Drittel des Bildes drei Bereiche mit typischen Zottenarealen. Am rechten Bildrand ist die mesenteriale Seite des Darmrohres abgeschnitten. Im Bereich der Peyerschen Platte ist die Häufung von CD8⁺ Zellen im interfolliklärem Raum deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind in den Follikelbereichen nur wenige CD8⁺ Zellen zu detektieren. Unterschiede zwischen den typischen Dom- und Zottenarealen sind in Abbildung 5 in dieser Auflösung augenscheinlich nicht feststellbar.

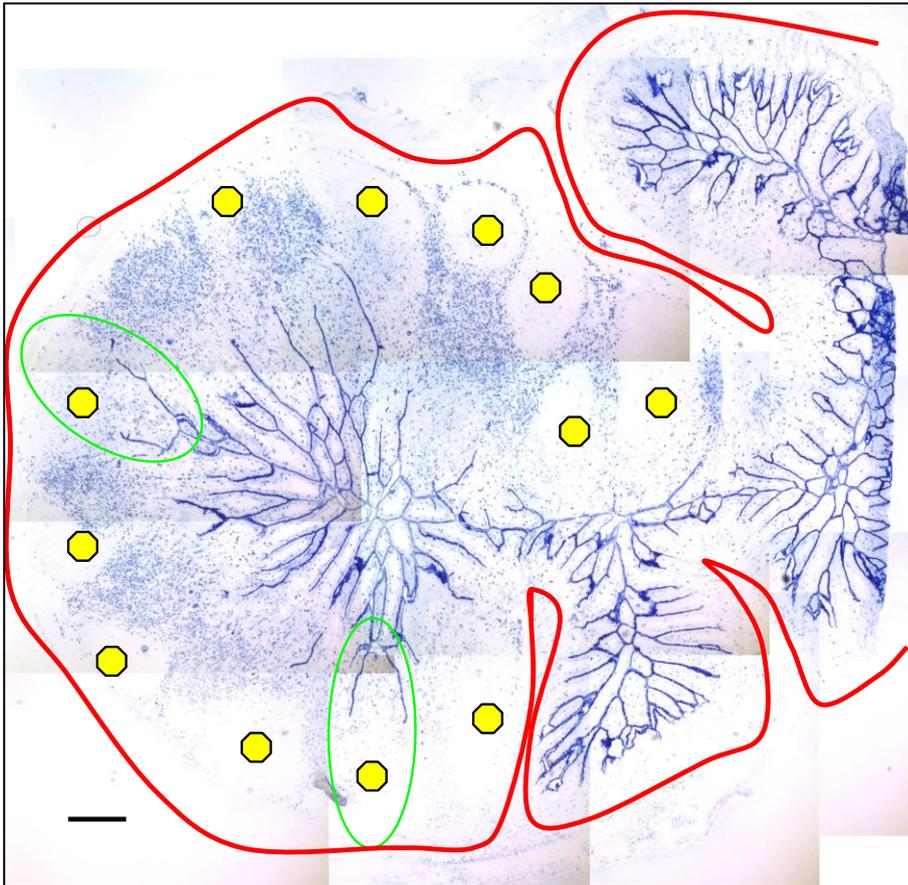


Abbildung 5: Gesamter Anschnitt eines jejunalen Schweinedarmes mit CD8⁺ Zellen

gelbe Punkte: Follikel in Peyerscher Platte auf antimesenterialer Seite; grünes Oval: Follikel mit typischem Dom; blaue Zellen: CD8⁺ Zellen; schwarzer Balken = 350 µm; Vergrößerungsfaktor der Einzelbilder: x50; Die rote Linie verläuft zur besseren Orientierung im Bereich der Tela submucosa und außerdem sind die in das Lumen des Darmrohres hineinragenden Kerckringfalten nachvollzogen. Am rechten Bildrand ist die mesenteriale Seite des Darmrohres abgeschnitten, links daneben liegen typische Zottenareale.

3.1.2 Darstellung der Basallamina

Abbildung 6 zeigt ein typisches Domareal. Neben den blau dargestellten Zellkernen sowie den grünen CD8⁺ Zellen erkennt man hier, rot dargestellt, die Basallamina, Bestandteil der Basalmembran, als Grenze zwischen den Kompartimenten DE und SED. Zum Darmlumen hin gelegen erkennt man deutlich die z.T. mehrreihig erscheinenden übereinander liegenden Zellkerne der hauptsächlich an den Flanken des Domes gelegenen M-zellreichen Regionen. Besonders im Vergleich mit den in Abbildung 7 dargestellten Verhältnissen einer zottentypischen Basalmembran fällt augenscheinlich auf, dass die Laminin⁺-Strukturen im Dombereich insgesamt schwächer ausfallen und häufigere sowie größere Unterbrechungen aufweisen. Im Dom- wie im Zottenepithel sind CD8⁺-Zellen in unterschiedlichen Lokalisationen zu finden. Im Bezug zu den Zellkernen der Enterozyten liegen sie a) intraepithelial auf dem gleichen Level wie die Enterozytenzellkerne, b) intraepithelial auf einem supranuklearen Level zum

Lumen hin gerichtet oder c) auf einem subnuklearen Level auf der luminalen Seite der Basalmembran. Desweiteren sind CD8⁺-Zellen d) innerhalb der Ebene der Basalmembran in einer entsprechenden Lücke und e) subepithelial in der Lamina propria jenseits der Basalmembran liegend zu erkennen (siehe auch beispielhafte Hervorhebungen in Abbildung 7). Für die CD8⁺-Zellen bleibt festzuhalten, dass sich die Mehrzahl, wie unter a), b) und c) beschrieben, im Bereich der Kompartimente DE und ZE befindet. Entsprechende quantitative Auswertungen finden sich in den Teilen 3.2 und 3.3 dieser Arbeit.

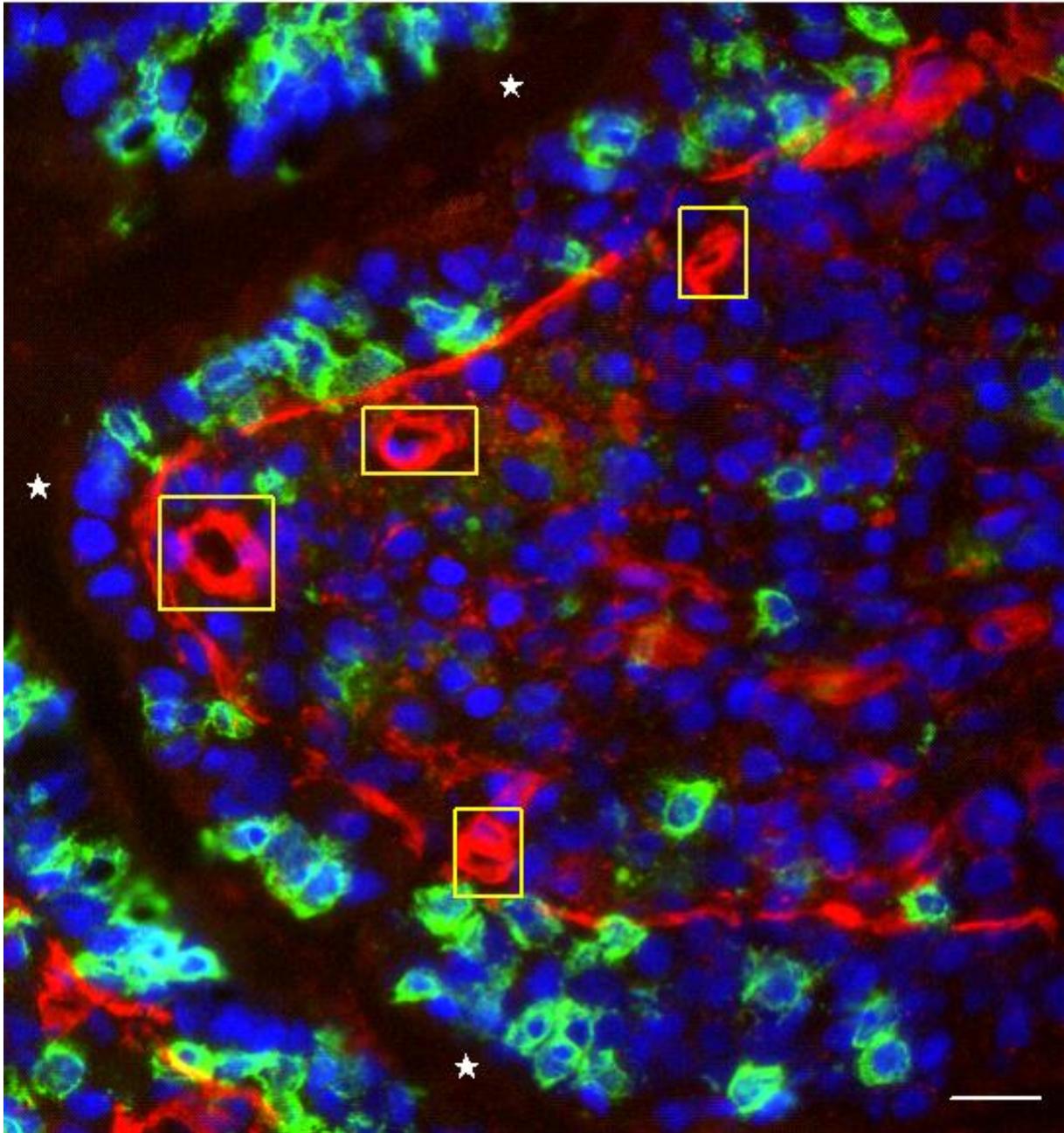


Abbildung 6: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales; Laminin; CD8; DAPI

Laminin = rot; CD8 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; gelbe Rechtecke = Gefäßanschnitte
Länge der weißen Linie = 20µm; Domareal mit Abgrenzung zwischen Domepithel und SED

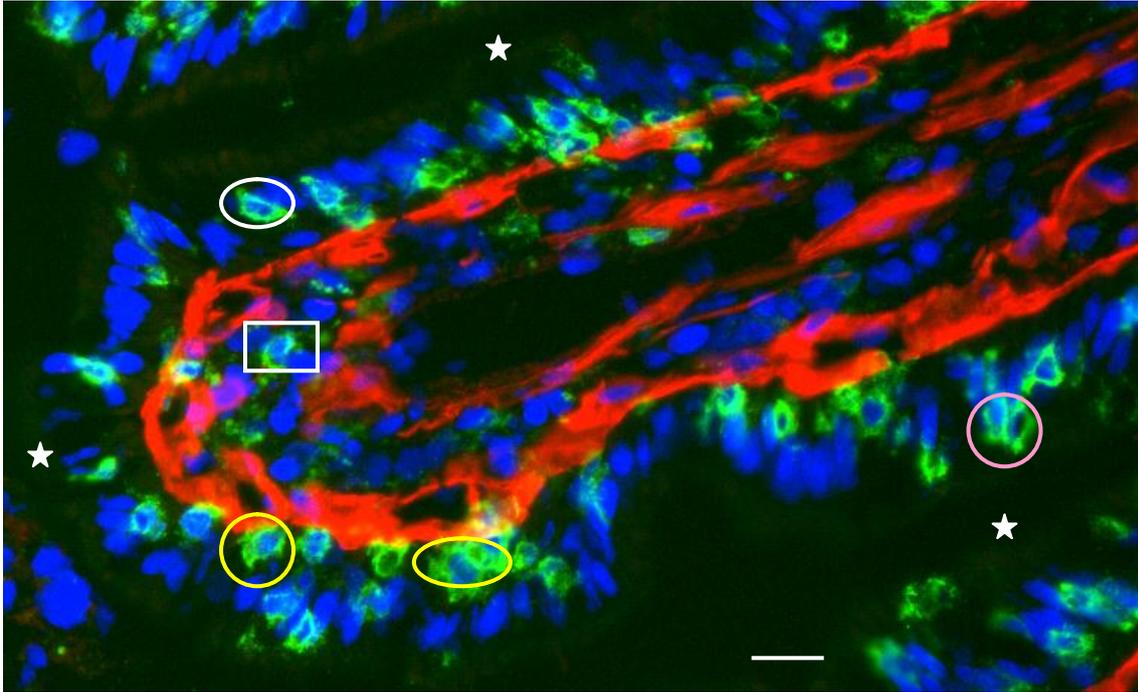


Abbildung 7: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Zottenareales; Laminin; CD8; DAPI

Laminin = rot; CD8 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen. Länge der weißen Linie = 20µm; Zottenareal mit Abgrenzung zwischen Zottenepithel und Zotten-LP; weißer Kreis: intraepitheliale CD8⁺ Zelle auf Niveau der Enterozytenkerne (a); rosa Kreis: supranuklear gelegene intraepitheliale CD8⁺ Zelle (b); gelbe Kreise: subnuklear gelegene intraepitheliale CD8⁺ Zelle (c); weißes Rechteck: subepitheliale CD8⁺ Zelle (e)

3.2 Teil1 - Kolokalisation von M- und immunkompetenten Zellen

Um über die Verteilung von M-Zellen sowie immunkompetenten Zellen in den unter 2.9.2 beschriebenen Kompartimenten des jejunalen Schweinedarmes eine Übersicht zu bekommen, wurden drei Schweine genauer analysiert (siehe Abbildung 4a):

Zur Feststellung der Gesamtzellzahl in den Kompartimenten wurden alle DAPI⁺ Zellkerne gezählt. In folgender Abbildung 8 ist exemplarisch ein Domareal mit entsprechenden DAPI⁺ Zellkernen dargestellt. Zur Orientierung ist der Bereich des Domepithels (DE) gelb umrandet und das Darmlumen mit weißen Sternen markiert.

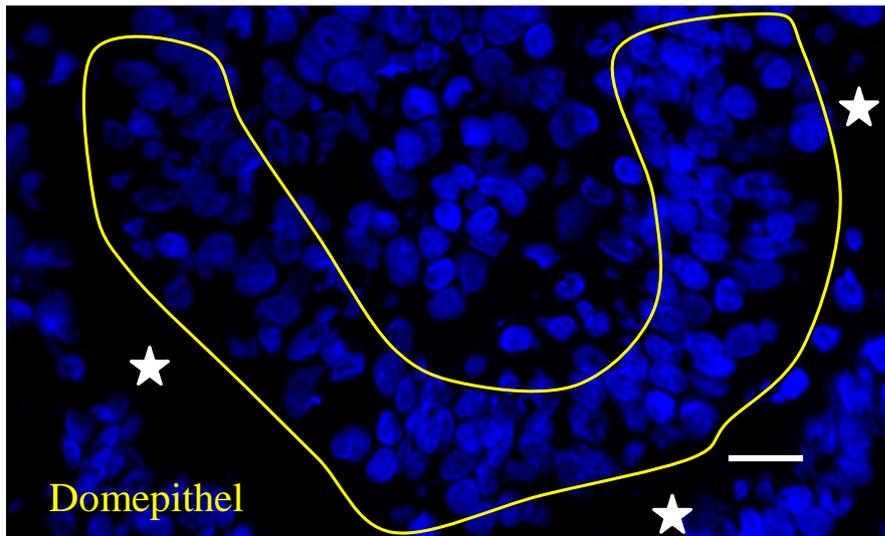


Abbildung 8: DAPI⁺ Zellen (blau) im typischen Domareal

Gelb umrandet sind DAPI⁺ Zellen im Epithel eines typischen Domareals dargestellt. Weiter innenliegende DAPI⁺ Zellen befinden sich im Bereich des subepithelialen Domes. weiße Sterne = Darmlumen, Länge der weißen Linie = 20µm

Wie aus dem Streudiagramm in Abbildung 9 ersichtlich, zeigt der Mittelwertvergleich zwischen den einzelnen Kompartimenten augenscheinlich z.T. größere Unterschiede. Auch zwischen den Schweinen innerhalb eines Kompartimentes können Differenzen festgestellt werden. In den folgenden Darstellungen werden alle Datenpunkte in Balkendiagrammen zusammengefasst.

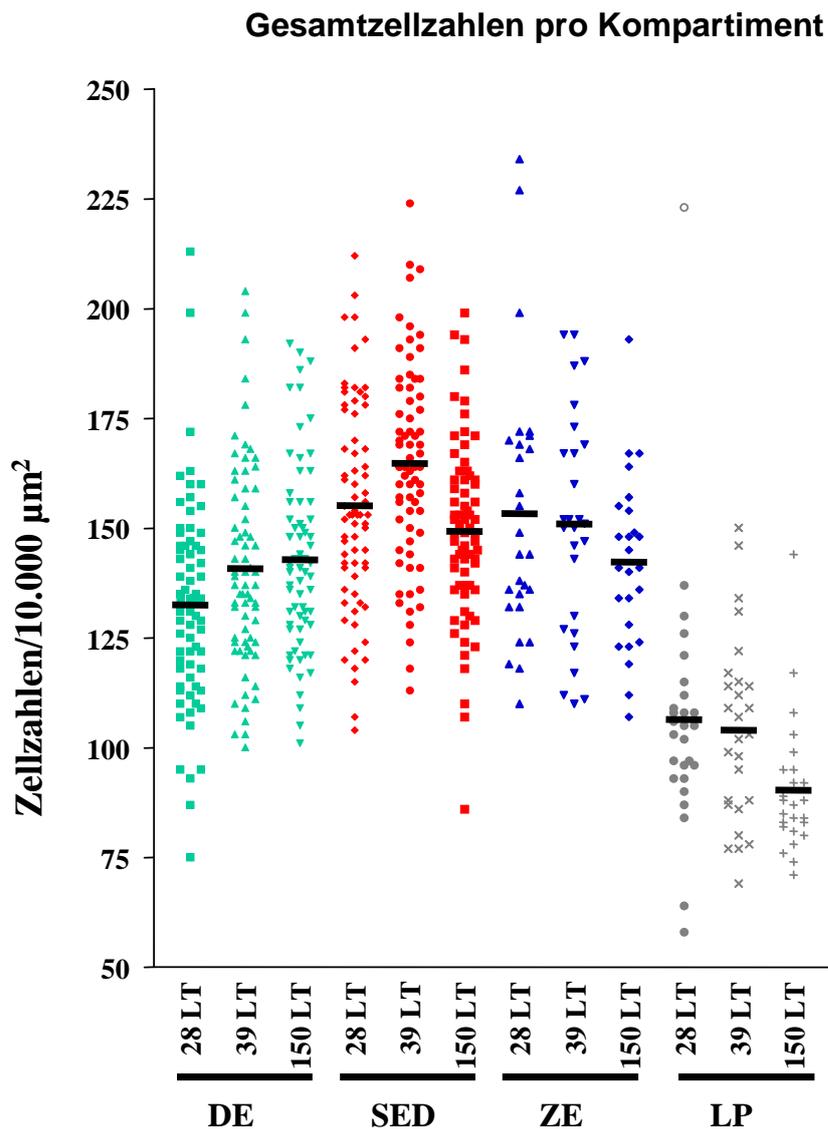


Abbildung 9: Streudiagramm DAPI⁺ Zellen/10.000 μm^2 zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Stichprobe (= Zellzahl im ausgezählten Kompartiment pro 10.000 μm^2). Die einem bestimmten Kompartiment zugehörigen Punktwolken der Stichprobenwerte wurden zur besseren Differenzierung unterschiedlich farbig dargestellt.; schwarzer Balken = Mittelwert

Im Vergleich der drei Schweine scheint die Zellzahl in den Kompartimenten des Zottenareals mit dem Alter abzunehmen. Zum anderen zeigt sich aber im Domepithel ein gegensätzlicher Trend, da hier die Zellzahl mit zunehmendem Alter ansteigt. Ein Blick auf den Bereich des subepithelialen Doms macht darüber hinaus deutlich, dass das Schwein mit 39 Lebenstagen zehn Tage nach dem Absetzen über die höchste Zelldichte verfügt und sich dahingehend von den anderen unterscheidet. In der Zotten-LP sowie im SED ist die Zelldichte des ältesten

Schweins deutlich niedriger als bei Schwein 2. Im SED liegt dieser Unterschied bei etwa 10%.

Da sich die Zellzahlen zwischen den einzelnen Schweinen innerhalb der Kompartimente stellenweise zwar deutlich, aber nicht erheblich unterscheiden und um kompartimentspezifische Mittelwerte zu bestimmen, wurden alle Stichproben von allen drei Schweinen pro Kompartiment miteinander verglichen.

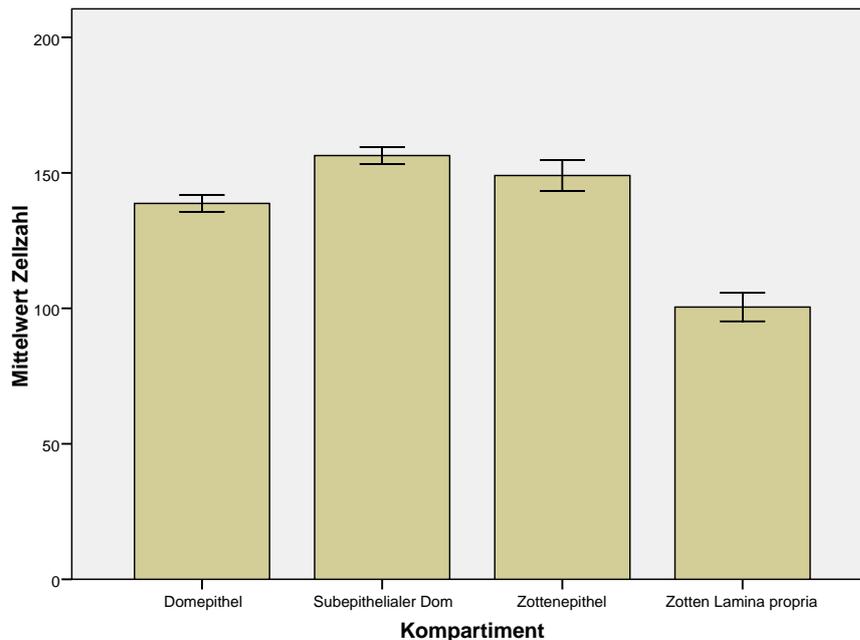


Abbildung 10: Mittelwertvergleich DAPI⁺ Zellen/10.000 μm^2 zwischen Kompartimenten

Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Nach ANOVA und Post-Hoc Test ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kompartimenten. Das Diagramm in Abbildung 10 stellt den Mittelwertvergleich dar.

Die ermittelten Werte zeigen deutlich, dass sich die Zelldichten der einzelnen Kompartimente teilweise stark unterscheiden. Während im subepitheliale Dom mit durchschnittlich 156 Zellen/ 10.000 μm^2 die höchste Zelldichte herrscht, erreicht sie im Domepithel nur einen Wert von 139 Zellen/ 10.000 μm^2 . Der Unterschied zwischen beiden Kompartimenten beträgt damit etwa 11% und ist auf dem Niveau $p < 0,01$ signifikant. Im Zottenareal sind die Verhältnisse umgekehrt, hier besitzt das Zottenepithel mit 149 Zellen/ 10.000 μm^2 eine wesentlich höhere Zelldichte als die Lamina propria mit nur 100 Zellen/ 10.000 μm^2 , so dass sich hier ein signifikanter Unterschied von etwa 32% ergibt ($p < 0,001$). Das Zottenepithel hat demnach eine signifikant höhere Zelldichte als das Domepithel.

3.2.1 Verteilung von Cy90⁺ Zellen

Werden Antikörper gegen das Intermediärfilament Zytokeratin 18 zur Darstellung von M-Zellen (Gebert et al. 1994a; Gebert et al. 1996) benutzt, ergeben sich beispielhaft folgende Bilder im Dom- und Zottenbereich (siehe Abbildung 11 = Dom und Abbildung 12 = Zotten).

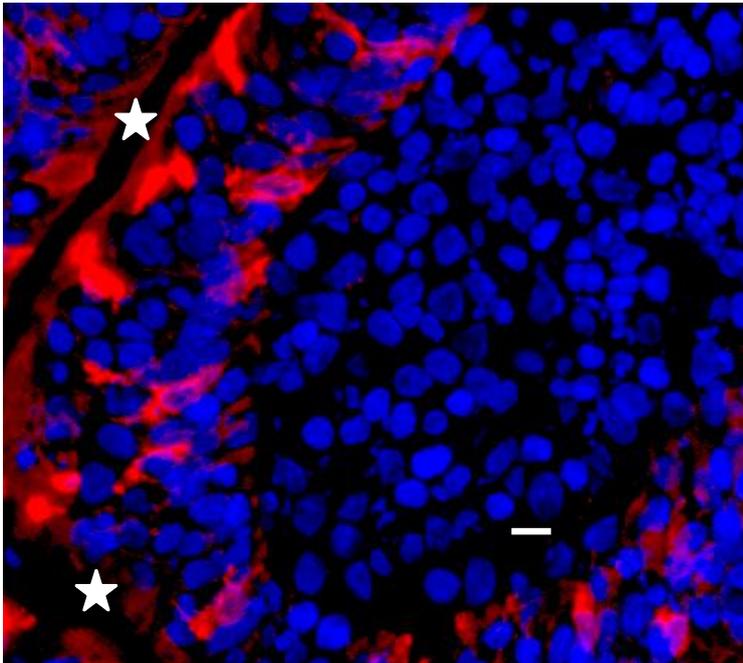


Abbildung 11: Übersicht Cy90⁺ Zellen (rot) im Domareal

Zytokeratin 18 = rot; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 10 μ m; Anschnitt eines Domareales mit M-Zellen

Die im Bereich des Domepithels liegenden Cy90⁺ M-Zellen (Abbildung 11) lassen sich morphologisch sehr gut gegen die im Zottenepithel zu findenden ebenfalls Cy90⁺ Becherzellen abgrenzen (Abbildung 12). Die im Dom liegenden M-Zellen besitzen einen im basalen Bereich liegenden Zellkern. Von da in luminaler Richtung sind regelmäßig weitere Zellkerne zu finden, welche nicht zur M-Zelle gehören (siehe 3.2.2). Diese Zellkerne werden aber auch von den Cy90⁺ intermediären Filamenten der M-Zelle eingeschlossen, so dass die Domepithelien streckenweise die anderthalb- bis zweifache Dicke (vom Lumen bis zur Basalmembran), verglichen mit einem typischen Zottenepithel (siehe Abbildung 12), erreichen. Solche M-zellreiche und besonders dicke Areale befinden sich augenscheinlich am häufigsten in den Flankenbereichen eines typischen Domareales.

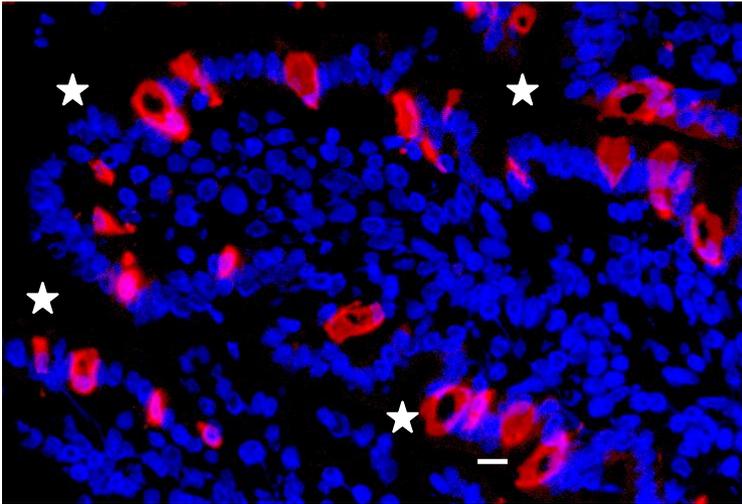


Abbildung 12: Übersicht Cy90⁺ Zellen (rot) im Zottenareal

Zytokeratin 18 = rot; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 10µm; Zottenareal mit längs und quer angeschnittenen Becherzellen

Das in Abbildung 12 dargestellte Zottenareal zeigt dagegen die eher perlschnurartig aufgereihten Kerne der Enterozyten und die typische Form längs (kelchförmig) oder quer (kreisrund) angeschnittener eingestreuter ebenfalls Cy90⁺ Becherzellen. Eine besondere Akkumulation von Cy90⁺ Zellen wie in den Flankenbereichen der Domareale kann bei den Zotten augenscheinlich nicht festgestellt werden.

Wie im Diagramm der Abbildung 13 gezeigt, erstreckt sich die Verteilung von Cy90⁺ Zellen nur auf die epithelialen Kompartimente der Dom- und der Zottenregion. Zytokin 18 positive Zellen sind im Bereich des subepithelialen Domes und der Lamina propria der Zotten nicht nachzuweisen.

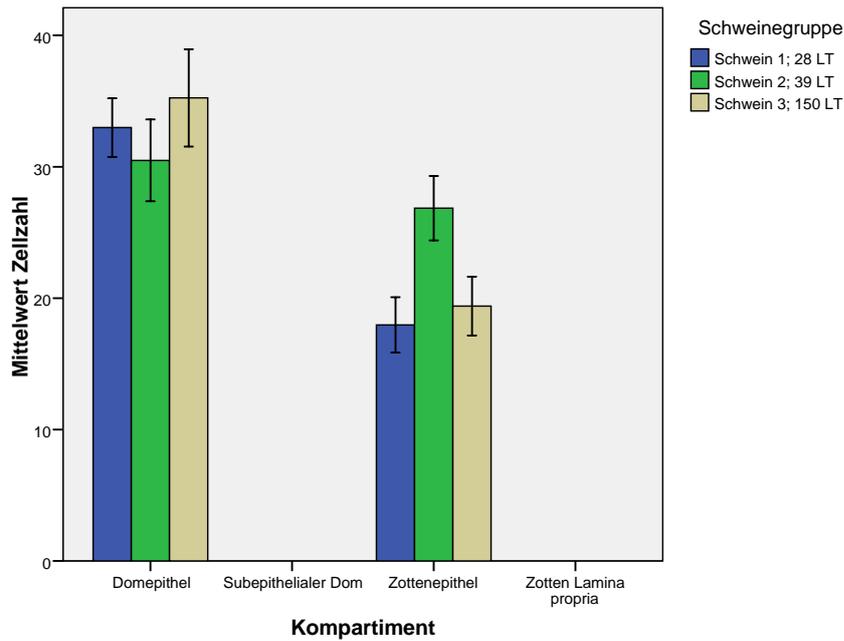


Abbildung 13: Mittelwertvergleich von $Cy90^+$ Zellen/10.000 μm^2 zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Die 95%igen Konfidenzintervalle der im Domepithel bestimmten Mittelwerte von $Cy90^+$ M-Zellen überschneiden sich im Vergleich zwischen den Schweinen deutlich. Dementsprechend lassen sich auch keine größeren Unterschiede feststellen. Der Anteil $Cy90^+$ M-Zellen liegt hier zwischen 30-35 Zellen pro 10.000 μm^2 . Im Gegensatz dazu unterscheidet sich Schwein 2 im Zottenepithel deutlich in der Dichte seiner $Cy90^+$ Becherzellen im Vergleich zu Schwein 1 und 3. Es besitzt eine etwa 11% höhere Becherzellichte.

Folgendes Diagramm in Abbildung 14 stellt den Mittelwertvergleich aller Schweine zwischen den Kompartimenten Dom- und Zottenepithel dar.

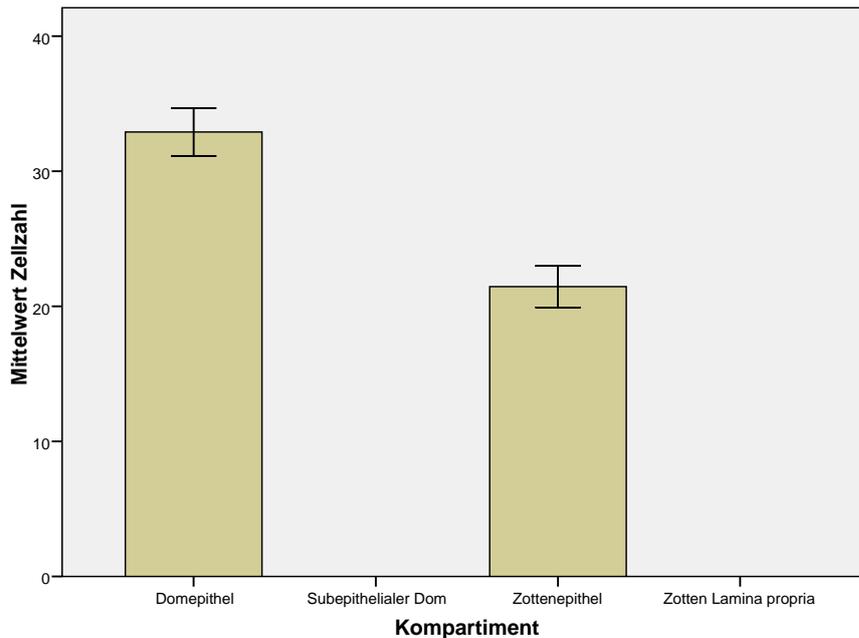


Abbildung 14: Mittelwertvergleich Cy90⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen Kompartimenten

Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Im direkten Vergleich zwischen Dom- und Zottenepithel besitzt das Domepithel mit etwa 37% signifikant ($p < 0,001$) mehr Cy90⁺ Zellen/10.000 μm². Auf die durchschnittlichen Gesamtzellzahlen des jeweiligen Kompartimentes bezogen bedeutet dies, dass sich im jejunalen Domepithel etwa 24% M-Zellen und im entsprechenden Zottenepithel ungefähr 14% Becherzellen befinden. Die M-Zellanteile im Domepithel sind stabil und zeigen im Vergleich dreier Schweine kaum Abweichungen. Im Zottenepithel sind bei den Anteilen der Becherzellen dagegen, wie im Diagramm in Abbildung 13 dargestellt, größere Schwankungen möglich.

3.2.2 Verteilung von CD45⁺ Zellen und Bezug zu M-Zellen

Mit einem CD45-Antikörper als Leukozytenmarker können alle Lymphozyten inklusive der natürlichen Killerzellen, den Granulozyten sowie die Zellen des Monozyten-Makrophagensystemes kenntlich gemacht werden. Im Folgenden ist die weitere Differenzierung von Subtypen möglich. Durch diese Dreifach-Fluoreszenzfärbung konnten insbesondere die immunkompetenten Zellen in ihrem Bezug zu den M-Zellen des Domepitheles dargestellt sowie die entsprechenden Lageverhältnisse in den Zottenarealen aufgeklärt werden (siehe Abbildung 15 = Domareal mit angeschnittenem Zottenarealen).

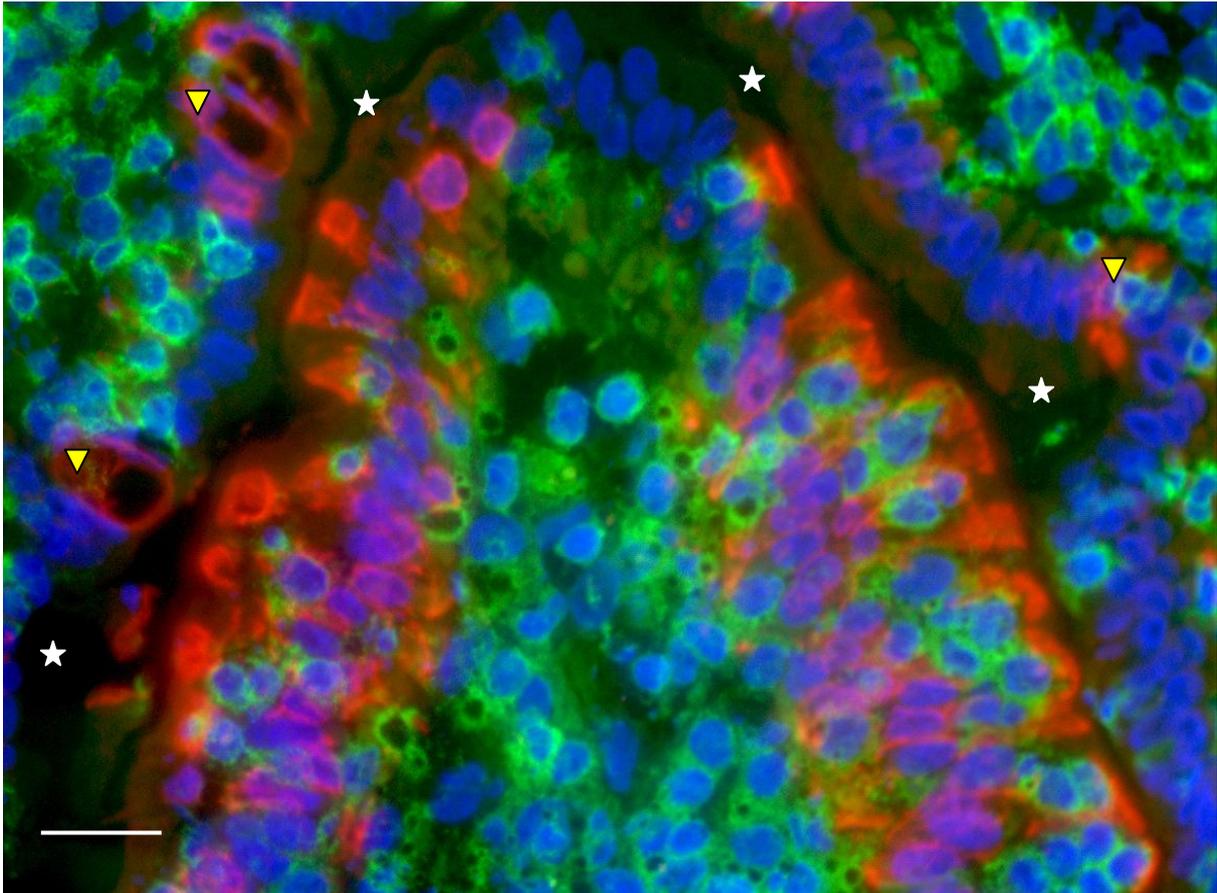


Abbildung 15: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines typischen Domareales; CD45; Cy90; DAPI

CD 45 = grün; Zytokeratin 18 = rot; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; zentral: Domareal mit angeschnittenen M-Zellen im Epithel, flankiert von Zottenepithel (perlschnurartig aneinander gereihte Epithelzellen) mit längs und quer angeschnittenen Becherzellen (gelbe Dreiecke)

Das in Abbildung 15 zentral gelegene Domareal lässt an den Flanken rechts und links stark Zytokeratin 18⁺ M-Zellbereiche (rot) erkennen. Diese Regionen befinden sich innerhalb des Domepithelkompartimentes und sind bis zu 40µm mächtig (vom Lumen bis zur Basalmembran). Rechts und links, jenseits des Darmlumens, sind in Abbildung 15 auch typische Zotten angeschnitten. An der perlschnurartigen Aneinanderreihung der DAPI⁺ Zellkerne kann das Zottenepithelkompartiment differenziert werden. Hier sind einige längs bis quer angeschnittene Zytokeratin 18⁺ Becherzellen (markiert durch gelbe Dreiecke) dargestellt. Die Dicke des Zottenepithelkompartimentes erreicht hier maximal 25 µm.

CD45⁺ Zellen sind in allen vier dargestellten Kompartimenten vorhanden. In den Zottenepithelkompartimenten liegen die CD45⁺ Zellen einzeln oder in Clustern. Im Bezug zu den Enterozyten liegen sie entweder intraepithelial direkt zwischen den Enterozyten oder ebenfalls intraepithelial, aber subnuklear direkt unterhalb der Enterozyten. In der Lamina propria der Zotten ist die große Mehrzahl der Zellen positiv für das Oberflächenmolekül CD45.

Im Domepithel finden sich die meisten der CD45⁺ Zellen in enger Nachbarschaft zu den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten der markierten M-Zellen. Daneben findet man (z.B. in Abbildung 15 in der apikalen Spitze des Domes) auch einzeln gelegene intraepitheliale CD45⁺ Zellen ohne konkreten Bezug zu Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten. Die in enger Nachbarschaft zu den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten gelegenen CD45⁺ Zellen im Domepithel liegen entweder supranuklear in einer Ebene über den eng mit den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten umgebenen DAPI⁺ M-Zellkernen zum Lumen hin oder subnuklear noch intraepithelial bzw. am Übergang zum profunder gelegenen SED direkt unterhalb der M-Zellkerne.

Im folgenden Diagramm der Abbildung 16 sind die quantitativen Verhältnisse zwischen Schweinen und Kompartimenten zusammengefasst.

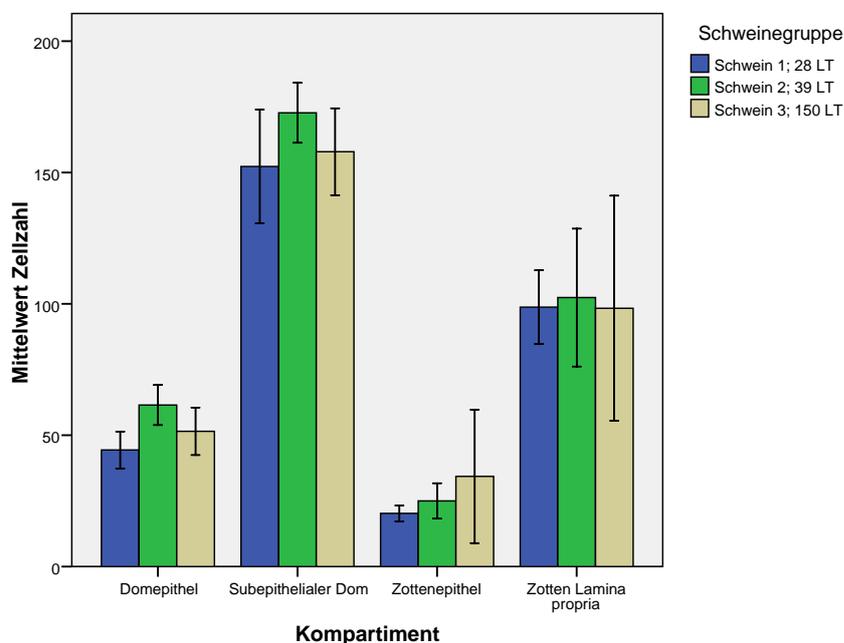


Abbildung 16: Mittelwertvergleich von CD45⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Der Mittelwertvergleich zwischen den Kompartimenten und Schweinen zeigt auf, dass es zwischen den Schweinen innerhalb der einzelnen Kompartimente keine nennenswerten Unterschiede im Anteil an CD45⁺ Zellen gibt.

Im Vergleich der Kompartimente miteinander sind allerdings deutliche Differenzen im Anteil an CD45⁺ Zellen zu erkennen. Dieser Umstand ist im folgenden Diagramm der Abbildung 17 zusammenfassend dargestellt.

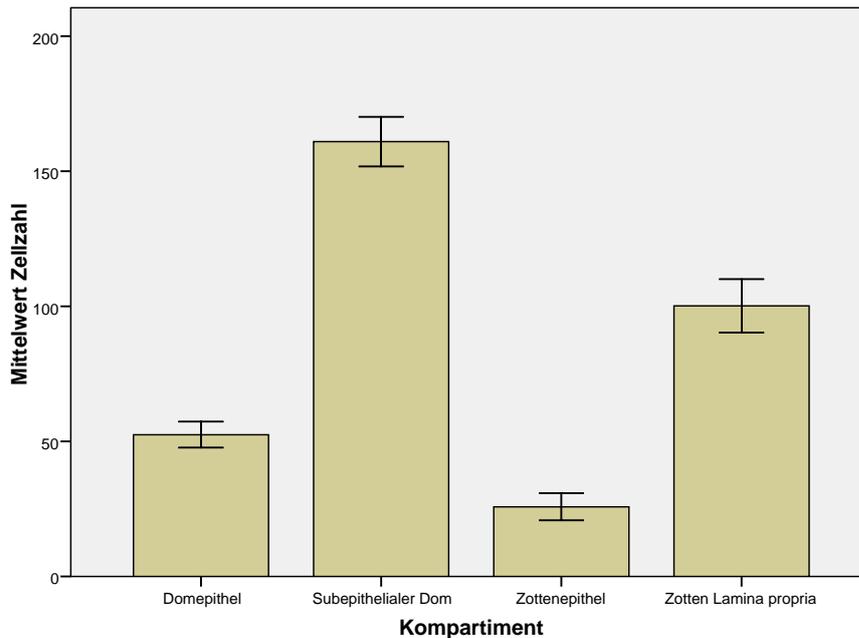


Abbildung 17: Mittelwertvergleich von CD45⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen Kompartimenten

Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Abbildung 17 zeigt deutliche Differenzen im Anteil an CD45⁺ Zellen zwischen den einzelnen Kompartimenten, die auf dem Niveau $p < 0,001$ signifikant sind. Bezieht man die Mittelwerte auf die durchschnittlichen Gesamtzellzahlen der einzelnen Kompartimente, ergibt sich folgendes Bild: In den Kompartimenten subepithelialer Dom (SED) und Zotten Lamina propria (LP) sind nahezu alle Zellen auch positiv für den Marker CD45 (93-99%). Im Domepithel (DE) befinden sich demzufolge etwa 37% CD45⁺ Zellen, von denen die meisten in engem Kontakt mit Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten der M-Zellen zu finden sind. Im Kompartiment Zottenepithel (ZE) sind nur 17% der Zellen CD45⁺. Eine besondere Assoziation zu den Zytokeratin 18⁺ Filamenten der Becherzellen kann hier nicht festgestellt werden.

3.2.3 Verteilung von CD2⁺ Zellen und Bezug zu M-Zellen

Die Immunfluoreszenzmarkierung und Darstellung von T-Zellen erfolgte durch das Oberflächenmolekül CD2 (Pescovitz et al. 1994a). In den folgenden Abbildungen ist die Verteilung der CD2⁺ Zellen anhand eines typischen Domareals (Abbildung 18) sowie anhand eines typischen Zottenareals (Abbildung 19) beispielhaft dargestellt.

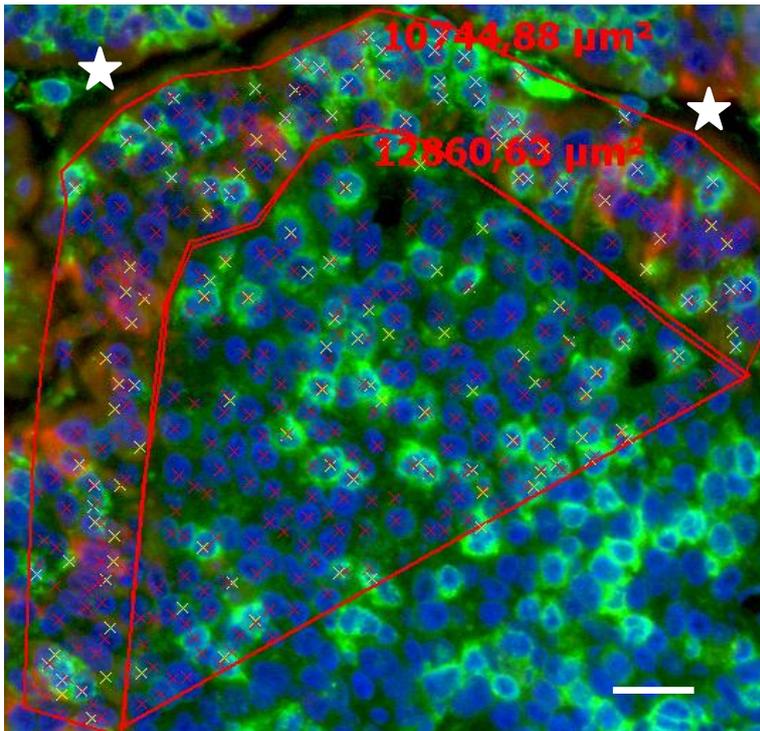


Abbildung 18: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales; CD2; Cy90; DAPI

CD2 = grün; Zytokeratin 18 = rot; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20μm; rote Linien und Zahlen = Kompartimentgrenzen mit errechnetem Flächeninhalt in μm²; farbige Kreuze = gezählte Zellen; Domareal mit angeschnittenen M-Zellen

In Abbildung 18 ist ein typisches Domareal dargestellt. Beispielhaft sind die zur Auswertung nötigen Markierungen in diesem Bild beibehalten worden. Die roten Linien kennzeichnen die gezogenen Kompartimentgrenzen, die roten Zahlen beziffern die dazugehörigen errechneten Flächeninhalte in μm². Die verschiedenfarbigen kleinen Kreuze markieren die Zählungen der unterschiedlichen Zellen innerhalb der Kompartimente. CD2⁺ Zellen sind in beiden Kompartimenten der Domareale vorhanden. Im DE sind reichlich CD2⁺ Zellen existent, die in enger Beziehung zu den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten liegen. Aber auch einzeln und in Gruppen intraepithelial, basal und apikal im DE gelegene CD2⁺ Zellen kommen vor. Subepithelial im Dom (SED) finden sich deutlich weniger CD2⁺ Zellen im Vergleich zu den CD45⁺ Zellen.

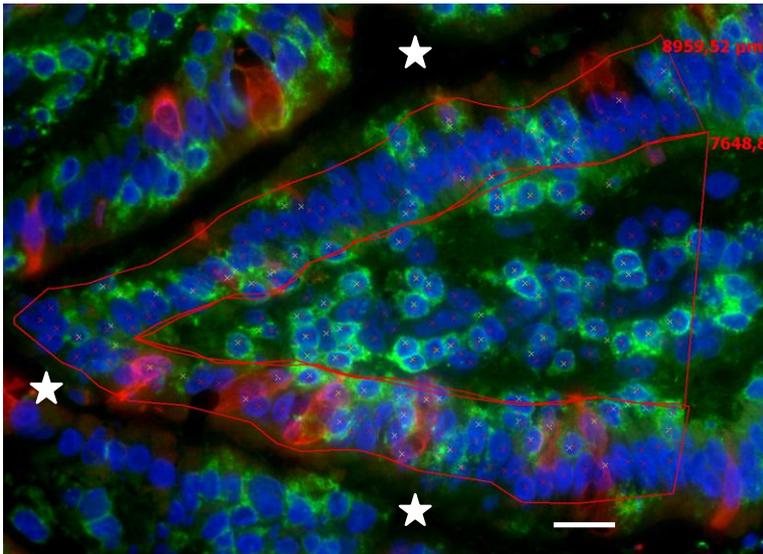


Abbildung 19: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Zottenareales mit Auswerte-Annotationen; CD2; Cy90; DAPI

CD2 = grün; Zytokeratin 18 = rot; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; rote Linien und Zahlen = Kompartimentgrenzen mit errechnetem Flächeninhalt in µm²; farbige Kreuze = gezählte Zellen; Zottenareal mit angeschnittenen Becherzellen

In Abbildung 19 ist ein typisches Zottenareal dargestellt. Auch hier sind beispielhaft die zur Auswertung nötigen Markierungen beibehalten worden. Die roten Linien markieren die gezogenen Kompartimentgrenzen, die roten Zahlen beziffern die dazugehörigen errechneten Flächeninhalte in µm². Die verschiedenfarbigen kleinen Kreuze kennzeichnen die Zählungen der unterschiedlich markierten Zellen innerhalb der Kompartimente. CD2⁺ Zellen sind in beiden Kompartimenten des Zottenareales vorhanden. Im Zottenepithel lässt sich, wie bei CD45, kein besonderer Bezug von CD2⁺ Zellen an Cy90⁺ intermediäre Filamente von markierten Becherzellen feststellen. Wie im SED kommen auch in der LP der Zotten augenscheinlich weniger CD2⁺ Zellen im Vergleich zu den CD45⁺ Zellen dieses Kompartimentes vor. In folgendem Diagramm der Abbildung 20 sind die Quantitäten der CD2⁺ Zellen in den Schweinen und untersuchten Kompartimenten zusammengefasst.

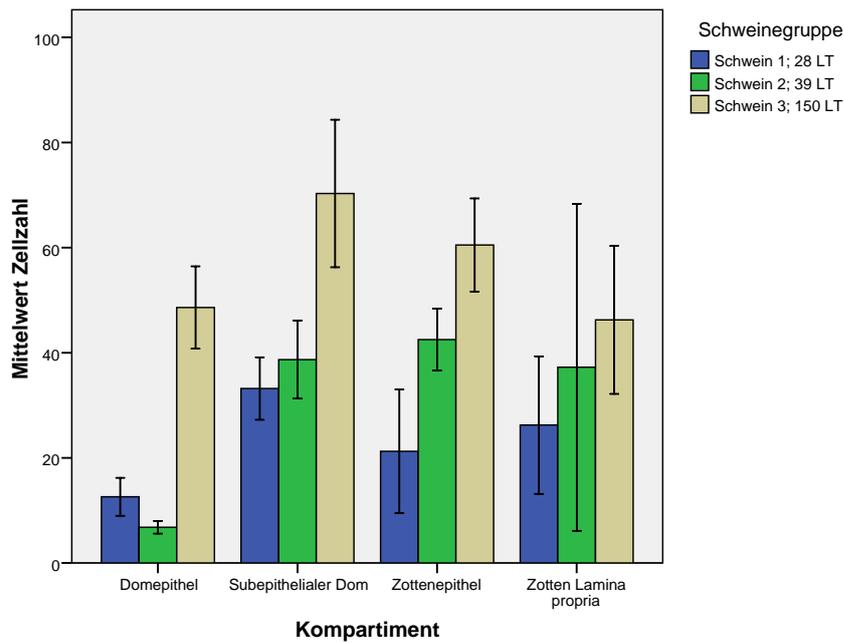


Abbildung 20: Mittelwertvergleich von CD2⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Wie Abbildung 20 zeigt, sind die meisten CD2⁺ Zellen in allen Kompartimenten beim ältesten Schwein 3 vorhanden. Am deutlichsten tritt diese Steigerung im Domepithel auf. Hier besitzt auch das jüngste Schwein 1 (28 LT) mehr CD2⁺ Zellen als das mit 39 LT etwas ältere Schwein 2. In den anderen drei Kompartimenten (SED, ZE, LP) steigt der Anteil an CD2⁺ Zellen mit dem Alter an. In nachfolgender Tabelle 4 sind die prozentualen Anteile an CD2⁺ Zellen im Bezug zu den Gesamtzellzahlen der Kompartimente in der Übersicht dargestellt.

Kompartiment	Schwein 1 28 LT	Schwein 2 39 LT	Schwein 3 150 LT
DE	9%	5%	35%
SED	21%	25%	45%
ZE	14%	28%	40%
LP	26%	37%	48%

Tabelle 4: Übersicht CD2⁺ Zellen-Anteile in den Kompartimenten

DE: Domepithel; SED: subepithelialer Dom; ZE: Zottenepithel; LP: Zotten Lamina propria; LT: Lebensstage

Die massivsten Änderungen des Anteils an CD2⁺ Zellen erfährt das Domepithel. Während der Anteil beim jüngsten und nicht abgesetzten Schwein 1 bei 9% liegt, fällt der Anteil beim 39 Tage alten Schwein 2, das nach dem Absetzen am 28. Tag noch 10 Tage konventionelles Ferkelfutter erhalten hat, auf 5% CD2⁺ Zellen ab. Das mit 150 Tagen älteste Schwein erreicht

allerdings einen Anteil von 35% CD2⁺ Zellen im Domepithel, was eine Steigerung um mehr als das Dreifache bedeutet.

Im SED steigt der Prozentsatz an CD2⁺ Zellen mit dem Alter. Die Differenz zu Schwein 3 ist in diesem Kompartiment mit einer Steigerung auf annähernd doppelt so hohe Werte am deutlichsten. Der Anteil an CD2⁺ Zellen erreicht hier 45%. Damit befinden sich im SED etwa 10% mehr CD2⁺ Zellen als im darüberliegenden Domepithel.

Während im Domareal die Unterschiede zwischen den jüngeren Schweinen 1 und 2 eher gering ausfallen, findet im ZE eine Verdoppelung des CD2⁺ Zell-Anteiles von 14% auf 28% statt. Zum Schwein 3 gibt es auch hier wieder eine Erhöhung des Anteiles an CD2⁺ Zellen auf 40%.

Relativ gleichmäßig, um jeweils 11 Prozentpunkte, stellt sich die Zunahme der CD2⁺ Zellen in der Lamina propria der Zotten (LP) von Schwein 1 bis 3 dar.

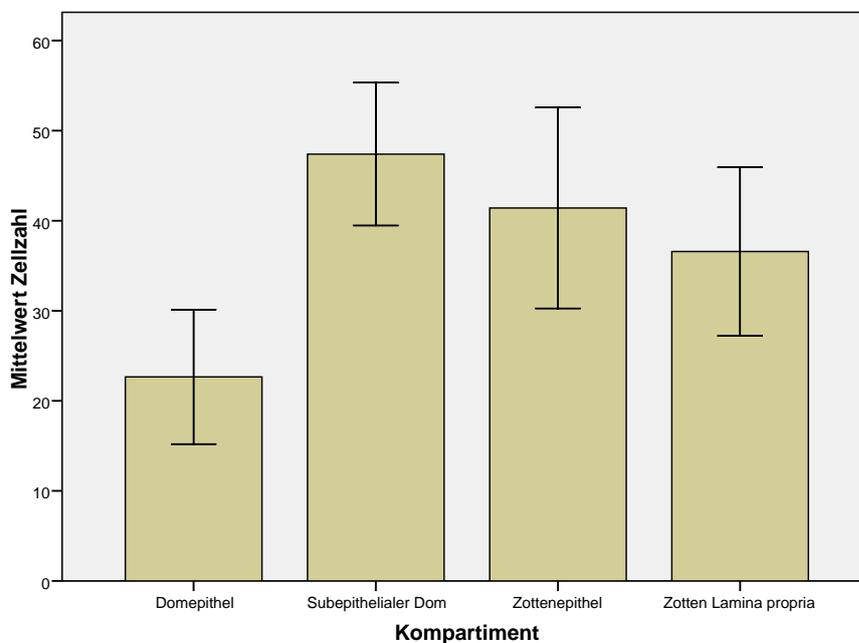


Abbildung 21: Mittelwertvergleich von CD2⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen den Kompartimenten
Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Abbildung 21 zeigt die Zusammenfassung der Werte aller Schweine und stellt die Anteile an CD2⁺ Zellen als Durchschnittswerte in den einzelnen Kompartimenten dar. Hier spiegelt sich im großen Konfidenzintervall die Heterogenität zwischen den Schweinen wider. Die deutlich geringeren Werte im DE sind letztendlich durch die geringeren Anteile an CD2⁺ Zellen bei den beiden jüngeren Schweinen innerhalb dieses Kompartimentes begründet.

3.2.4 Verteilung von CD4⁺ Zellen und Bezug zu M-Zellen

Neben stark CD4⁺ interferonproduzierenden dendritischen Zellen im peripheren Blut (Summerfield et al. 2003) wird CD4 hauptsächlich auf extrathymischen T-Helferzellen (Pescovitz et al. 1998b) exprimiert. Diese im Fokus der Arbeit stehenden CD4⁺ T-Helferzellen beinhalten die einfach CD4⁺ Zellen und CD4⁺/CD8⁺ doppelt positive Zellen (Charemtantanakul und Roth 2006; Saalmüller et al. 1989; Zuckermann und Gaskins 1996).

In folgender Abbildung 22 findet man ein typisches Domareal mit einer Dreifach-Fluoreszenzfärbung, welche die Verteilung der CD4⁺ Zellen zeigt, dargestellt. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Abbildungen sind hier die Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamente der M-Zellen grün dargestellt. Augenscheinlich gut zu erkennen ist die Konzentration der rot präsentierten CD4⁺ Zellen auf das Kompartiment SED. Im Epithel des Domes sind CD4⁺ Zellen nur sehr vereinzelt vorhanden und ein besonderer Bezug zu den M-Zellen lässt sich nicht erkennen.

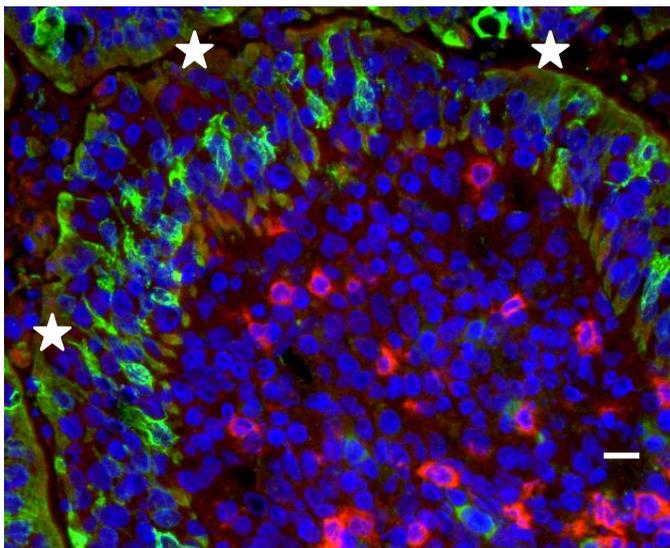


Abbildung 22: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales; CD4; Cy90; DAPI

CD4 = rot; Zytokeratin 18 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; Domareal mit angeschnittenen M-Zellen (grün)

Abbildung 23 zeigt ein Zottenareal mit entsprechender Dreifach-Fluoreszenzfärbung. Wie im Domareal sind auch hier die CD4⁺ Zellen hauptsächlich tief in der Lamina propria zu finden. Nur ausgesprochen selten sind CD4⁺ Zellen intraepithelial dargestellt.

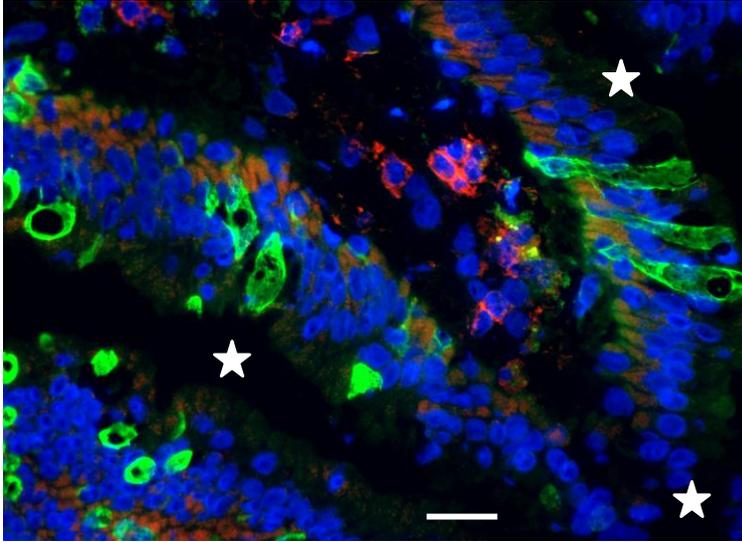


Abbildung 23: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Zottenareales; CD4; Cy90; DAPI

CD4 = rot; Zytokeratin 18 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; Zottenareal angeschnittenen Becherzellen (grün)

Das Diagramm in Abbildung 24 zeigt die Quantitäten der CD4⁺ Zellen in den Schweinen und untersuchten Kompartimenten.

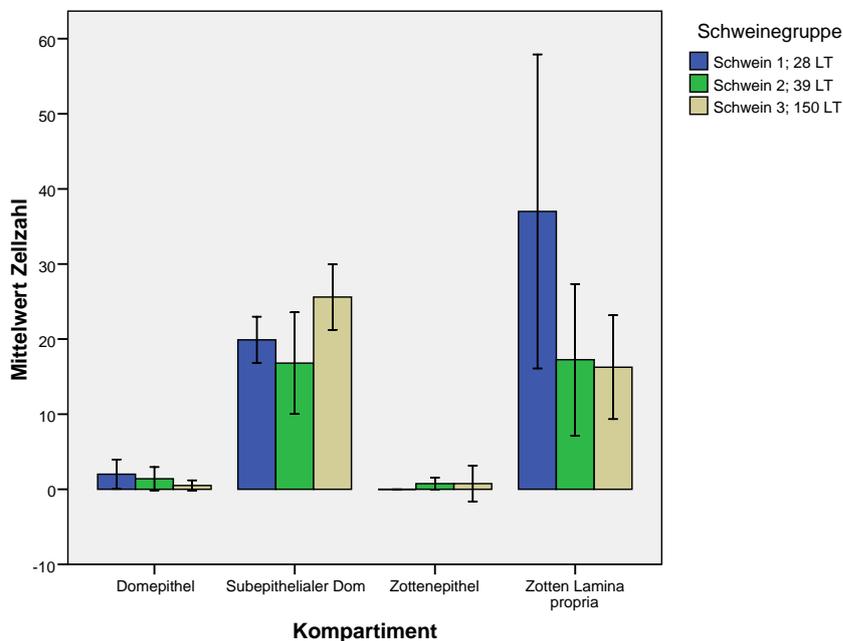


Abbildung 24: Mittelwertvergleich von CD4⁺ Zellen/10.000 µm² zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Neben den nur vereinzelt vorkommenden CD4⁺ Zellen im Dom- und Zottenepithel sind im SED mittlere Zellzahlen von 17 bis 26 CD4⁺ Zellen/10.000 µm² zu finden.

Im der Zotten-LP fallen die Konfidenzintervalle größer aus, da hier die Stichprobenanzahl geringer ist. Nichtsdestotrotz lässt sich zwischen den Schweinen ein Trend zum geringeren Konfidenzintervall mit steigendem Schweinealter (Schwein 1 > Schwein 2 > Schwein 3) feststellen. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Schweinen erreichen dabei kein Signifikanzniveau.

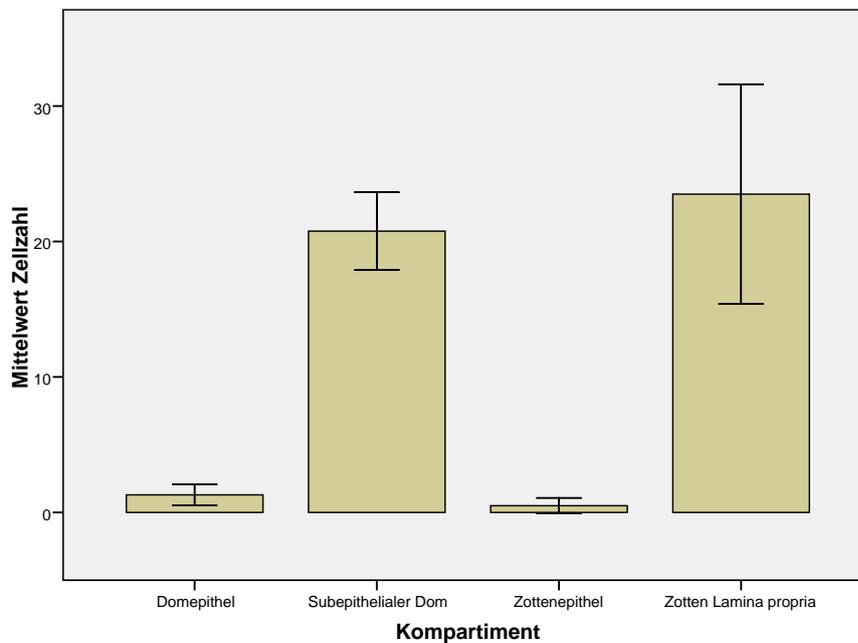


Abbildung 25: Mittelwertvergleich von CD4⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen den Kompartimenten
Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

In Abbildung 25 zeigt der Mittelwertvergleich mit allen Stichproben der drei Schweine zwischen den Kompartimenten ähnliche Zahlen für SED und Zotten-LP. Auf die Gesamtzellzahlen der Kompartimente bezogen bedeutet dies einen Anteil von 13% CD4⁺ Zellen im SED und mit 24% fast doppelt so viele CD4⁺ Zellen in der Zotten-LP. Ob das höhere Konfidenzintervall in der Zotten-LP auf eine generell höhere Streuung oder auf die geringere Stichprobenanzahl zurückzuführen ist, lässt sich nur durch Untersuchungen an unterschiedlichen, aber intern homogenen Schweinegruppen ermitteln (siehe auch 3.3).

3.2.5 Verteilung von CD8⁺ Zellen und Bezug zu M-Zellen

CD8 kann entweder als Homo- oder Heterodimer auf den Zellen exprimiert werden (Jonjic und Koszinowski 1984; Pescovitz et al. 1984). Der in dieser Arbeit benutzte monoklonale Antikörper stellt Thymozyten, periphere T-Zellen sowie natürliche Killerzellen dar. In folgender Abbildung 26 ist ein Domareal und in Abbildung 27 ein Zottenareal mit einer Dreifach-

Fluoreszenzfärbung, welche die Verteilung von CD8⁺ Zellen zeigt, dargestellt. Auch hier sind die Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamente der M- und Becherzellen grün und die CD8⁺ Zellen rot präsentiert.

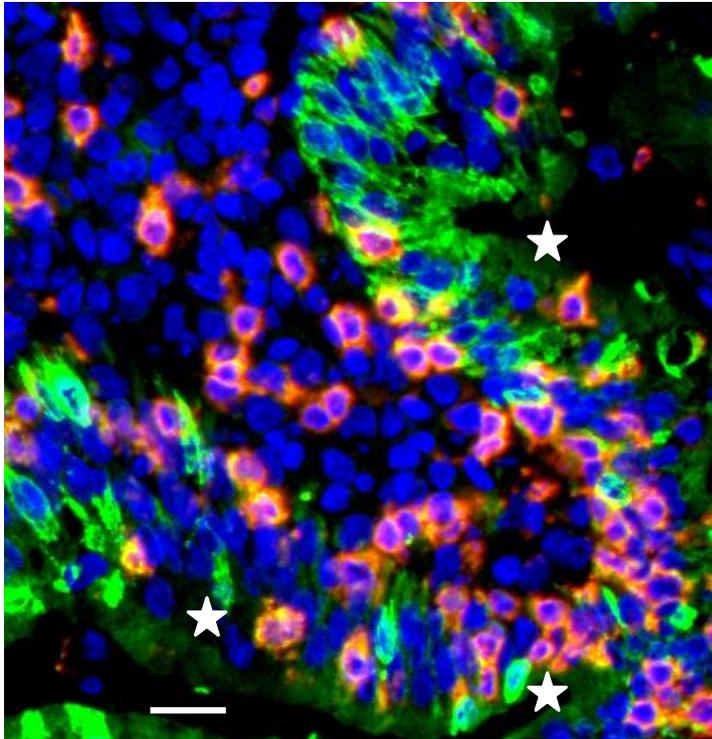


Abbildung 26: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales; CD8; Cy90; DAPI

CD8 = rot; Zytokeratin 18 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; Domareal mit angeschnittenen M-Zellen (grün)

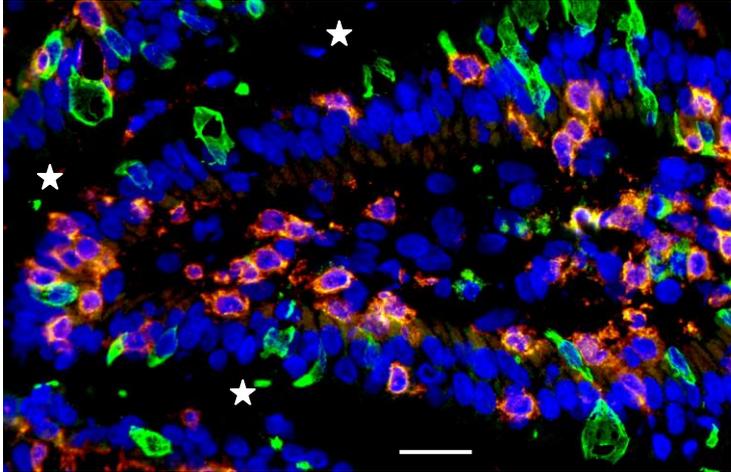


Abbildung 27: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Zottenareales; CD8; Cy90; DAPI

CD8 = rot; Zytokeratin 18 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; Zottenareal mit angeschnittenen Becherzellen (grün)

Im Gegensatz zu den CD4⁺ Zellen verteilen sich die rot dargestellten CD8⁺ Zellen innerhalb aller vier Kompartimente in unterschiedlichen Anteilen. Innerhalb des Domepitheles befinden sich viele der CD8⁺ Zellen in enger Nachbarschaft zu den grün dargestellten Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten der M-Zellen, aber auch einzeln und in Gruppen intraepithelial basal (subnuklear) und apikal (supranuklear) im DE gelegene CD8⁺ Zellen kommen vor.

Im Zottenareal liegen die CD8⁺ Zellen ebenso intraepithelial und basal im Epithel und zeigen keinen besonderen Bezug zu den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten der Becherzellen. Relativ gleichmäßig, in Gruppen oder einzeln liegend sind die CD8⁺ Zellen innerhalb der Kompartimente SED und Zotten-LP zufällig verteilt. Folgendes Diagramm in Abbildung 28 zeigt die quantitativen Verhältnisse zwischen den Schweinen und Kompartimenten auf.

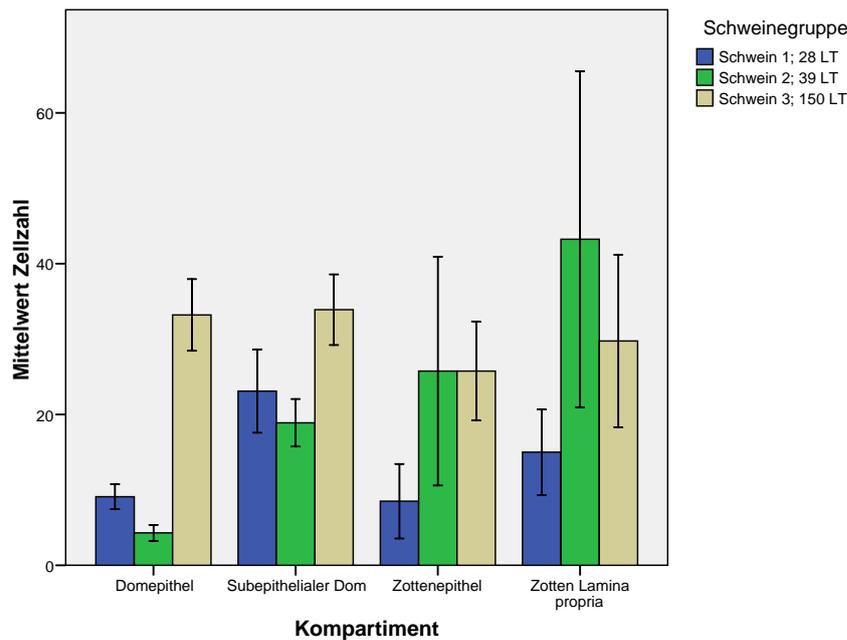


Abbildung 28: Mittelwertvergleich von CD8⁺ Zellen/10.000 µm² zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Die größten Unterschiede zwischen den untersuchten Schweinen sind innerhalb des Domepithels zu finden. Hier fällt der Anteil an CD8⁺ Zellen zwischen Schwein 1 und 2 mit dem Absetzen von 9 auf 4 Zellen/10.000 µm² ab. Der Anteil an CD8⁺ Zellen beim ältesten Schwein 3 steigt dagegen auf einen mittleren Wert von 33 Zellen/10.000 µm² an.

Im SED liegen die absoluten Werte höher und nur Schwein 3 unterscheidet sich deutlich von Schwein 2 und Schwein 1. Der Anteil an CD8⁺ Zellen beim abgesetzten Schwein 2 zeigt dieselbe Tendenz wie im Domepithel und scheint geringer zu sein.

Im Zottenepithel wie in der Zotten-LP liegen die Werte von Schwein 2 und 3 etwa doppelt bis dreifach über den Werten von Schwein 1. Im Zottenareal ist das Konfidenzintervall, im Vergleich zwischen den Schweinen, beim 39 Tage alten und abgesetzten Schwein am größten, was für eine hohe Schwankung zwischen den Stichprobenwerten spricht. Dies ist im Domepithel gerade umgekehrt.

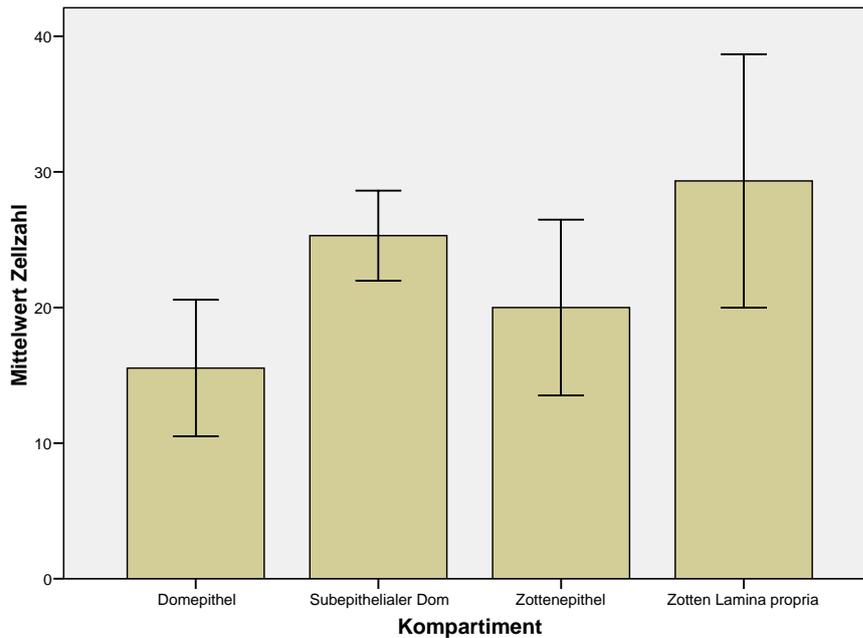


Abbildung 29: Mittelwertvergleich von CD8⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen den Kompartimenten
Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Abbildung 29 zeigt den Mittelwertvergleich zwischen den Kompartimenten mit den Stichproben aller drei Schweine. Da sich die Schweine, wie vorher dargestellt, stellenweise stark unterscheiden, sind auch hier größere intern homogene Gruppen für weitere Untersuchungen nötig (siehe Teil 2 unter 3.3). Diese Mittelwerte zugrundegelegt, ergeben sich im Bezug zur gemittelten Gesamtzellzahl der einzelnen Kompartimente folgende Anteile an CD8⁺ Zellen: Im DE befinden sich etwa 12% CD8⁺ Zellen und im ZE liegt der Anteil an CD8⁺ Zellen mit 13% auf etwa dem gleichen Niveau. In der Zotten-LP ist der Anteil an CD8⁺ Zellen mit 29% fast doppelt so hoch wie im SED mit 16%.

3.2.6 Verteilung von MHCII⁺ Zellen und Bezug zu M-Zellen

MHC II wird auf den antigenpräsentierenden Zellen, zu denen die Makrophagen, die B-Lymphozyten und dendritische Zellen gehören, exprimiert (Basta et al. 1999; Carrasco et al. 2001; Van der et al. 2005).

In Abbildung 30 ist ein typisches Domareal im Überblick dargestellt. Angrenzend sind auch Abschnitte von Zottenarealen zu erkennen.

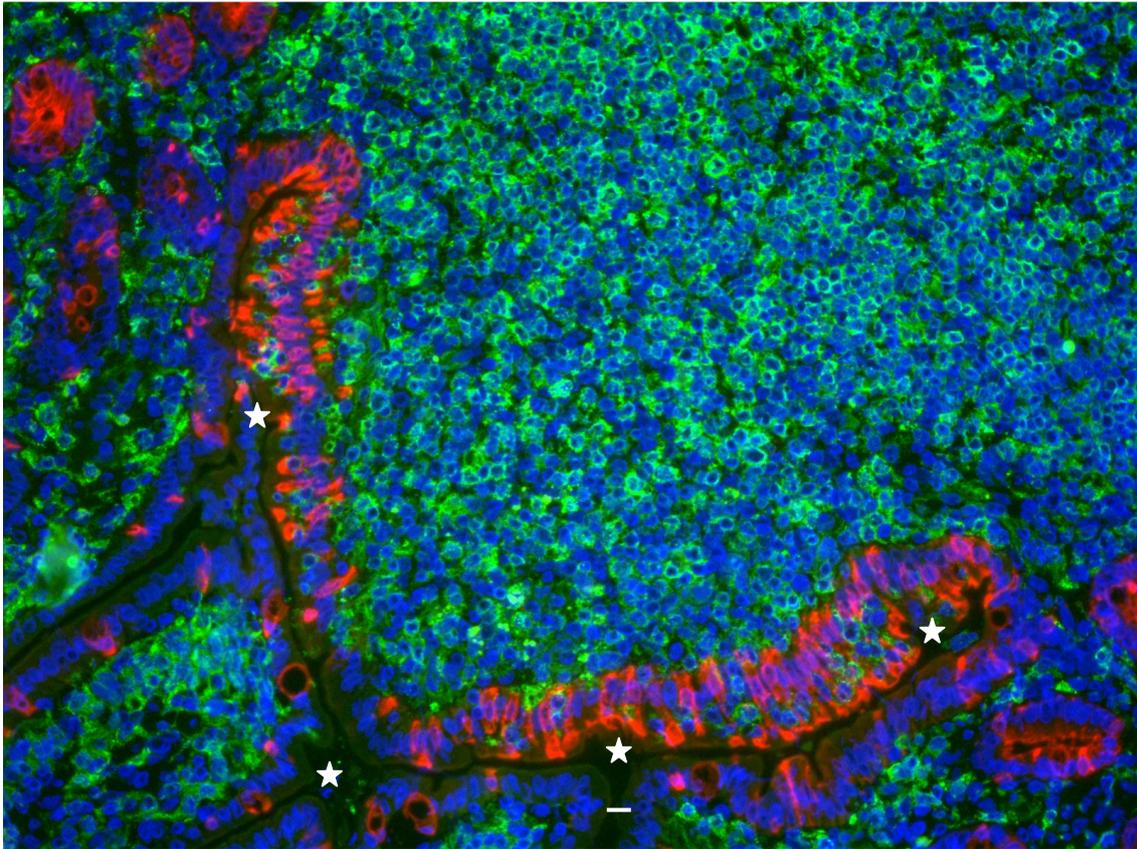


Abbildung 30: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales mit angrenzenden Zotten; MHCII; Cy90; DAPI

Zytokeratin 18 = rot; MHCII = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; zentral gelegenes Domareal mit M-Zellen sowie angrenzenden Zottenarealen mit angeschnittenen Becherzellen

In dieser Dreifach-Fluoreszenzfärbung sind die MHC II DR⁺ Zellen grün dargestellt. Zytokeratin 18⁺ intermediäre Filamente der M- und Becherzellen sind rot dargestellt. Im Domepithel treten MHC II DR⁺ Zellen häufig in Bezug zu den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten der M-Zellen auf, in Zytokeratin 18-freien Bereichen des Domepithels kommen MHC II DR⁺ Zellen augenscheinlich seltener vor. Außerdem scheinen die MHC II DR⁺ Zellen subepithelial unter Bereichen mit hoher M-Zelldichte besonders zu akkumulieren (Bimczok et al. 2006). Im Gegensatz zum Domepithel kommen MHC II DR⁺ Zellen im Zottenepithel, bis auf wenige vereinzelte Zellen, nicht vor.

Folgendes Diagramm in Abbildung 31 zeigt die quantitative Verteilung der MHC II DR⁺ Zellen in den Kompartimenten und zwischen den Schweinen.

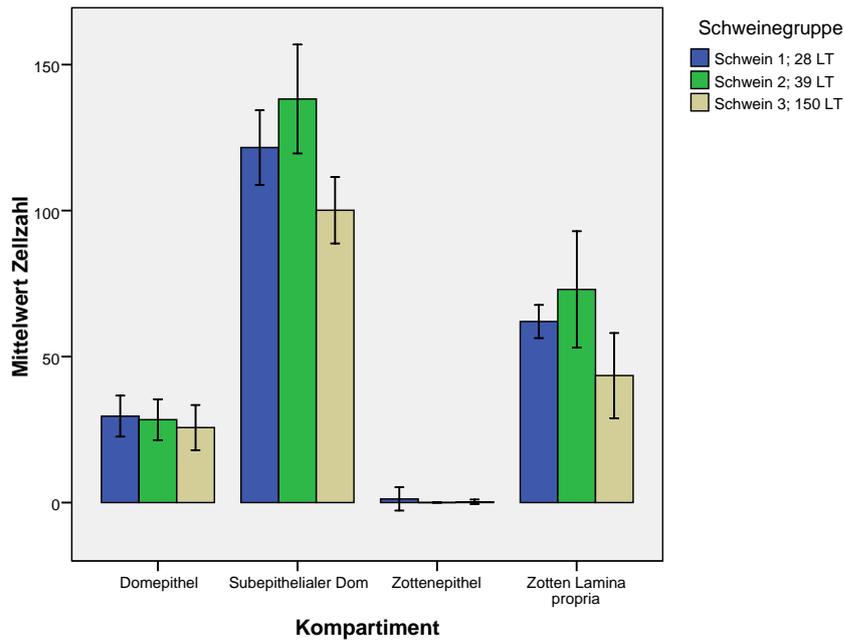


Abbildung 31: Mittelwertvergleich von MHCII⁺ Zellen/10.000 µm² zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Der Mittelwertvergleich zeigt im Domepithel bei allen drei Schweinen ähnliche Werte von 26 bis 30 MHC II DR⁺ Zellen/10.000 µm² mit stark überlappenden Konfidenzintervallen an. Aussagekräftige Unterschiede zwischen den Schweinen gibt es hier nicht. Im Zottenepithel sind keine nennenswerten Anteile von MHC II DR⁺ Zellen detektierbar.

Im SED ebenso wie in der Zotten-LP gibt es augenscheinlich denselben Trend einer geringen Erhöhung des Anteiles an MHC II DR⁺ Zellen beim abgesetzten und 10 Tage älteren Schwein 2 (138 bzw. 62 MHC II DR⁺ Zellen/10.000 µm²) gegenüber dem jüngsten Schwein 1 (122 bzw. 73 MHC II DR⁺ Zellen/10.000 µm²). In beiden Kompartimenten fällt dann der Anteil an MHC II DR⁺ Zellen beim ältesten Schwein 3 (100 bzw. 44 MHC II DR⁺ Zellen/10.000 µm²) deutlich gegenüber Schwein 1 und 2 ab.

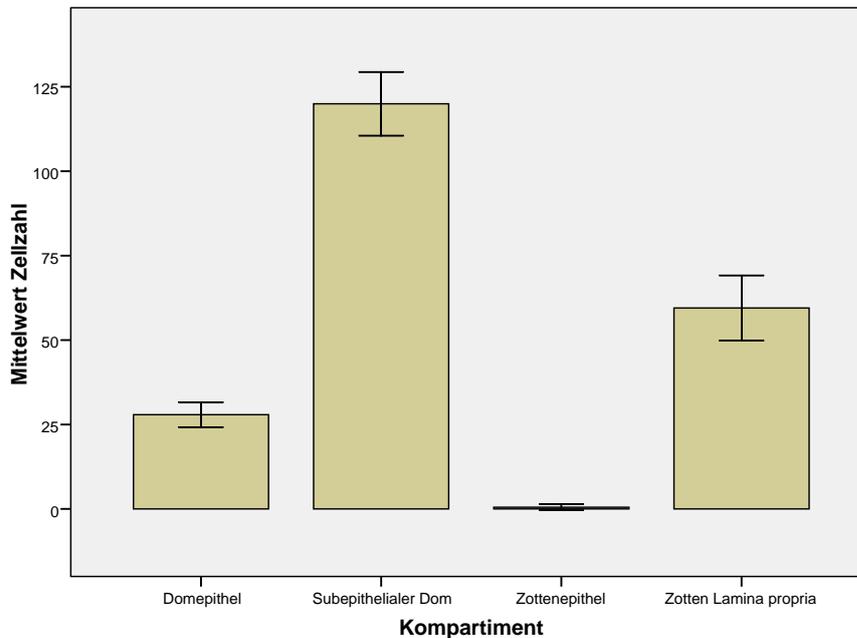


Abbildung 32: Mittelwertvergleich von MHCII⁺ Zellen/10.000 µm² zwischen den Kompartimenten

Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

In Abbildung 32 sind die Stichprobenwerte aller drei Schweine pro Kompartiment per Mittelwertvergleich zusammenfassend dargestellt. Die Anteile an MHCII⁺ Zellen unterscheiden sich zwischen den Kompartimenten deutlich voneinander ($p < 0,01$). Aus den Mittelwerten im Vergleich zu den gemittelten Gesamtzellzahlen der jeweiligen Kompartimente ergibt sich folgendes Bild: Neben dem Zottenepithel ohne MHCII⁺ Zellanteile besitzt das Domepithel etwa 20% MHCII⁺ Zellen, der SED 77% und die Zotten-LP 60% MHCII⁺ Zellen.

3.2.7 Verteilung von Ig⁺ Zellen und Bezug zu M-Zellen

Durch den Einsatz des anti-Ig-Antikörpers lassen sich die immunglobulintragenden B-Zellen des Schweines darstellen. Dabei bindet der Antikörper an ein Epitop der leichten λ -Kette (Denham et al. 1998; Sinkora et al. 2001). Ig⁺-Zellen und -Strukturen sind grün und Zytokeratin 18⁺ intermediäre Filamente der M- und Becherzellen rot abgebildet.

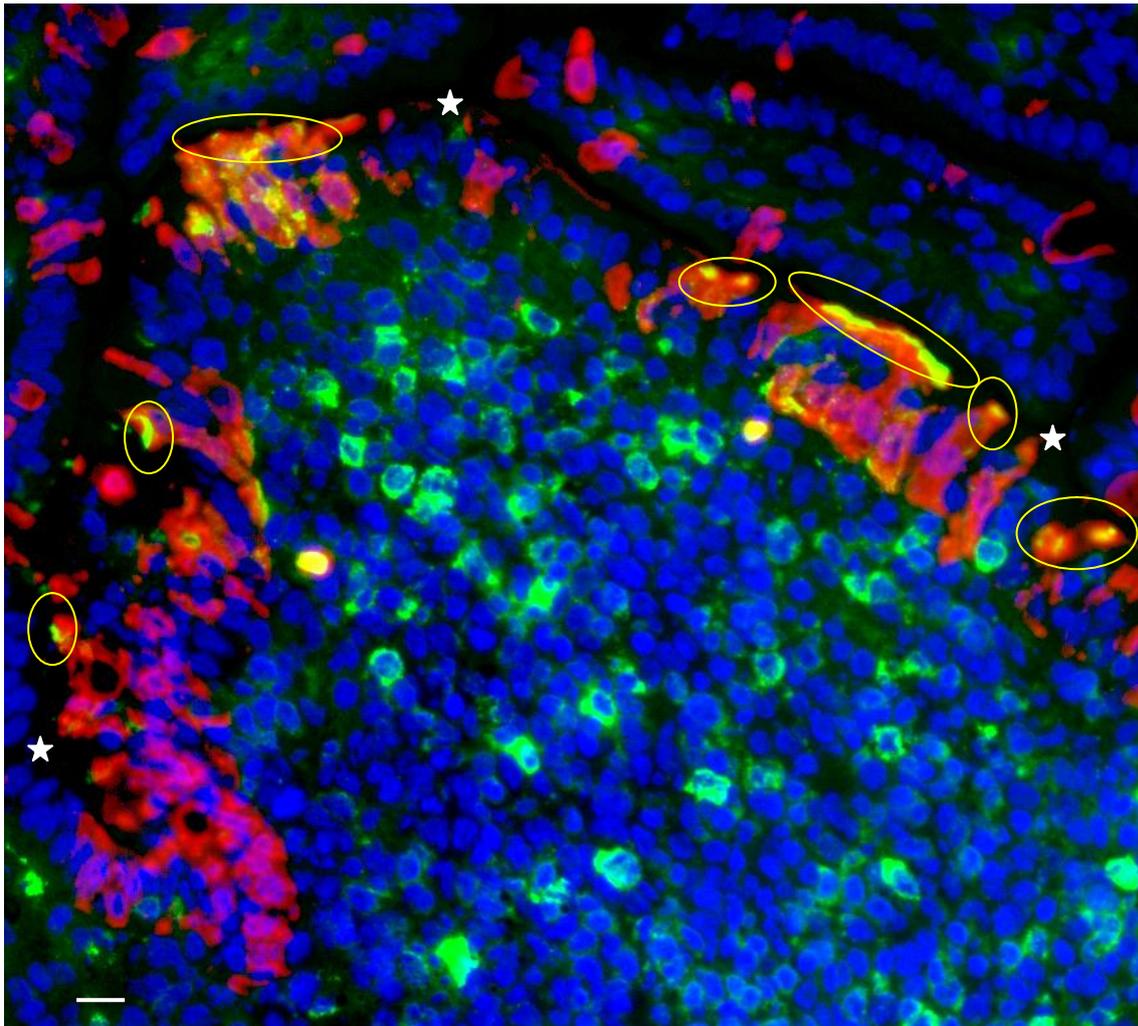


Abbildung 33: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales mit benachbarten Zotten; Ig; Cy90; DAPI

Zytokeratin 18 = rot; Ig = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; zentral gelegenes Domareal mit darüber angeschnittenem Zottenarealen; gelb umrandet sind apikal an die M-Zellen angelagerte Ig⁺ Konglomerate (Vorkommen nur bei nicht abgesetztem Schwein 1!)

Wie in Abbildung 33 beispielhaft dargestellt ist, finden sich die meisten Ig⁺ Zellen im SED. Vereinzelt sind auch Ig⁺ Zellen innerhalb des Domepitheles zu erkennen. Besonders auffällig zeigen sich die gelb eingekreisten Ig⁺-Strukturen, die direkt von luminal an Zytokeratin 18⁺ intermediäre Filamente der M-Zellen assoziiert sind. Diese Ig⁺-Konglomerate sind nur beim nicht abgesetzten Schwein 1 zu detektieren. Die in dieser Abbildung dargestellte, oben rechts liegende angeschnittene Zotte beinhaltet keine Ig⁺ Zellen. Dies spiegelt sich ebenso im Gesamtbild und der quantitativen Darstellung der Verhältnisse zwischen den Kompartimenten und Schweinen im folgenden Diagramm der Abbildung 34 wider.

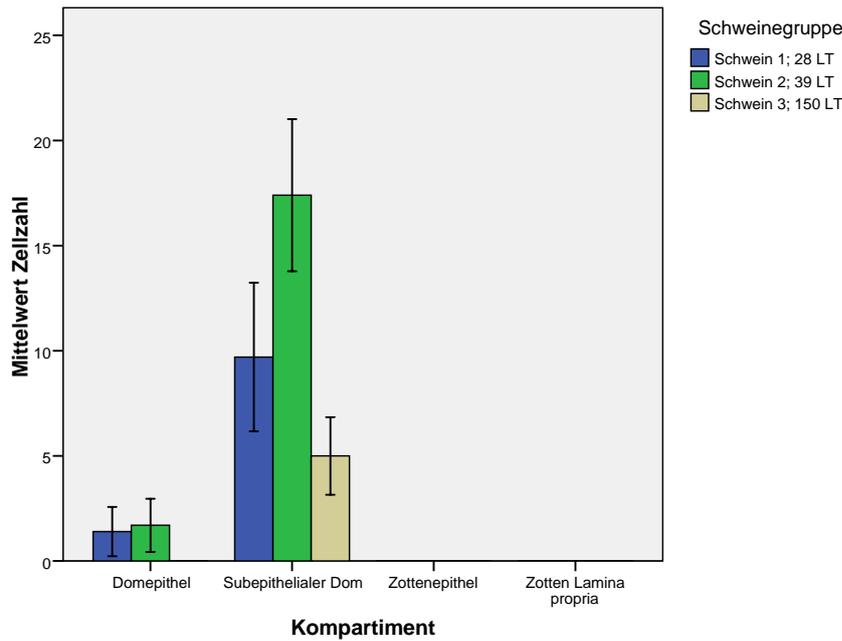


Abbildung 34: Mittelwertvergleich von Ig^+ Zellen/10.000 μm^2 zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Im Zottenareal konnten bei allen drei Schweinen in beiden Kompartimenten keine Ig^+ Zellen detektiert werden.

Während im Domepithel bei den jüngeren Schweinen 1 (28 LT) und 2 (39 LT) noch wenige Ig^+ Zellen detektiert werden, sind beim 150 Tage alten Schwein 3 keine Ig^+ Zellen in diesem Kompartiment zu finden.

Im SED lassen sich allerdings markante Unterschiede zwischen den Schweinen feststellen. Die durchschnittliche Anzahl von 10 Ig^+ Zellen/10.000 μm^2 beim Schwein 1 ist deutlich geringer als der Anteil bei Schwein 2, bei dem 17 Ig^+ Zellen/10.000 μm^2 beobachtet werden konnten. Der Anteil von nur 5 Ig^+ Zellen/10.000 μm^2 bei Schwein 3 ist wiederum deutlich geringer als bei Schwein 2 und Schwein 1.

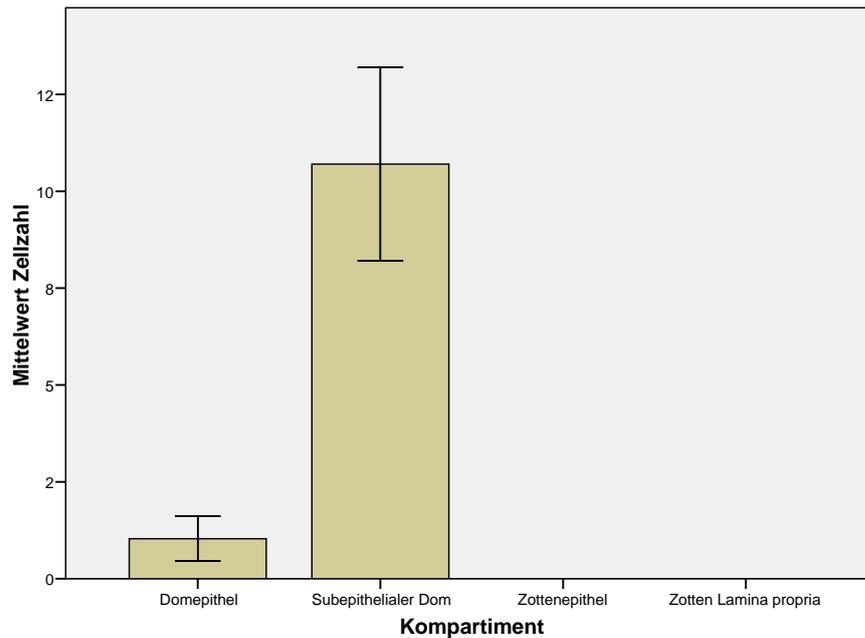


Abbildung 35: Mittelwertvergleich von Ig⁺ Zellen/10.000 μm² zwischen den Kompartimenten

Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Wenn man auch hier, wie in Abbildung 35 dargestellt, nur die Kompartimente miteinander vergleicht, indem die Stichproben aller drei Schweine zusammengefasst werden, ergeben sich in Bezug zur gemittelten Gesamtzellzahl der Kompartimente des Domareales weniger als 1% Ig⁺ Zellen im Domepithel und 7% Ig⁺ Zellen im SED. Das große 95% ige Konfidenzintervall im SED spricht dafür, weitere Untersuchungen mit größeren intern homogen Schweinegruppen durchzuführen, um letztendlich aussagekräftigere Werte zu erhalten.

3.2.8 Verteilung von SWC3⁺ Zellen und Bezug zu M-Zellen

Der anti-SWC3-Antikörper stellt Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten dar (Alvarez et al. 2000; Lunney et al. 1994; Piriou-Guzylack und Salmon 2008). In den folgenden Abbildungen 36 (Domareal) und 37 (Zottenareal) ist deutlich zu erkennen, dass die hier grün dargestellten SWC3⁺ Zellen vorwiegend im SED und in der Zotten-LP zu finden sind. Augenscheinlich ist auch kein bemerkenswerter Bezug der SWC3⁺ Zellen an rot dargestellte Zytokeratin 18⁺ intermediäre Filamente der M- und Becherzellen innerhalb der Dom- und Zottenepithelkompartimente bzw. subepithelial zu erkennen.

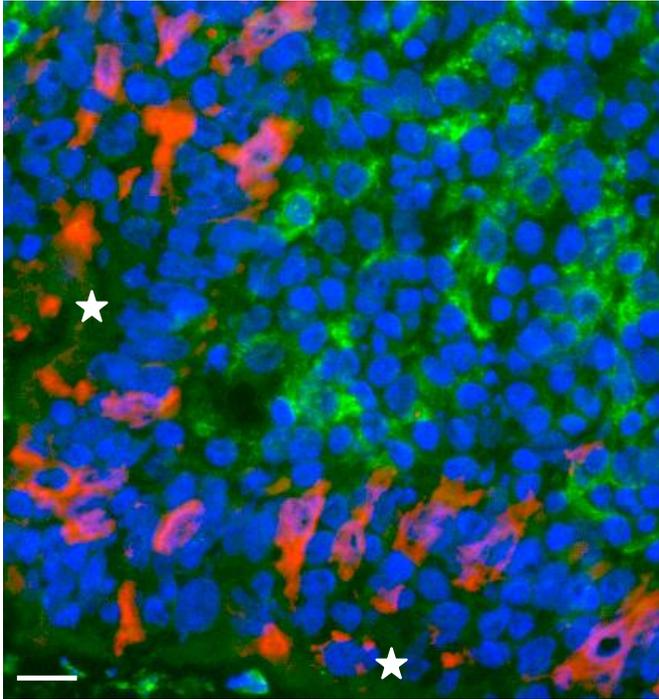


Abbildung 36: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales; SWC3; Cy90; DAPI

Zytokeratin 18 = rot; SWC3 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; Domareal mit angeschnittenen M-Zellen

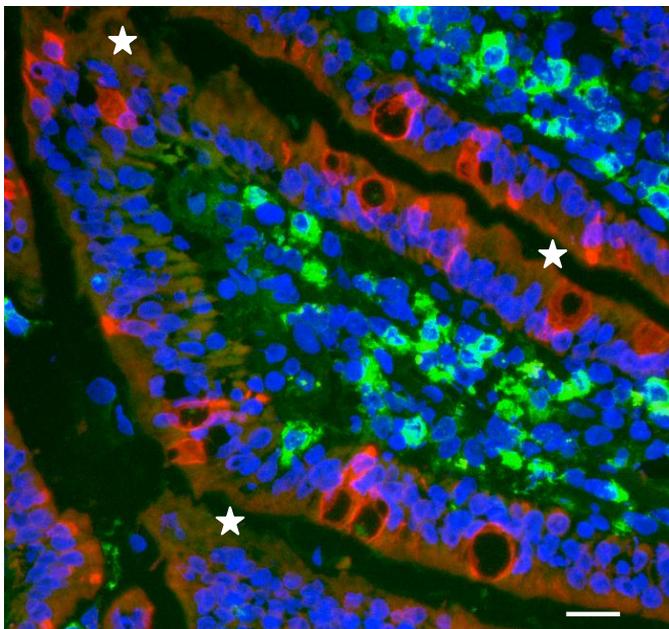


Abbildung 37: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Zottenareales; SWC3; Cy90; DAPI

Zytokeratin 18 = rot; SWC3 = grün; Zellkerne = blau; weiße Sterne = Darmlumen; Länge der weißen Linie = 20µm; Zottenareal mit angeschnittenen Becherzellen

Im Diagramm der Abbildung 38 stellen sich die quantitativen Verhältnisse zwischen den Kompartimenten und Schweinen wie folgt dar:

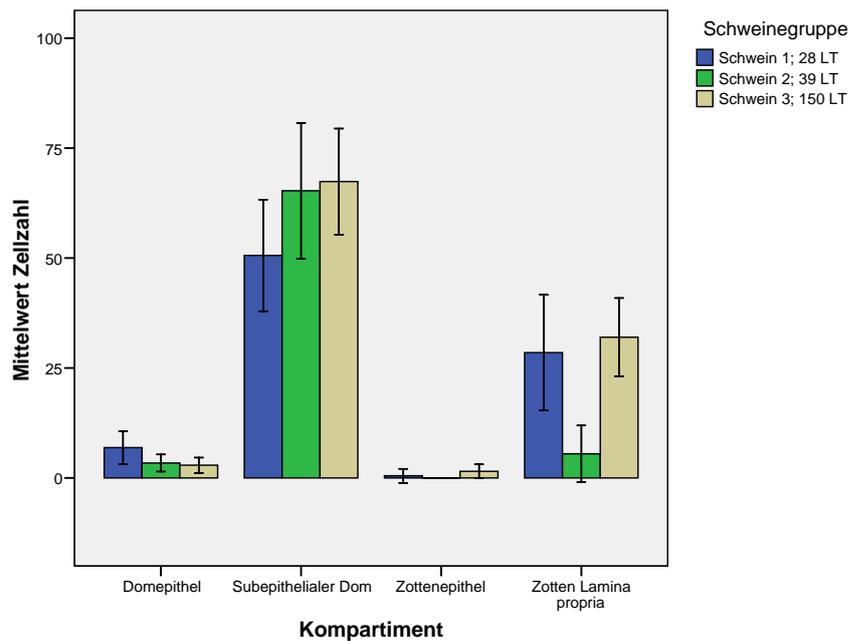


Abbildung 38: Mittelwertvergleich von SWC3⁺ Zellen/10.000 µm² zwischen den Kompartimenten und Schweinen

Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Bei Schwein 1 befinden sich 7 SWC3⁺ Zellen/10.000 µm² im Domepithel, bei Schwein 2 und 3 mit jeweils 3 SWC3⁺ Zellen/10.000 µm² weniger als die Hälfte. Diese Unterschiede erreichen dabei kein Signifikanzniveau und markieren daher maximal einen entsprechenden Trend.

Im SED scheinen die Verhältnisse umgekehrt, hier befinden sich bei Schwein 1 etwa 51 SWC3⁺ Zellen/10.000 µm² im Kompartiment, während bei Schwein 2 und 3 die Werte auf 65 bzw. 67 SWC3⁺ Zellen/10.000 µm² steigen.

Im Zottenareal können nur sehr vereinzelt im Epithel liegende Zellen beobachtet werden. In der Zotten-LP fällt allerdings der markante Abfall an SWC3⁺ Zellen/10.000 µm² beim abgesetzten Schwein 2 auf.

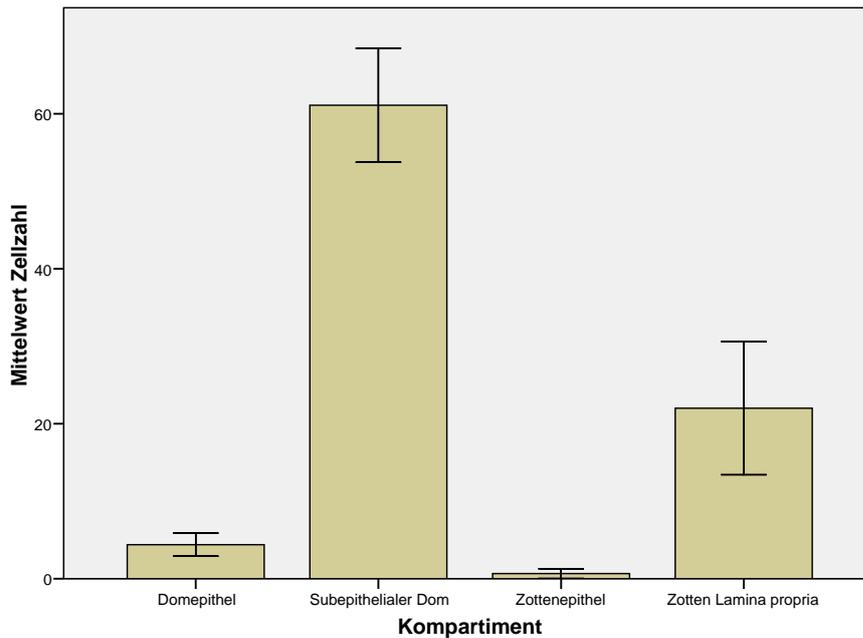


Diagramm 39: Mittelwertvergleich von SWC3⁺ Zellen/10.000 µm² zwischen den Kompartimenten

Zusammenfassung der kompartimentspezifischen Werte von Schwein 1 bis 3; **Schwein 1:** 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Schwein 2:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Schwein 3:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Aufgrund der pro Kompartiment zusammengefassten Daten aller drei Schweine, wie im Diagramm 18 dargestellt, ergeben sich folgende prozentuale SWC3-Zellanteile. Im Zottenepithel bleibt der Anteil an SWC3⁺ Zellen unter 1%, im Domepithel liegt er bei 3%. Im Vergleich zur Zotten-LP mit 22% SWC3⁺ Zellen liegt der Anteil mit 39% SWC3⁺ Zellen im SED fast doppelt so hoch. Die individuellen Unterschiede zwischen den Schweinen können hierbei natürlich nicht mehr erfasst werden. Um weitere Aussagen zu erhalten, wären auch hier Untersuchungen an größeren intern homogenen Schweinegruppen erforderlich.

3.2.9 Zusammenfassung Teil 1

In der folgenden Tabelle 5 sind die Daten und Zahlen, die sich aus den Dreifach-Immunfluoreszenzen der Serienschritte von jedem der drei Schweine ergeben einzeln zusammengefasst. Es sind die Relationen der Marker zu den durch die DAPI-Kernfärbung ermittelten durchschnittlichen Gesamtzellzahlen für jedes Schwein in den unterschiedlichen Kompartimenten zusammenfassend und prozentual dargestellt. Die bei einem Marker auftretenden signifikanten Unterschiede zwischen den Schweinen innerhalb eines Kompartimentes sind durch „*“ entsprechend hervorgehoben.

Marker	Schwein	Kompartimente: Zellzahl/10.000 μm^2 (\triangle % Anteil)			
		Domareal		Zottenareal	
		DE	SED	ZE	LP
DAPI (Gesamtzellzahl)	1	133 (\triangle 100%)	155 (\triangle 100%)	153 (\triangle 100%)	106 (\triangle 100%)
	2	140 (\triangle 100%)	165 * (\triangle 100%)	151 (\triangle 100%)	104 (\triangle 100%)
	3	143 * (\triangle 100%)	149 *** (\triangle 100%)	142 (\triangle 100%)	90 * (\triangle 100%)
Zytokeratin 18 (M-Zellen; Becherzellen)	1	33 (\triangle 25%)	-	18 (\triangle 12%)	-
	2	31 (\triangle 22%)	-	27 (\triangle 18%) **	-
	3	35 (\triangle 24%)	-	19 (\triangle 13%)	-
CD45 (Leukozyten)	1	44 (\triangle 33%)	152 (\triangle 98%)	20 (\triangle 13%)	99 (\triangle 93%)
	2	62 (\triangle 44%)	163 (\triangle 99%)	25 (\triangle 17%)	102 (\triangle 98%)
	3	52 (\triangle 36%)	145 (\triangle 97%)	34 (\triangle 24%)	88 (\triangle 98%)
CD2 (T-Zellen; nat. Killerzellen)	1	13 (\triangle 10%) *	33 (\triangle 21%)	21 (\triangle 14%) *	26 (\triangle 25%) *
	2	7 (\triangle 5%) *	39 (\triangle 24%)	43 (\triangle 28%) *	37 (\triangle 36%)
	3	49 (\triangle 34%) ***	70 (\triangle 47%) **(*)	61 (\triangle 43%) **	46 (\triangle 51%) *
CD4 (T-Helfer-Zellen)	1	2 (\triangle 2%)	20 (\triangle 13%)	-	37 (\triangle 35%)
	2	1 (<1%)	17 (\triangle 10%)	1 (<1%)	17 (\triangle 16%)
	3	1 (<1%)	26 (\triangle 17%)	1 (<1%)	16 (\triangle 17%)
CD8 (zytotox./regulat. T-Zellen)	1	9 (\triangle 7%) **	23 (\triangle 15%)	9 (\triangle 6%)	15 (\triangle 14%)
	2	4 (\triangle 3%) **	19 (\triangle 12%)	26 (\triangle 17%) ^{0,09}	43 (\triangle 41%) ^{0,07}
	3	33 (\triangle 23%) ***	34 (\triangle 23%) **	26 (\triangle 18%) **	30 (\triangle 33%) *
MHC II DR (Antigen-präsent. Zelle)	1	30 (\triangle 23%)	122 (\triangle 79%)	1 (<1%)	62 (\triangle 58%)
	2	28 (\triangle 20%)	138 (\triangle 74%)	-	73 (\triangle 70%)
	3	26 (\triangle 18%)	100 (\triangle 67%) *	-	44 (\triangle 49%) *
Ig (kurze Immunglobulinkette λ)	1	1 (<1%)	10 (\triangle 6%) **; 0,056	-	-
	2	2 (\triangle 1%)	17 (\triangle 10%) **	-	-
	3	-	5 (\triangle 3%) **	-	-
SWC3 (myeloide Zelle)	1	7 (\triangle 5%)	51 (\triangle 33%)	1 (<1%)	29 (\triangle 27%)
	2	3 (\triangle 2%)	65 (\triangle 39%)	-	6 (\triangle 6%) **
	3	3 (\triangle 2%)	67 (\triangle 47%)	2 (\triangle 1%)	32 (\triangle 35%)

Tabelle 6: Zusammenfassung der Dreifach-Fluoreszenzen-Daten aus 3.1.1– 3.1.8

-: nicht vorhanden bzw. durchschnittliche Zellzahl/10.000 μm^2 <1; \triangle : entspricht prozentuellem Anteil im Bezug zur durchschnittlichen Gesamtzellzahl des jeweiligen Kompartimentes und Schweines; Schwein1: 28 LT, nicht abgesetzt; Schwein 2: 39 LT, am 28. Tag abgesetzt + 10 Tage konventionelles Ferkelfutter; Schwein 3: 150 LT, abgesetzt am 28. Tag, dann konventionelles Schweinefutter; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$

Im Domepithel stellt sich die Entwicklung zwischen einem 28 Tage alten und nur gesäugten, einem 39 Tage alten abgesetzten und einem 150 Tage alten Landschwein wie folgt dar. Mit einer gemittelten Zelldichte von 139 Zellen/10.000 μm^2 ist das Domepithel um etwa 7% weniger dicht als das Zottenepithel. Im Domepithel befinden sich 22 bis 25% Zytokeratin 18⁺ M-Zellen, welche sich sehr gut morphologisch gegen die ebenfalls Zytokeratin 18⁺ Becherzellen des ZE abgrenzen lassen. Durchschnittlich 37% der Zellen in diesem Kompartiment sind CD45⁺ und die meisten CD45⁺ Zellen besitzen einen starken Bezug zu den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten der M-Zellen im Domepithel. Sie liegen zu einem großen Teil auf der luminalen Seite im Bezug zu den M-Zellkernen.

CD2⁺ Zellen als Subklasse der CD45⁺ Zellen unterliegen großen Schwankungen von 5 bis 34%. CD4⁺ Zellen, als Subklasse der CD2⁺ Zellen, spielen im Kompartiment DE mit Vorkommen von maximal 2% offensichtlich keine herausragende (quantitative) Rolle. Der Anteil eventuell doppelt positiver T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺) kann demzufolge die hier angegebenen Werte in diesem Kompartiment nicht überschreiten.

CD8⁺ Zellen, als weitere Subklasse der CD2⁺ Zellen, kommen im DE dagegen wesentlich häufiger vor. Die Werte differieren zwischen 3 bis 23%. Die Änderungen der Verhältnisse im Anteil an CD8⁺ Zellen spiegeln sich in den Änderungen der Verhältnisse an CD2⁺ Zellen wider. Dabei liegt der Anteil an CD8⁺ Zellen bei Schwein 1 und 2 etwa 2 bis 3% unter dem Anteil an CD2⁺ Zellen und bei Schwein 3 sogar 11% darunter.

MHC II DR⁺ Zellen besitzen im Domepithel einen Anteil von 18 bis 23%.

Zellen, die für den Ig-Marker positiv sind, findet man nur bis zu einem Anteil von maximal 1% im Kompartiment DE. Bemerkenswert ist hier allerdings bei Schwein 1 das Auftreten von luminal liegenden Ig⁺ Konglomeraten in engstem Bezug zu den Zytokeratin 18⁺ M-Zellen.

Der Anteil an SWC3⁺ Zellen liegt in diesem Kompartiment bei 2 bis 5%.

Im SED befinden sich durchschnittlich 156 Zellen/10.000 μm^2 . Dieses Kompartiment weist damit die höchste Zelldichte auf. Die Zelldichte beim abgesetzten Schwein 2 liegt allerdings gegenüber Schwein 1 mit 165 Zellen/10.000 μm^2 um 6% höher. Demgegenüber weist das älteste Schwein 3 mit 149 Zellen/10.000 μm^2 die geringste Zelldichte auf. Während in diesem Kompartiment keine Zytokeratin 18⁺ Zellen zu beobachten sind, liegt der Anteil an CD45⁺ Zellen bei 97 bis 99%.

Der Anteil an CD2⁺ Zellen im SED steigt von 21% bzw. 24% bis auf 47% beim 150 Tage alten Schwein 3. Die im Gegensatz zum DE im SED mit einem Anteil von 10 bis 17% vorhandene Subfraktion der CD4⁺ Zellen weist beim abgesetzten Schwein 2 mit 10% den ge-

ringsten Anteil, aber die größte Streuung auf. Auch die zweite Subfraktion der CD8⁺ Zellen zeigt, mit leicht höheren Anteilen von 12% bis 23%, das gleiche Muster. Der Anteil an CD4⁺ Zellen markiert auch hier gleichzeitig den maximal möglichen Anteil putativ vorhandener CD4⁺/CD8⁺ doppelt positiver T-Zellen. Im SED liegt der Anteil an MHC II DR⁺ Zellen zwischen 67% und 79% und damit etwa dreimal so hoch wie im DE. Ig⁺ Zellen kommen in nennenswerten Mengen nur im SED in unterschiedlichen Anteilen von 6, 10 und 3% vor. Der Anteil myeloider SWC3⁺ Zellen ist in diesem Kompartiment mit 33 bis 47% insgesamt am höchsten. Die Stichprobenwerte weisen eine große Schwankungsbreite auf.

Das Zottenepithel besitzt mit durchschnittlich 149 Zellen/10.000µm² nach dem SED die zweithöchste Zelldichte. Während der Anteil an Zytokeratin 18⁺ M-Zellen im DE annähernd gleich bleibt, ist der Anteil an Zytokeratin 18⁺ Becherzellen im ZE beim abgesetzten Schwein 2 gleichzeitig signifikant unterschiedlich. Hier steigt der Anteil an Zytokeratin 18⁺ Becherzellen mit dem Absetzen bis zum 39. Lebensstag auf 18% und liegt damit 50% über dem Niveau von 12% beim nicht abgesetzten Schwein 1 bzw. 13% beim alten Schwein 3. Der Anteil CD45⁺ leukozytärer Zellen beträgt in diesem Kompartiment 13 bis 24%. Es fällt auf, dass die Schwankungsbreite der Stichprobenwerte beim ältesten Schwein 3 am größten und beim jüngsten Schwein 1 am kleinsten ist. Im Kompartiment ZE liegt der Anteil an CD2⁺ Zellen bei 28 bis 43% und damit fast doppelt so hoch wie der Anteil an CD45⁺ Zellen. CD4⁺ Zellen kommen im ZE, wie im DE, nur vereinzelt, insgesamt mit einem Anteil unter 1% vor und fallen daher quantitativ nicht auf. Im Gegensatz dazu steigert sich der Anteil an CD8⁺ Zellen von 6 auf 18%. Im Zottenepithel treten MHC II DR⁻, sIg⁺- und SWC3⁺ Zellen quantitativ nicht in Erscheinung.

Die Zotten Lamina propria besitzt mit durchschnittlich nur 100 Zellen/10.000µm² die geringste Zelldichte der vier Kompartimente. Auch hier gibt es keine Zytokeratin 18⁺ Zellen. Vergleichbar mit dem SED liegt der Anteil an CD45⁺ Leukozyten mit 93 bis 98% ebenfalls sehr hoch. Die Schwankungsbreite der Stichprobenwerte ist auch hier beim ältesten Schwein 3 am größten und beim jüngsten Schwein 1 am kleinsten. Wie im darüber liegenden Zottenepithel steigt auch in der Zotten Lamina propria der Anteil an CD2⁺ Zellen hier von 25 auf 51% an und liegt letztlich um 8% Punkte höher als im Zottenepithel. Damit ist der Anteil an CD2⁺ Zellen im Vergleich zwischen allen vier Kompartimenten hier am größten. Bei einem durchschnittlichen Anteil von 24% CD4⁺ Zellen in der Zotten-LP fällt zudem auf, dass die

Schwankungsbreite der Stichprobenwerte hier beim jüngsten Schwein 1 am größten und beim alten Schwein 3 am kleinsten ist.

In der zweiten Subfraktion der T-Zellen ist auch in der Zotten Lamina propria, wie im ZE, eine starke Steigerung des Anteiles an CD8⁺ Zellen von 14 bis zu 41% zu beobachten. MHC II DR⁺ Zellen erreichen in diesem Kompartiment einen Anteil zwischen 70 und 49%. Dabei sinkt der Anteil MHC II DR⁺ Zellen beim 150 Tage alten Schwein 3 wie auch im SED gegenüber Schwein 1 und 2 signifikant ab. Unter den Zellen der Zotten Lamina propria sind bei den untersuchten Schweinen keine Ig⁺ Zellen nachzuweisen. Während die myeloiden SWC3⁺ Zellen im Kompartiment SED bei Schwein 2 eine Vergrößerung ihres Anteiles erfahren, fällt er gleichzeitig in der Zotten-LP signifikant von 27% beim Schwein 1 auf nur noch 6% beim abgesetzten Schwein 2 ab. Schwein 3 weist dann wieder einen hohen Anteil von 35% auf.

Zusammenfassend lassen sich beim Vergleich der Marker und Schweine signifikante Veränderungen feststellen, die abhängig vom Absetzen, vom Alter des Schweines und zudem spezifisch für bestimmte Kompartimente sind. Durch die Multifluoreszenzfärbungen der Serienschnitte von den jejunalen Darmgewebeproben dieser drei Schweine konnten sehr genaue individuelle Zellzahlen für das typische Dom- sowie Zottenareal ermittelt werden. Die größten und markantesten Veränderungen finden unter den CD2⁺ und CD8⁺ Zellen statt. Ein besonders starker Bezug von immunkompetenten Zellen an Zytokeratin 18⁺ Zellen kann im Domareal im Bereich der M-Zellen beobachtet werden. Dabei findet man die im Bezug zu den Zytokeratin 18⁺ intermediären Filamenten liegenden immunkompetente Zellen entweder luminal (supranuklear) im Bezug zu den M-Zellkernen gelegen oder basal (subnuklear) davon innerhalb des Domepithels im Übergangsbereich zum SED.

3.3 Teil 2 - Verteilung von CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen

Um die unter 3.2 fest- und dargestellten Differenzen in den Verhältnissen immunkompetenter Zellen der beschriebenen Kompartimente der jejunalen Dom- und Zottenareale quantitativ und qualitativ noch genauer zu beleuchten, wurden die im Abschnitt Material und Methoden (siehe 2.1) aufgelisteten fünf Schweinegruppen mit je vier Tieren hinsichtlich der Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 ausführlicher untersucht.

Abbildung 5 im Abschnitt 3.1.1 zeigt einen aus Einzelbildern zusammengesetzten kompletten Dünnschnitt des jejunalen Schweinedarmes. Derart aufbereitete Schnitte inklusive der be-

schriebenen immunhistochemischen Darstellungen der oben genannten Marker bildeten die Grundlage für die im Folgenden dargelegten Ergebnisse.

3.3.1 CD3⁺ Zellen im Jejunum

Die hier verwendeten monoklonalen anti- CD3-Antikörper erkennen Epitope auf der extrazellulären CDε Domäne von T-Zellen mit αβ- oder γδ-T-Zell-Rezeptoren. In folgender Abbildung 40 ist ein Dom- und in Abbildung 41 ein Zottenareal beispielhaft dargestellt. Außerdem sind die eingezeichneten Kompartimentgrenzen durch rote Linien, die angegebenen Flächeninhalte in μm^2 (rote Zahlen) sowie die gezählten Zellen durch farbige Kreuze visualisiert worden.

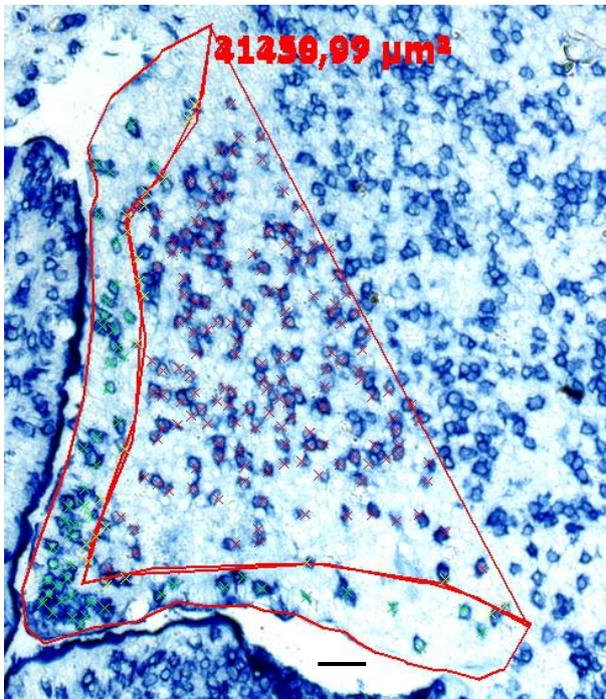


Abbildung 40: Domareal mit CD3⁺ Zellen und Auswerte-Annotationen

Fast Blue-Färbung (siehe 2.4); blau: CD3⁺ Zellen; rote Linien/Zahlen: Kompartimentgrenzen mit Angabe des Flächeninhaltes; farbige Kreuze: gezählte Zellen; typisches Domareal, schwarzer Balken = 30 μm

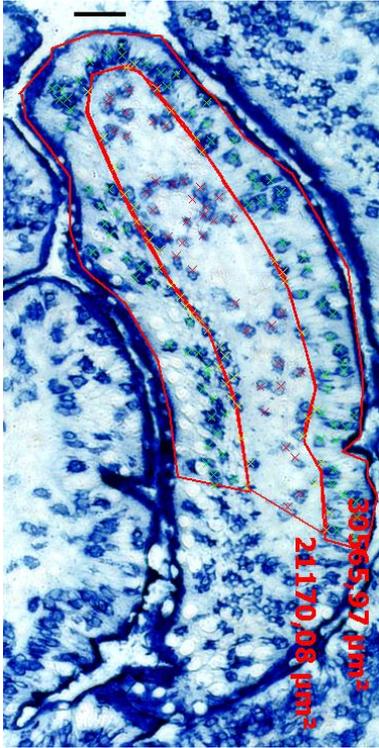


Abbildung 41: Zottenareal mit CD3⁺ Zellen und Auswerte-Annotationen

Fast Blue-Färbung (siehe 2.4); blau: CD3⁺ Zellen; rote Linien/Zahlen: Kompartimentgrenzen mit Angabe des Flächeninhaltes; farbige Kreuze: gezählte Zellen; typisches Zottenareal, schwarzer Balken = 20 µm (oben im Bild)

Die in den Abbildungen 40 und 41 dargestellten Dom- und Zottenareale entstammen einem 150 Tage alten Schwein aus der Gruppe 5. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Population der CD3⁺ Zellen über alle Kompartimente erstreckt. Dies ist ebenso bei den anderen Schweinegruppen der Fall. Im Folgenden werden die Quantitäten von CD3⁺ Zellen in den einzelnen Kompartimenten der fünf Schweinegruppen dargestellt und miteinander verglichen.

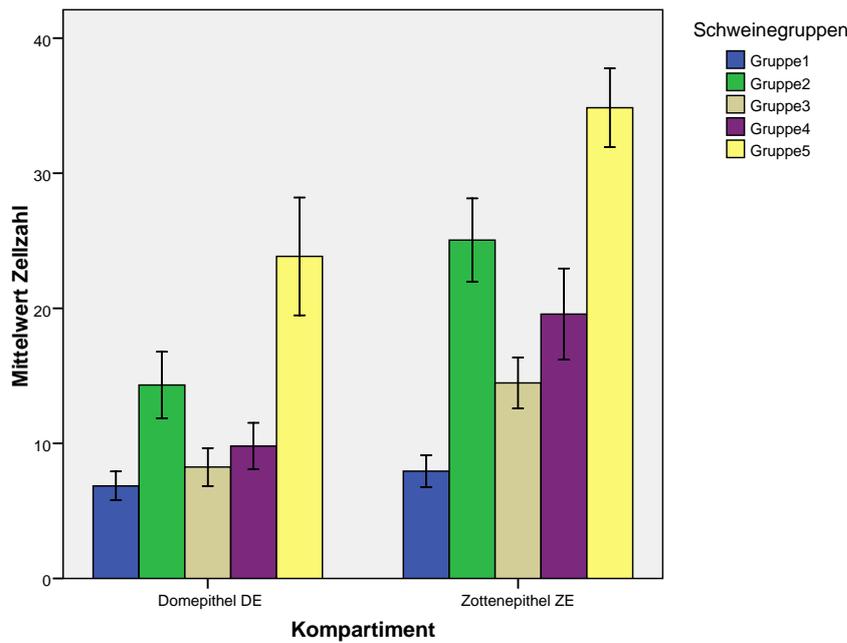


Abbildung 42: Mittelwertvergleich von CD3⁺ Zellen/ 10.000μm² im DE und ZE

Gruppe 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Gruppe 2:** 39 LT, 39 T SM, kein Futter, gesund; **Gruppe 3:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Gruppe 4:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, krank; **Gruppe 5:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Das Diagramm in Abbildung 42 zeigt, dass im Domepithel wie im Villusepithel ähnliche Verteilungsmuster der CD3⁺ Zellen zwischen den Gruppen existieren. Im DE und VE haben die 39 Tage alten und nicht abgesetzten Schweine der Gruppe 2 sowie die 150 Tage alten Schweine der Gruppe 5 jeweils signifikant ($p < 0,05$) mehr CD3⁺ Zellen als die Schweine der Gruppen 1, 3 und 4. Im Domepithel liegt der Durchschnitt an CD3⁺ Zellen/ 10.000μm² bei Gruppe 1, 3 und 4 bei 8, während die Zellzahl bei Gruppe 2 mit durchschnittlich 14 CD3⁺ Zellen/ 10.000μm² fast doppelt so hoch ist und sich damit signifikant von den anderen genannten Gruppen unterscheidet ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Die Werte der 39 Tage alten Schweine in den Gruppen 3 und 4 bewegen sich mit durchschnittlich 8 bzw. 10 CD3⁺ Zellen/ 10.000μm² eher auf dem Niveau der 28 Tage alten Schweine aus Gruppe 1. Ein noch deutlicherer signifikanter Unterschied ($p < 0,01$; $p < 0,001$) ist bei der Gruppe der 150 Tage alten Schweine zu beobachten, die im DE einen Wert von 24 CD3⁺ Zellen/ 10.000μm² aufweist. Damit existieren in den Domepithelien der älteren Schweine etwa dreimal so viele CD3⁺ Zellen wie in den nur 28 Tage alten Vergleichstieren.

Während sich im Zottenepithel die 28 Tage alten Schweine mit durchschnittlich nur 8 CD3⁺ Zellen/ 10.000μm² ebenso wie die 150 Tage alten Schweine mit etwa 35 CD3⁺ Zellen/ 10.000μm² signifikant ($p < 0,001$) von allen anderen Gruppen unterscheiden, zeigen die Unterschiede zwischen den 39 Tage alten Schweinen zwar deutliche Trends, aber nur der Vergleich von Gruppe 2 und Gruppe 3 verweist auf einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$;

Gruppe 2 gegen Gruppe 4: $p = 0,16$; Gruppe 3 gegen Gruppe 4: $p = 0,09$). Im ZE wird der Anteil an $CD3^+$ Zellen im Vergleich der 5 Schweinegruppen mit zunehmendem Alter höher und liegt bei den 150 Tage alten Schweinen viermal so hoch wie bei den 28 Tage alten Schweinen.

Im Gegensatz zum DE sind die Unterschiede im Anteil an $CD3^+$ Zellen zwischen den 39 Tage alten Schweinen und den 28 Tage alten Schweinen deutlich größer.

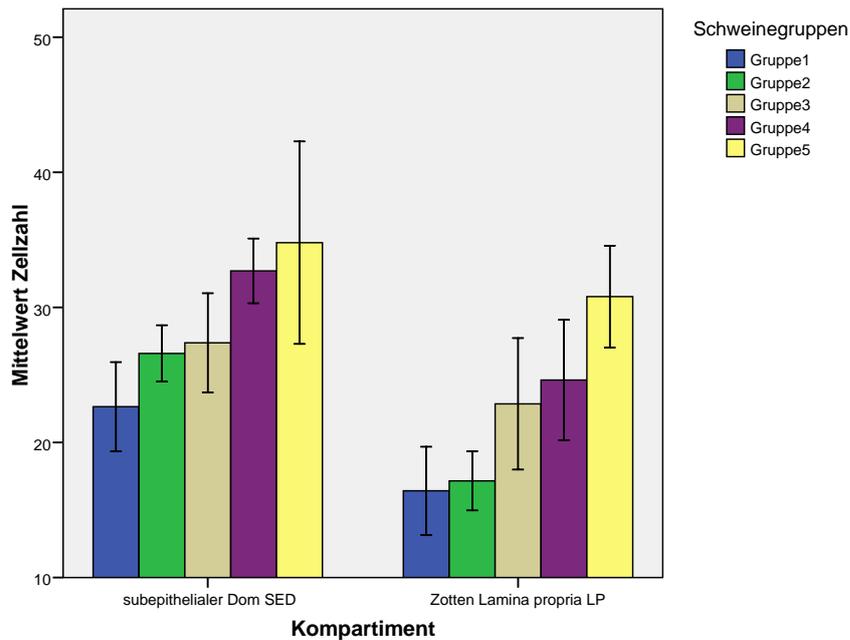


Abbildung 43: Mittelwertvergleich von $CD3^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ im SED und LP

Gruppe 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Gruppe 2:** 39 LT, 39 T SM, kein Futter, gesund; **Gruppe 3:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Gruppe 4:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, krank; **Gruppe 5:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Das Diagramm in Abbildung 43 zeigt für die Kompartimente SED und LP der Zotten einen steten Anstieg des Anteiles an $CD3^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ von Gruppe 1 bis Gruppe 5 auf. Signifikante Unterschiede finden sich dabei im SED insbesondere zwischen den Werten der 28 Tage alten nicht abgesetzten Schweine (Gruppe 1; $p < 0,001$) und den Werten der ebenfalls nicht abgesetzten 39 Tage alten Schweine (Gruppe 2; $p < 0,01$) gegenüber den Werten der *E. coli* behandelten Schweine mit Durchfallssymptomatik aus Gruppe 4. Außerdem zeigen die Werte von Gruppe 4 intern die geringsten Schwankungen. Die 150 Tage alten Schweine aus Gruppe 5 setzen sich nur durch einen unwesentlich höheren Mittelwert von $CD3^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ unsignifikant und mit einer größeren Streuung der Werte gegen Gruppe 4 ab. Die Mittelwertdifferenz dieser Gruppe 5 ist im Vergleich zu Gruppe 1 signifikant ($p < 0,05$).

In der Lamina propria der Zotten fällt der Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2 gegen Gruppe 5 mit $p < 0,001$ deutlicher aus, während die Differenz zur *E. coli* Gruppe 4 mit $p = 0,037$ bzw. $0,038$ in diesem Kompartiment nur ein geringeres Signifikanzniveau erreicht.

Um die Einflussgrößen genauer ermitteln und beschreiben zu können, wurde mit sämtlichen Stichproben aller Tiere aus allen Gruppen für die vier Kompartimente jeweils eine lineare Regression mit der abhängigen Variable Zellzahl $CD3^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ und den unabhängigen Variablen Alter, Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ berechnet. In folgender Tabelle 6 sind diese Werte übersichtlich zusammengefasst.

Kompartiment	Standardisierte Beta-Koeffizienten				Bestimmtheitsmaß (korr. R^2)
	Alter	Futter	Sauenmilch	„ <i>E. coli</i> “	
DE	---	,80	,39	,08	,57
SED	---	,39	,08	,29	,15
ZE	---	,90	,55	,28	,71
LP	---	,47	,08	,19	,24

Tabelle 6: Zusammenfassung Lineare Regression CD3

Die angegebenen Werte resultieren aus den Berechnungen „Multiple Lineare Regression“ mit dem Statistikprogramm SPSS 15. Sämtliche Stichproben der Schweine aller fünf Gruppen des jeweiligen Kompartimentes liegen zugrunde. Die Null vor dem Komma wurde weggelassen. ---: ausgeschlossene Variablen

Wie in Tabelle 6 dargestellt, sind die Werte des Beta-Koeffizienten für die Variable Alter in keinem der Kompartimente berechnet wurden. Aufgrund höchster Korrelation zwischen den Variablen Alter und Futter wurde die Variable Alter zugunsten der Variable Futter, welche höhere Signifikanzen erreicht und weniger stark mit den anderen Variablen korreliert, ausgeschlossen. Die Variablen Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ zeigen dagegen nur eine sehr geringe bis geringe Korrelation untereinander.

Wie dem Bestimmtheitsmaß R^2 zu entnehmen ist, können im DE 57% der Variabilität des Anteiles an $CD3^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ durch den Einfluss der Variablen Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ erklärt werden. Dabei hat die Variable Futter mit einem Beta-Koeffizienten von 0,8 die größte Gewichtung, gefolgt vom etwa halb so starken Einfluss durch die Sauenmilch. Der Faktor „*E. coli*“, repräsentiert durch den Einfluss des pathogenen *E. coli* Stammes, wirkt auf die $CD3^+$ Zellpopulation im Domepithel mit einem Beta-Koeffizienten von 0,08 nur gering ein.

Auch im Zottenepithel können 71% der Varianz durch den Einfluss der Variablen Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ erklärt werden. Den stärksten Einfluss besitzt auch hier das Futter, gefolgt vom etwa halb so großen Einfluss durch die Sauenmilch. Während der Einfluss der Variable „*E. coli*“ im DE nur sehr gering ist, liegt er im ZE deutlich höher und erreicht einen

fast vier Mal so großen Wert. Im Vergleich mit dem DE ist im ZE die Bedeutung der Variable „*E. coli*“ in Relation zur Variable Futter deutlich größer.

Im SED lassen sich nur 15% der Varianz der CD3⁺ Zellen mit diesem Modell erklären. Allerdings ist neben dem stärksten Einfluss durch das Futter in diesem Kompartiment die Wirkung der Variable „*E. coli*“ deutlich größer als der Einfluss durch den Faktor Sauenmilch. Ein ähnliches Muster ergibt sich für die Lamina propria des Zottenareales. Hier erklären die Variablen 24% der Varianz im CD3⁺ Zellpool. Neben dem noch etwas stärkeren Einfluss durch das Futter, im Vergleich zum SED, ist auch hier der Effekt durch die Variable „*E. coli*“ größer als durch Sauenmilch.

3.3.2 CD4⁺ Zellen im Jejunum

Wie bereits im Kapitel 3.2.4 ausgeführt, wird CD4 hauptsächlich auf T-Helferzellen exprimiert. Die Zellen können als einfach CD4⁺ oder als CD4⁺/CD8⁺ doppelt positive Zellen vorkommen (Chareerntanakul und Roth 2006; Pescovitz et al. 1998b; Saalmüller et al. 1989; Zuckermann und Gaskins 1996).

Im anschließenden Diagramm der Abbildung 44 sind die Verteilungsverhältnisse der CD4⁺ Zellen in den Kompartimenten Domepithel und Zottenepithel dargestellt. Wie schon unter 3.2.4 gezeigt, befinden sich intraepithelial pro 10.000 μm^2 Fläche nur vereinzelt CD4⁺ Zellen. Lediglich im Kompartiment DE hebt sich die Anzahl CD4⁺ Zellen mit 4 pro 10.000 μm^2 in der Gruppe der 150 Tage alten Schweine signifikant gegenüber den anderen Gruppen ab ($p < 0,01$). Im Zottenepithel gibt es dagegen zwischen den Gruppen keinen erkennbaren Unterschied, hier kommen CD4⁺ Zellen pro 10.000 μm^2 Fläche in allen Gruppen annähernd gleich selten vor.

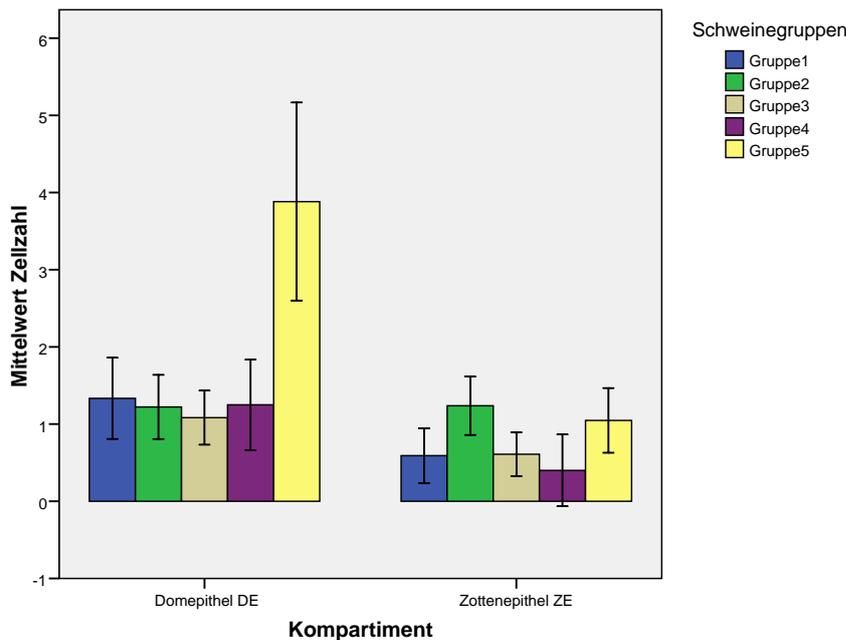


Abbildung 44: Mittelwertvergleich CD4⁺ Zellen/ 10.000μm² im DE und ZE

Gruppe 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Gruppe 2:** 39 LT, 39 T SM, kein Futter, gesund; **Gruppe 3:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Gruppe 4:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, krank; **Gruppe 5:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

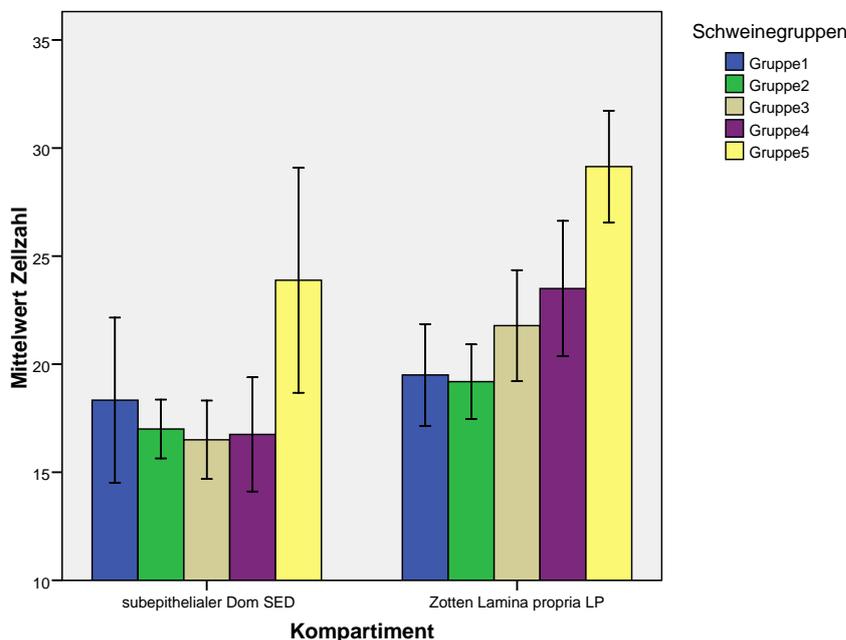


Abbildung 45: Mittelwertvergleich CD4⁺ Zellen/ 10.000μm² im SED und LP

Gruppe 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Gruppe 2:** 39 LT, 39 T SM, kein Futter, gesund; **Gruppe 3:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Gruppe 4:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, krank; **Gruppe 5:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

In Abbildung 45 sind die Verteilungsverhältnisse der CD4⁺ Zellen in den tiefer gelegenen Kompartimenten SED und Zotten-LP dargestellt. Wie schon den Daten aus den Dreifach-Fluoreszenzfärbungen (siehe Kapitel 3.2.4) zu entnehmen ist, sind im SED etwa 10 bis 17%

und in der Zotten-LP ca. 16 bis 35% der Zellen des jeweiligen Kompartimentes positiv für CD4. Im SED schwankt die mittlere Zellzahl an CD4⁺ Zellen/ 10.000µm² zwischen 16 in Gruppe 3 und 24 Zellen in Gruppe 5. Nur zwischen diesen beiden Gruppen lässt sich mit p = 0,098 ein Wert in der Nähe des untersten Signifikanzniveaus feststellen. Die Werte der 28 Tage alten Schweine aus Gruppe 1 weisen ebenso wie die schweineindividuellen Daten aus Teil 1 der Arbeit insgesamt eine größere Streuung als die 39 Tage alten Schweine aus den Gruppen 2 bis 4 auf.

In der Zotten-LP steigt die mittlere Zellzahl an CD4⁺ Zellen/ 10.000µm² von 19 Zellen in den Gruppen 1 und 2 über 22 bzw. 24 Zellen in den Gruppen 3 und 4 auf 29 Zellen in Gruppe 5 an. Während es zwischen den Gruppen 1 bis 4 keine signifikanten Unterschiede gibt, ist die Mittelwertdifferenz zwischen den Gruppen 1 und 2 zur Gruppe 5 sowie zwischen den Gruppen 3 und 5 hochsignifikant (p < 0,01 bzw. 0,001). Der Unterschied zwischen Gruppe 4 und 5 verfehlt mit p = 0,059 nur knapp das 5%ige Signifikanzniveau.

Um die Einflussgrößen auch hier besser darstellen zu können, wurde mit sämtlichen Stichproben aller Tiere aus allen Gruppen für drei der vier Kompartimente jeweils eine lineare Regression mit der abhängigen Variable Zellzahl CD4⁺ Zellen/ 10.000µm² und den unabhängigen Variablen Alter, Futter, Sauenmilch und „E. coli“ berechnet. In folgender Tabelle 7 sind diese Werte übersichtlich zusammengefasst.

Kompartiment	Standardisierte Beta-Koeffizienten				Bestimmtheitsmaß (korr. R ²)
	Alter	Futter	Sauenmilch	„E. coli“	
DE	---	,58	,03	,02	,31
SED	---	,34	,01	,05	,10
ZE	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LP	---	,53	,07	,15	,28

Tabelle 7: Zusammenfassung Lineare Regression CD4

Die angegebenen Werte resultieren aus den Berechnungen „Multiple Lineare Regression“ mit dem Statistikprogramm SPSS 15. Sämtliche Stichproben der Schweine aller fünf Gruppen des jeweiligen Kompartimentes liegen zugrunde. Die Null vor dem Komma wurde weggelassen.; ---: ausgeschlossene Variablen; n.b.: nicht berechnet

Wie in Tabelle 7 dargestellt, ist die Variable Alter aufgrund höchster Korrelation zwischen den Variablen Alter und Futter ausgeschlossen worden. Außerdem wurden die Beta-Koeffizienten und das Bestimmtheitsmaß für das Kompartiment Zottenepithel nicht berechnet, da hier keine relevanten Werte und Unterschiede dargestellt werden konnten.

Obwohl die absoluten Mittelwerte im Kompartiment Domepithel mit nur einer bis vier CD4⁺ Zellen/ 10.000µm² auf einem sehr niedrigen Niveau liegen, zeigt das Bestimmtheitsmaß, dass

mit diesem Modell dennoch 31% der Varianz dieser Variable erklärt werden können. Dabei hat das Futter mit einem Beta-Koeffizienten von 0,58 den größten Anteil, die Faktoren Sauenmilch mit 0,03 und „*E. coli*“ mit 0,02 liegen in derselben Größenordnung und fallen gegenüber der Variable Futter kaum ins Gewicht.

Im SED können mit dem Modell insgesamt nur 10% der Varianz aufgeklärt werden, so dass dieses hier keine große Erklärungskraft besitzt. Mit einem Beta-Koeffizienten von 0,34 hat auch hier das Futter den größten Einfluss. Obwohl die Wirkung der Variablen Sauenmilch mit 0,01 und „*E. coli*“ mit 0,05 sehr klein ausfällt, hat dabei die Komponente „*E. coli*“ einen fünffach höheren Anteil.

In der Zotten-LP kann das statistische Modell 28% der Varianz erklären. Auch hier stellt die Variable Futter mit einem Beta-Koeffizienten von 0,53 den größten Einfluss auf die Anzahl an CD4⁺ Zellen im Kompartiment dar. Die Einwirkung der Variable Sauenmilch mit 0,07 und der Variable „*E. coli*“ mit 0,15 ist in diesem Kompartiment mehrfach größer als in den Kompartimenten des Domareales. Dabei hat der Faktor „*E. coli*“ hier einen doppelt so starken Einfluss wie die Sauenmilch.

Sämtliche Korrelationswerte der in Tabelle 7 aufgeführten unabhängigen Variablen, deren Werte in die lineare Regression eingegangen sind, liegen unter 0,5 und zum Teil unter 0,2. Die Variablen korrelieren untereinander daher nur sehr gering bis gering.

3.3.3 CD8⁺ Zellen im Jejunum

Wie im Teil 1 Kapitel 3.2.5 bereits ausgeführt, kann der auch hier benutzte monoklonale Antikörper periphere T-Zellen und natürliche Killerzellen darstellen. Im Vergleich zu den CD3⁺ und CD4⁺ Zellen stellt sich der Unterschied in der Verteilung der CD8⁺ Zellen zwischen den Gruppen in den Kompartimenten DE, ZE und LP besonders deutlich dar. Am geringsten sind die Unterschiede im SED ausgeprägt. In Abbildung 46 sind die Verhältnisse und Anteile an CD8⁺ Zellen/ 10.000µm² in den epithelialen Kompartimenten DE und ZE im Vergleich dargestellt.

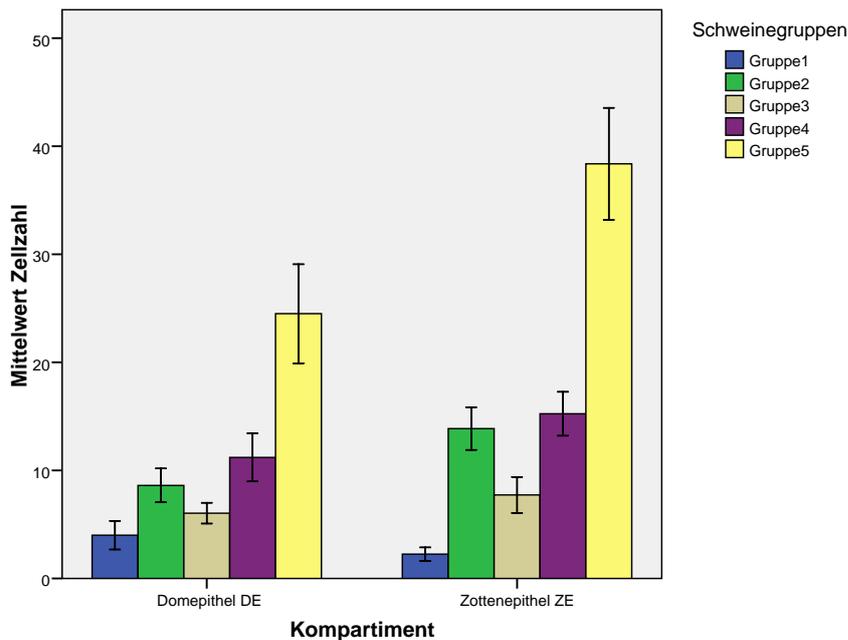


Abbildung 46: Mittelwertvergleich CD8⁺ Zellen/ 10.000μm² im DE und ZE

Gruppe 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Gruppe 2:** 39 LT, 39 T SM, kein Futter, gesund; **Gruppe 3:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Gruppe 4:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, krank; **Gruppe 5:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Es ist zu erkennen, dass sich die Verteilungsmuster zwischen den Gruppen im Dom- und im Zottenepithel ähneln. Dabei liegen die absoluten Zahlen der Mittelwerte im Villusepithel in den Gruppen 2 bis 5 höher und in Gruppe 1 etwas niedriger.

Im Domepithel des jejunalen Darmes befinden sich bei den 28 Tage alten Schweinen der Gruppe 1 durchschnittlich nur 4 CD8⁺ Zellen/ 10.000μm². In der nicht abgesetzten und 39 Tage alten Gruppe 2 liegt dieser Wert mit 9 CD8⁺ Zellen/ 10.000μm² doppelt so hoch und unterscheidet sich damit signifikant von dem der jüngeren Gruppe ($p < 0,01$). Darüber hinaus liegt er bei der *E. coli* belasteten Gruppe 4 sogar bei 11 CD8⁺ Zellen/ 10.000μm² und damit fast drei Mal so hoch wie in der Gruppe 1 ($p < 0,001$). Die abgesetzte Gruppe 3 ohne *E. coli* Belastung zeigt gegenüber Gruppe 1 auch den Trend zur Zunahme von CD8⁺ Zellen. Bei den Gruppen der 39 Tage alten Tiere untereinander ist der Unterschied zwischen Gruppe 3 und 4 signifikant ($p = 0,001$). Zwischen Gruppe 3 und 2 sowie zwischen den Gruppen 2 und 4 gibt es keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppe 5 der 150 Tage alten Schweine hebt sich mit durchschnittlich 24 CD8⁺ Zellen/ 10.000μm² signifikant von den anderen Gruppen ab ($p < 0,001$).

Im Zottenepithel besitzen die 28 Tage alten Schweine der Gruppe 1 durchschnittlich nur 2 CD8⁺ Zellen/ 10.000μm², so dass der Unterschied zu den 39 Tage alten Schweinen mit im Mittel 14 bzw. 15 CD8⁺ Zellen/ 10.000μm² bei Gruppe 2 bzw. 4 und 8 CD8⁺ Zellen/ 10.000μm² bei Gruppe 3 noch deutlicher ausfällt. Außer bei Gruppe 2 und Gruppe 4, zwi-

schen denen keine signifikanten Differenzen festgestellt werden können, unterscheiden sich alle anderen Gruppen signifikant untereinander ($p < 0,001$). Das Kompartiment Zottenepithel zeigt bei der Anzahl an $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ im Vergleich mit allen anderen Kompartimenten und Markern insgesamt die größten Unterschiede. Durchschnittlich 2 $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ bei den 28 Tage alten Schweinen stehen hier durchschnittlich 38 $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ bei den 150 Tage alten Schweinen gegenüber, ein Wert, der immerhin fast um das Zwanzigfache größer ist.

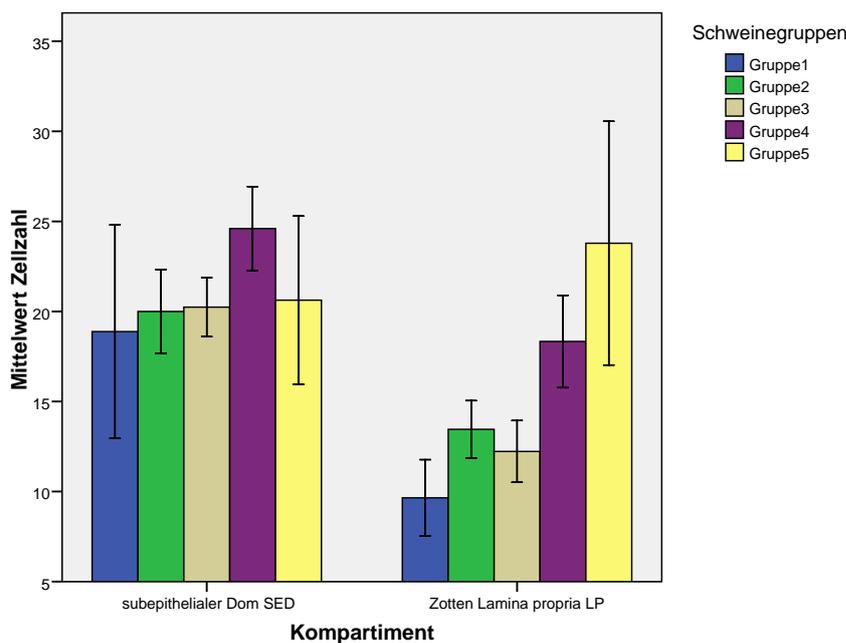


Abbildung 47: Mittelwertvergleich $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ im SED und LP

Gruppe 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; **Gruppe 2:** 39 LT, 39 T SM, kein Futter, gesund; **Gruppe 3:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; **Gruppe 4:** 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, krank; **Gruppe 5:** 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund; Fehlerbalken = 95% Konfidenzintervall

Das Diagramm in Abbildung 47 zeigt die im Gegensatz zu den Kompartimenten DE und ZE unterschiedlichen Verteilungsmuster von $CD8^+$ Zellen zwischen den Gruppen in den Kompartimenten SED und LP auf. Während der Anteil an $CD8^+$ Zellen im SED in allen Gruppen auf einem hohen Level annähernd gleich ist und sich nur die *E. coli* belastete Gruppe 4 von Gruppe 3 und gegen Gruppe 2 signifikant absetzt ($p < 0,05$), gestaltet sich das Verteilungsmuster in der Zotten Lamina propria ähnlich wie in den epithelialen Kompartimenten. Gruppe 1 mit durchschnittlich 10 $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ unterscheidet sich signifikant von Gruppe 2 mit 13 $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ ($p < 0,05$), von Gruppe 5 mit 24 $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ ($p < 0,01$) sowie von Gruppe 4 mit 18 $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ ($p < 0,001$). Darüber hinaus unterscheidet sich Gruppe 3 mit 12 $CD8^+$ Zellen/ $10.000\mu m^2$ von Gruppe 4 ($p < 0,01$) und von

Gruppe 5 ($p < 0,05$). Zudem setzt sich Gruppe 4 ebenso signifikant gegen Gruppe 2 ab ($p < 0,05$).

Zur besseren Darstellung der entscheidenden Einflussgrößen, wurde auch in diesem Falle mit sämtlichen Stichproben aller Tiere aus allen Gruppen für die vier Kompartimente jeweils eine lineare Regression mit der abhängigen Variable Zellzahl CD8⁺ Zellen/ 10.000µm² und den unabhängigen Variablen Alter, Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ berechnet. In folgender Tabelle 8 sind die ermittelten Werte zusammengefasst.

Kompartiment	Standardisierte Beta-Koeffizienten				Bestimmtheitsmaß (korr. R ²)
	Alter	Futter	Sauenmilch	„ <i>E. coli</i> “	
DE	---	,88	,24	,26	,66
SED	---	,05	,02	,27	,04
ZE	---	,99	,32	,27	,81
LP	---	,59	,15	,32	,30

Tabelle 8: Zusammenfassung Lineare Regression CD8

Die angegebenen Werte resultieren aus den Berechnungen „Multiple Lineare Regression“ mit dem Statistikprogramm SPSS 15. Sämtliche Stichproben der Schweine aller fünf Gruppen des jeweiligen Kompartimentes liegen zugrunde. Die Null vor dem Komma wurde weggelassen. ---: ausgeschlossene Variablen

Im Domepithel können, wie das Bestimmtheitsmaß R² zeigt, 66% der Varianz mit diesem Modell erklärt werden. Den größten Anteil hat auch hier mit einem Beta-Koeffizienten von 0,88 die Variable Futter. Mit den Beta-Koeffizienten 0,24 und 0,26 ist der Einfluss der Variablen Sauenmilch und „*E. coli*“ in diesem Kompartiment annähernd gleich groß, beträgt aber nur etwa ¼ von dem der Variable Futter.

Im profunder gelegenen Kompartiment SED reicht das Modell nur zur Erklärung von 4% der Varianz aus und ist damit nur beschränkt geeignet, diese angemessen zu fassen.

Im Kompartiment Zottenepithel können jedoch immerhin 81% der Varianz an CD8⁺ Zellen mit diesem Modell erklärt werden. Während die Variable Futter mit dem im Vergleich höchsten Beta-Koeffizienten von 0,99 auch hier den größten Einfluss hat, erreichen die Variablen Sauenmilch und „*E. coli*“ mit den Beta-Koeffizienten 0,32 und 0,27 jeweils nicht ganz 1/3 dieser Wirkung.

In der Zotten Lamina propria kann das Modell 30% der Varianz an CD8⁺ Zellen erklären. Mit dem Beta-Koeffizienten von 0,59 ist auch in diesem Kompartiment des Zottenareales der Einfluss des Futters am größten. Die Variable „*E. coli*“ trägt hier mit einem Beta-Koeffizienten von 0,32 nur etwa halb so stark wie die Variable Futter zur Varianzaufklärung bei. Die Variable Sauenmilch mit ihrem Beta-Koeffizienten von 0,15 erreicht wiederum nur die Hälfte des Einflusses der Variable „*E. coli*“.

Zur Berechnung wurde auch hier die Variable Alter aufgrund sehr hoher Korrelation mit der Variable Futter zugunsten der Variable Futter, welche z.T. höher mit der abhängigen Variable korreliert, ausgeschlossen. Alle anderen Variablen zeigen sehr geringe Korrelationen untereinander.

3.3.4 Darstellung CD3, CD4 und CD8 durch Fluoreszenzfärbungen

Um neben den immunhistochemischen Einzelfärbungen der Marker CD3, CD4 und CD8 zusätzliche Informationen zu deren Verteilung und ihrem Bezug zueinander zu erhalten, wurde die in den folgenden Abbildungen 48 (Domareal) und 49 (Zottenareal) dargestellte Dreifachfluoreszenz-Färbung etabliert. Diese Darstellung erfolgte nur an Proben der 39 Tage alten Tiere aus der gesunden abgesetzten Schweinegruppe 3.

Es lässt sich feststellen, dass im Zotten- wie im Domareal nahezu alle $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen auch CD3 positiv sind. Der Anteil an $CD3^-$ Zellen, die entweder $CD4^+$ oder $CD8^+$ sind, liegt unter 1%.

Im Domareal liegt der Anteil einfach $CD3^+$ Zellen im Epithel wie im subepithelialen Bereich unter 1%. Diese wenigen Zellen sind außerdem augenscheinlich besonders stark positiv für den Marker CD3 im Vergleich mit den für mehrere Marker positiven Zellen. Die Verteilung der $CD3^+$ und $CD3^+/CD8^+$ doppelt positiven Zellen erstreckt sich deutlich über beide Kompartimente des Domareales. $CD4^+$ sowie $CD3^+/CD4^+$ und $CD4^+/CD8^+$ doppelt bzw. $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ dreifach positive Zellen erscheinen dagegen fast nur im SED. Die Fraktion der $CD4^+/CD8^+$ doppelt bzw. $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ dreifach positiven Zellen beträgt maximal 1% der markierten Zellen im gesamten untersuchten Domareal.

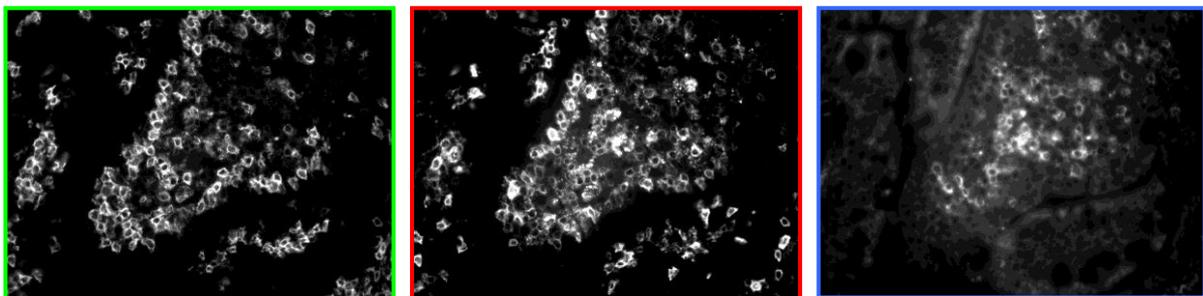
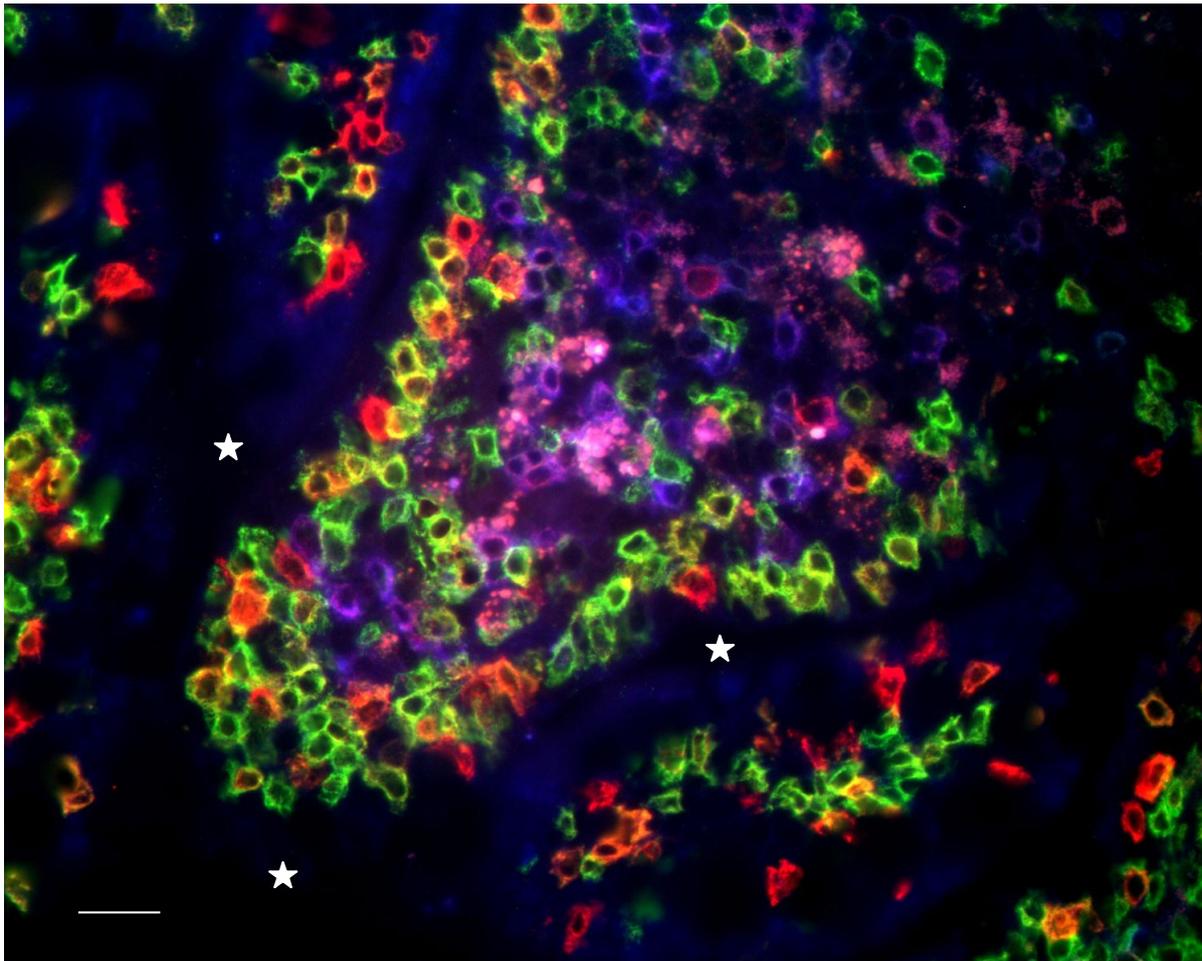


Abbildung 48: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Domareales; CD3; CD4; CD8

CD3 = rot; CD8 = grün; CD4 = blau; weiße Sterne = Darmlumen. Länge der weißen Linie = 20 μ m; Domareal, unten im Bild die zugrundeliegenden Einzelbilder mit entsprechender farblicher Umrandung

Im Zottenareal (siehe Abbildung 49) sind CD3⁺ und CD3⁺/CD8⁺ doppelt positive Zellen in beiden Kompartimenten zu finden. Im Zottenepithel sind 40 bis 60% der markierten Zellen CD8⁻ und dabei stark CD3⁺. Die CD3⁺ einfach positiven Zellen liegen intraepithelial eher zum Darmlumen hin. Die CD3⁺/CD8⁺ doppelt positiven Zellen etwas tiefer auf der epithelialen Seite der Basalmembran (siehe auch Abbildung 7 in Abschnitt 3.1.2). CD4⁺ einfach-, CD3⁺/CD4⁻, CD4⁺/CD8⁺ doppelt bzw. CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ dreifach positive Zellen erscheinen auch hier, bis auf einzelne Ausnahmen, nur in der Zotten Lamina propria. Der Anteil

CD4⁺/CD8⁺ doppelt bzw. CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ dreifach positiver Zellen ist auch im untersuchten Zottenareal nicht größer als 1%.

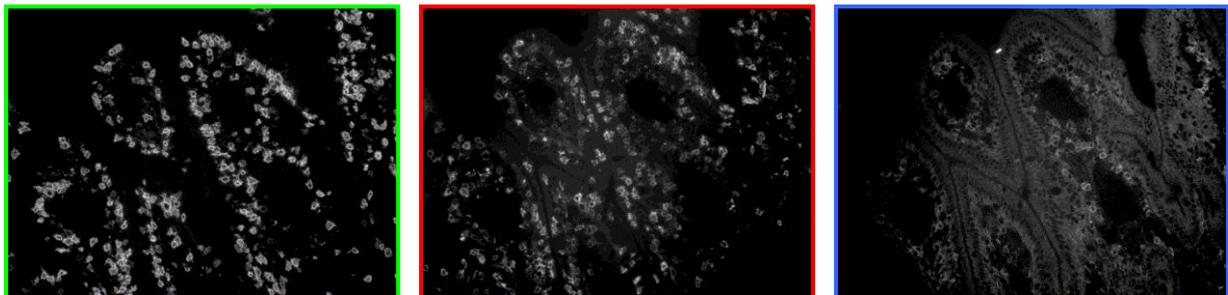
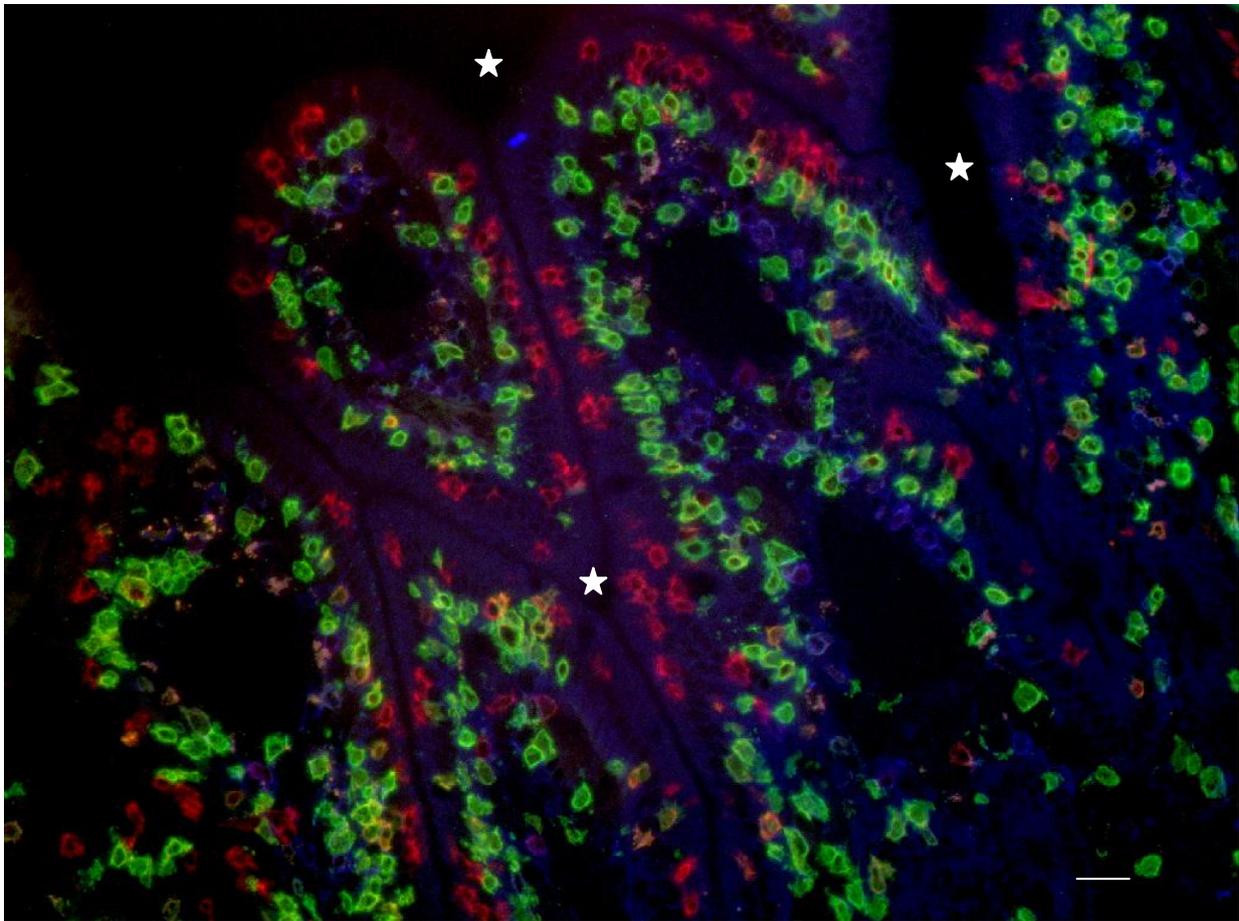


Abbildung 49: Dreifach-Fluoreszenzfärbung eines Zottenareales; CD3; CD4; CD8

CD3 = rot; CD8 = grün; CD4 = blau; weiße Sterne = Darmlumen. Länge der weißen Linie = 20µm; Zottenareal, rechts im Bild die zugrundeliegenden Einzelbilder mit entsprechender farblicher Umrandung

3.3.5 Zusammenfassung CD3/4/8 T-Zell-Verteilung in Dom und Zotten

Die Mittelwertvergleiche inklusive der Tamhane-Posthoc-Mehrfachvergleiche zur Ermittlung der Signifikanzen stellen deutlich die existierenden starken Differenzen a) zwischen den Schweinegruppen, b) zwischen den Dom- und Zottenarealen und c) zwischen den epithelialen Kompartimenten DE/ ZE und den tiefer gelegenen Kompartimenten SED/ LP dar und liefern

zugleich belast- sowie vergleichbares Zahlenmaterial für die definierten Kompartimente. Die aus den fünf Schweinegruppen extrahierbaren Einflussgrößen Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ wirken a) verschieden auf die dargestellten Zellpopulationen und b) auch unterschiedlich stark auf die differenzierten jejunalen Schweinedarmkompartimente ein.

Für das aus den unterschiedlichen Schweinegruppen abgeleitete lineare Regressionsmodell mit den Einflussgrößen bzw. unabhängigen Variablen Alter/ Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Effekte auf das Epithel im Dom- wie im Zottenareal stets größer sind. Im Umkehrschluß sind die Einflüsse der unabhängigen Variablen des Modelles auf die tiefer gelegenen Kompartimente insgesamt stets kleiner. Die Verhältnisse der Einflussgrößen zueinander sind zwischen den Markern und Kompartimenten unterschiedlich. Die gleichzeitige Darstellung der Marker CD3, CD4 und CD8 mittels Dreifach-Fluoreszenzmarkierung zeigt beispielhaft die Lage und den Bezug der Marker sowie Zellen zueinander auf.

3.4 Teil 3 In-situ-Hybridisierung von IL2-, IL4-, IL10- und IFN γ -mRNS

Aufgrund geringer Mengen sowie zeitlich begrenzter Lagerungsfähigkeit der per in-vitro-Transkription hergestellten DIG-markierten RNS-Sonden wurden diese, wie unter 2.6. beschrieben, regelmäßig neu hergestellt und anschließend entsprechend getestet und eingestellt (siehe 2.7).

In der Auswertung wurden nur die Zellen als positiv bewertet, welche bei Einsatz der entsprechenden antisense-Sonde einen deutlichen Farbniederschlag im Zytoplasma bei gleichzeitig aufgehelltem Kernareal zeigten, während die parallel durchgeführte Hybridisierung mit der komplementären sense-Sonde keine analogen Signale lieferte. Aufgrund eines nicht eliminierbaren Hintergrundsignals vor allem im Bereich der Becherzellen und Kryptenregionen, konnte nicht immer ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis dargestellt werden.

Die Einteilung der Schweinegruppen ist unter 2.1 in Tabelle 1 dargestellt. Die in-situ-Hybridisierungen wurden wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt.

3.4.1 Verteilung von IL2-mRNS⁺ Zellen

Der Nachweis von IL2-mRNS⁺ Zellen per isH stellt den funktionellen (Teil-) Status der T-Zellen auf transkriptioneller Ebene, ungeachtet transkriptioneller und translationaler Regula-

tionsmöglichkeiten, in situ dar. In folgender Abbildung 50 ist eine Übersicht ausgewählter in-situ-Hybridisierungen aus den Gruppen 1, 3 und 5 inklusive einer negativen Kontrolle (Gruppe 5; sense-Sonde) beispielhaft dargestellt. Dabei ist auf der rechten Seite jeweils ein vergrößerter Ausschnitt des linken Bildes zu sehen.

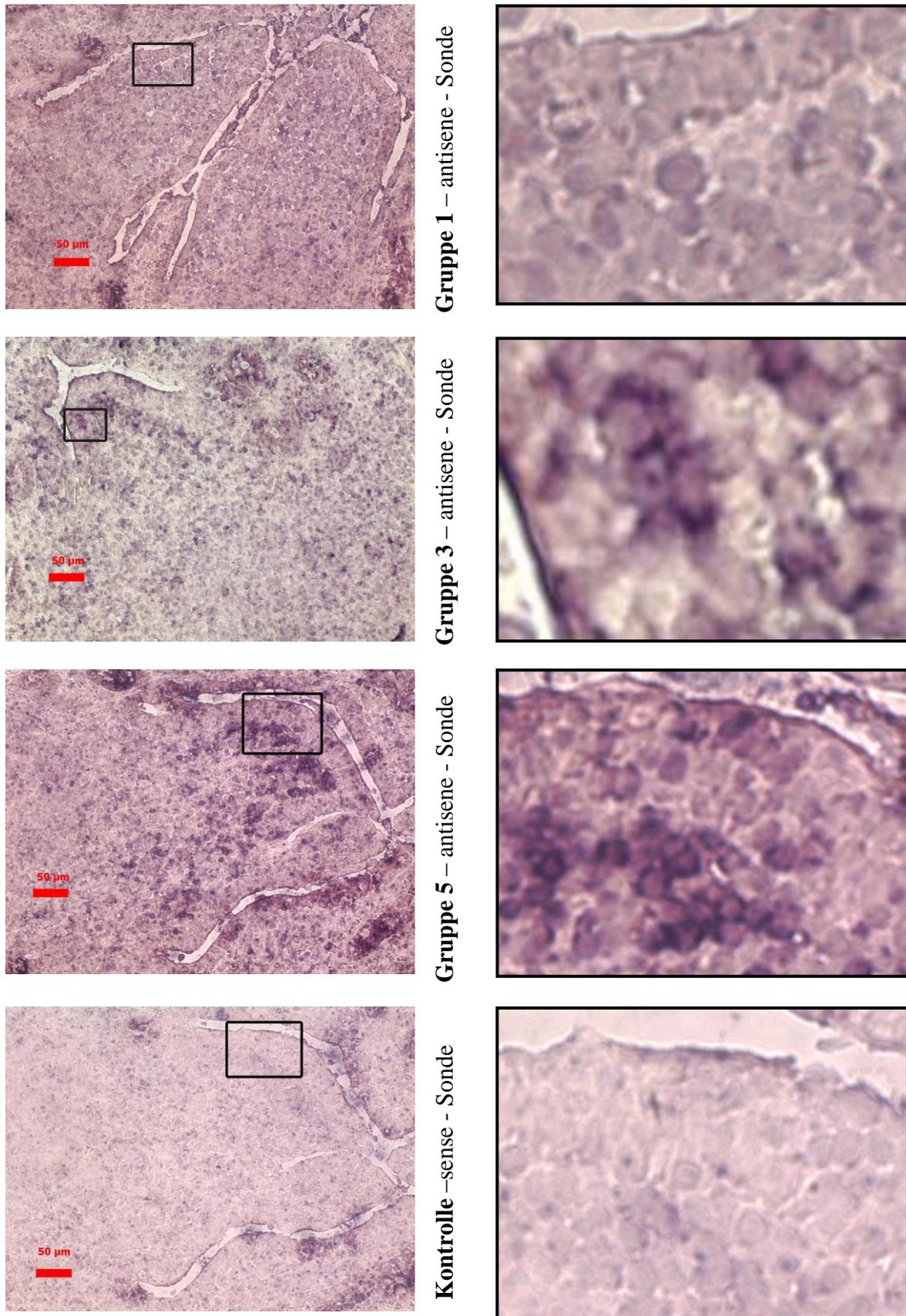


Abbildung 50: Übersicht IL-2 mRNA In-situ-Hybridisierung

links: ausgewählte Domareale aus den Gruppen 1, 3 und 5; Vergrößerung x 200, roter Maßstabsbalken = 50 µm; rechts: vergrößerte Ausschnitte aus den Abbildungen von links; weitere Erklärungen im folgenden Text

In Abbildung 50, in den oberen beiden Bildern, sind links in 200facher Vergrößerung (siehe roter Maßstabsbalken a 50 μm) zwei nebeneinander liegende Domareale aus einem Schwein von Gruppe 1 (28 Lebenstage; nur Sauenmilch) dargestellt. Rechts ist der vergrößerte Ausschnitt mit den beiden Anteilen Domepithel und subepithelialer Dom zu erkennen. In den Domarealen aus den jejunalen Peyerschen Platten der Schweine der Gruppe 1 sind keine IL2-mRNS⁺ Zellen darstellbar. Ebenso sind in den Domarealen der Gruppe 2 (39 Lebenstage; 39 Tage Sauenmilch; nicht abgesetzt; gesund) keine IL2-mRNS⁺ Zellen nachzuweisen.

Die zweite Bildzeile in Abbildung 50 zeigt links wieder ein komplettes Domareal aus einem Schwein der Gruppe 3 und rechts den entsprechenden markierten und vergrößerten Ausschnitt. Beispielhaft ist hier für die Gruppe 3 (39 Lebenstage; 28 Tage Sauenmilch; 10 Tage konventionelles Ferkelfutter; gesund) und die Gruppe 4 (39 Lebenstage; 28 Tage Sauenmilch; 10 Tage konventionelles Ferkelfutter; krank; Durchfall nach *E. coli* „Abbottstown“) ein Domareal aus Gruppe 3 mit einigen IL2-mRNS⁺ Zellen in den Bereichen Domepithel und subepithelialer Dom dargestellt. Im Ausschnitt rechts ist bei den IL2-mRNS⁺ Zellen deutlich der im Zytoplasma gelegene Farbniederschlag und das gleichzeitig aufgehellte Kernareal der Zelle zu erkennen. In den Gruppen 3 und 4 stehen einige wenige Domareale mit wenigen IL2-mRNS⁺ Zellen (wie beispielhaft dargestellt) neben einer Mehrheit von Domarealen ohne IL2-mRNS⁺ Zellen. Außerdem lassen sich insbesondere innerhalb dieser beiden Gruppen markante Unterschiede in der Anzahl darstellbarer IL2-mRNS⁺ Zellen, deren Färbeintensität und dem Signal-Hintergrundverhältnis zwischen den einzelnen Schweinen feststellen. Auch innerhalb eines Gewebeschnittes, z.B. in zwei verschiedenen Domarealen, lassen sich derartige Unterschiede diagnostizieren.

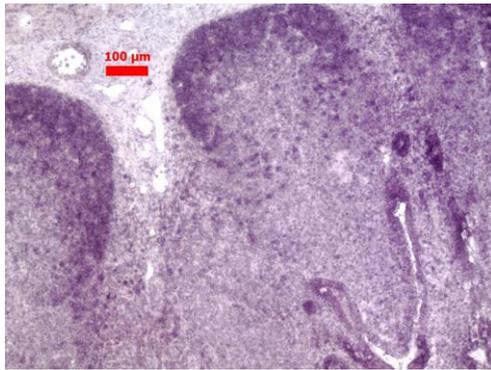
In den vier Bildern der dritten und vierten Zeile in Abbildung 50 ist zweimal das Domareal eines Schweines aus der Gruppe 5 (150 Lebenstage; links in Vergrößerung x 200 + rechts entsprechender Ausschnitt) gezeigt. Während in der untersten Zeile 4 die negative Kontrolle mit der entsprechenden IL-2 sense Sonde (ohne IL2-mRNS⁺ Zellen) zu sehen ist, sind in Zeile 3 viele sich deutlich vom Hintergrund abhebende IL2-mRNS⁺ Zellen, vor allem im subepithelialen Dom, zu erkennen. Innerhalb der Gruppe 5 beinhalten die meisten Domareale größere Anhäufungen von deutlich IL2-mRNS⁺ Zellen. Aber auch hier sind einige Domareale ohne bzw. mit nur sehr wenigen IL2-mRNS⁺ Zellen zu finden.

Die in den Follikeln vorhandenen IL2-mRNS⁺ Zellen befinden sich hauptsächlich im Bereich des Follikelmantels und sind bei den Schweinen aus den Gruppen 4 und 5 am deutlichsten darstellbar.

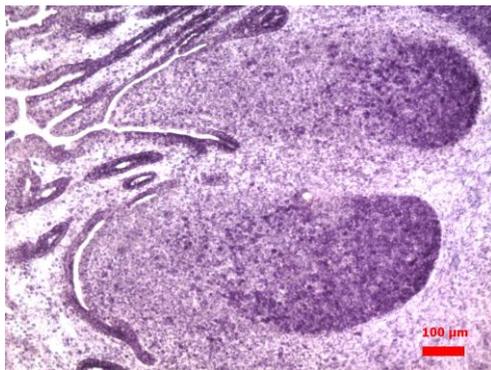
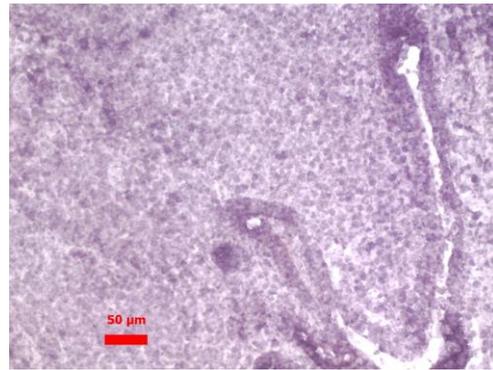
Im Gegensatz zu den Domarealen sind im Bereich der Zotten (Epithel und Zotten Lamina propria) in keiner Schweinegruppe deutlich IL2-mRNS⁺ Zellen detektierbar. Es kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass sich im Bereich eines stärkeren Hintergrundsignals vor allem in den epithelialen Regionen der Krypten nicht darstellbare IL2-mRNS⁺ Zellen befinden.

3.4.2 Verteilung von IL4-mRNS⁺ Zellen

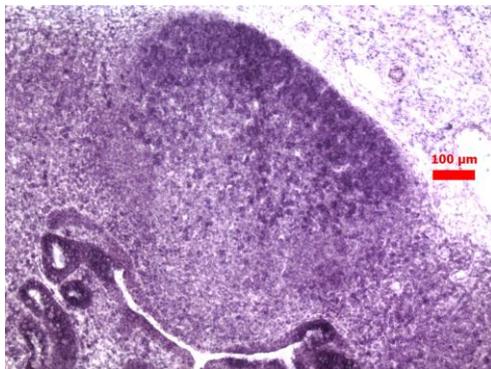
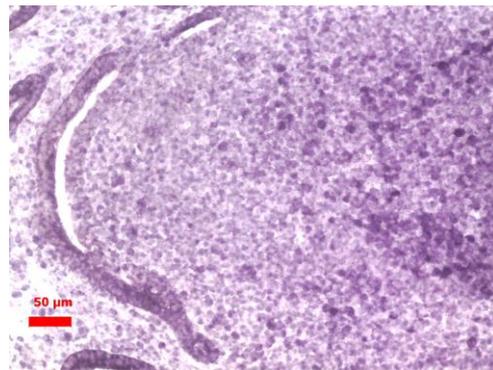
Die in den folgenden Abbildungen 51 und 52 durch die isH dargestellten IL4-mRNS⁺ Zellen spiegeln einen Teil des funktionellen Zustandes der CD4⁺ T-Zellen in den betrachteten Arealen auf transkriptioneller Ebene wider. In folgender Abbildung 51 ist eine Übersicht ausgewählter in-situ-Hybridisierungen aus den Gruppen 1, 2, 4 und 5 beispielhaft dargestellt. Dabei ist auf der linken Seite jeweils mindestens ein Domareal inklusive dem dazugehörigen Follikel beispielhaft aus einer Schweinegruppe mit einem Vergrößerungsfaktor x 100 (roter Maßstabsbalken = 100 µm) und rechts das gleiche Domareal ohne Follikel mit einem Vergrößerungsfaktor x 200 (roter Maßstabsbalken = 50 µm) zu sehen. In Abbildung 52 sind links die gleichen Domareale aus den gleichen Schweinegruppen dargestellt wie in Abbildung 51, rechts befindet sich hier jeweils der vergrößerte markierte Ausschnitt.



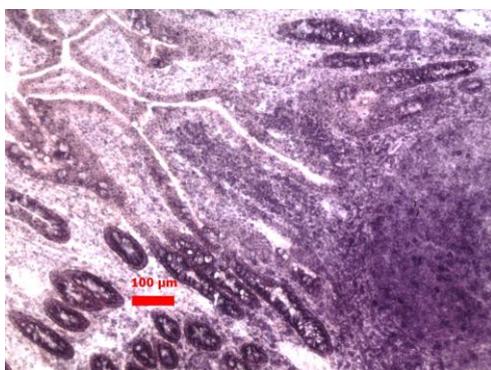
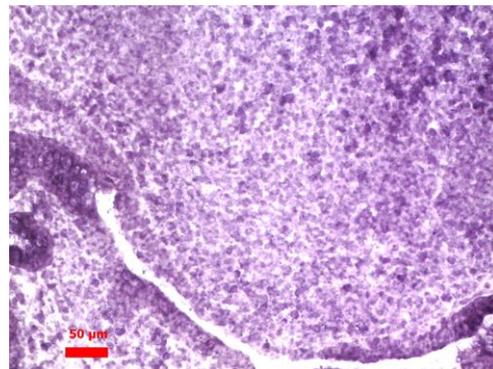
Gruppe 1 – antisense - Sonde



Gruppe 2 – antisense - Sonde



Gruppe 4 – antisense - Sonde

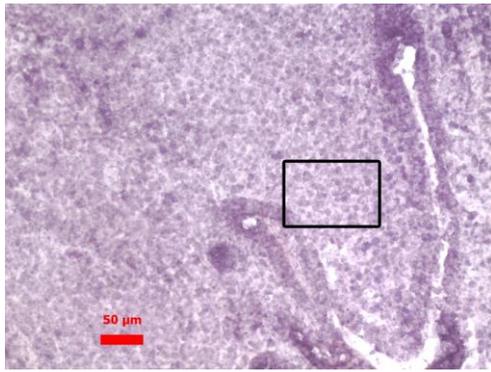


Gruppe 5 – antisense - Sonde

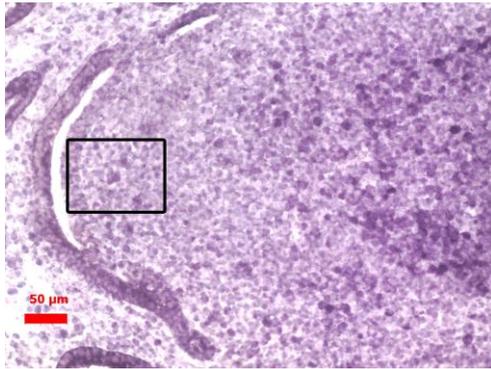
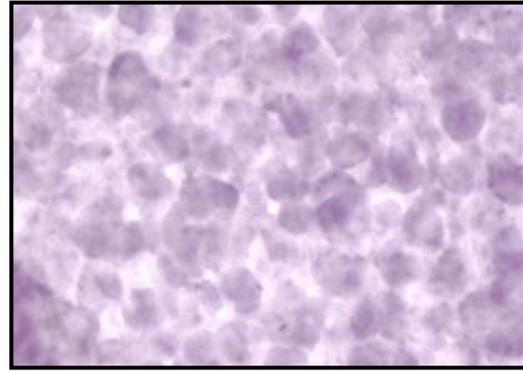


Abbildung 51: Übersicht IL-4 mRNS In-situ-Hybridisierung

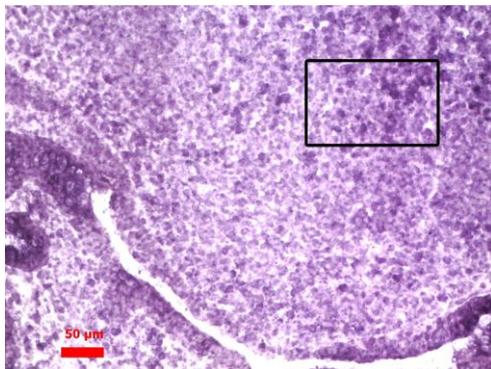
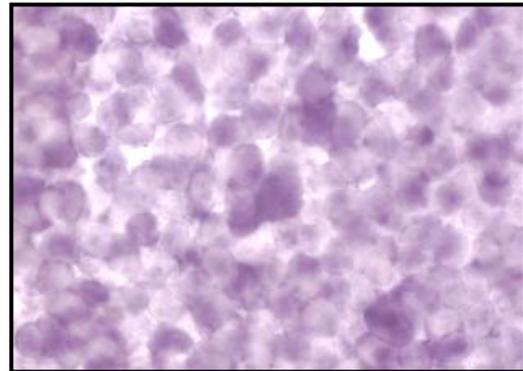
links: ausgewählte Domareale mit dazugehörigem Follikel aus den Gruppen 1, 2, 4 und 5 Vergrößerung x 100, roter Maßstabsbalken = 100 μm ; rechts: die gleichen Domareale wie links in der Vergrößerung x 200, roter Maßstabsbalken = 50 μm ; weitere Erklärungen im Text



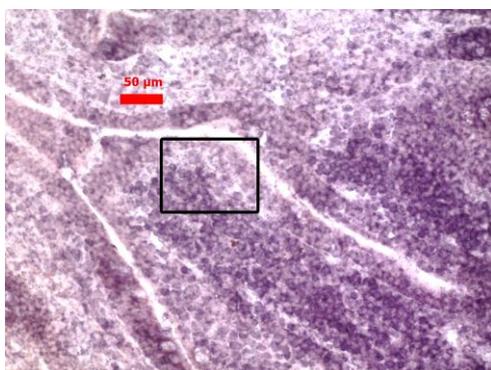
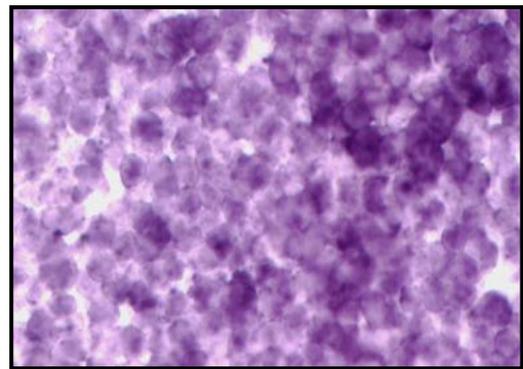
Gruppe 1 – antisense - Sonde



Gruppe 2 – antisense - Sonde



Gruppe 4 – antisense - Sonde



Gruppe 5 – antisense - Sonde

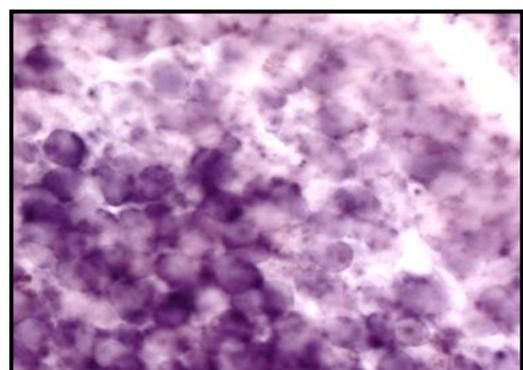


Abbildung 52: Übersicht IL-4 mRNA In-situ-Hybridisierung

links: ausgewählte Domareale aus den Gruppen 1, 2, 4 und 5 Vergrößerung x 200, roter Maßstabsbalken = 50 μm (siehe Abbildung 51); rechts: vergrößerte Ausschnitte aus den Abbildungen von links; weitere Erklärungen im Text

Wie aus den Bildern der isH von Gruppe 1 (28 Lebenstage) hervorgeht, kommen in dieser Schweinegruppe zwar deutlich IL4-mRNS⁺ Zellen in den Mantelzonen der Follikel und intra-follikulär vor, aber in keinem Domareal sind entsprechende IL4-mRNS⁺ Zellen nachweisbar (siehe Bilder in Zeile 1 der Abbildungen 51 und 52). Auch wenn das Domareal nah über dem Follikel liegt, enthält es keine IL4-mRNS⁺ Zellen. Im Vergleich zu den anderen Gruppen sind die Signale etwas schwächer ausgeprägt.

In den Gruppen 2, 3 und 4 (alle 39 Lebenstage; nicht abgesetzt + gesund; abgesetzt + gesund; abgesetzt + krank) erscheint die Verteilung ähnlich. In allen drei Gruppen gibt es viele deutlich IL4-mRNS⁺ Zellen, vor allem in den Mantelzonen der Follikel (siehe Bilder in Zeile 2 und 3 in Abbildung 51 und Zeile 3 in Abbildung 52). Wie an dem Domareal von einem Schwein aus Gruppe 2 beispielhaft dargestellt (siehe Zeile 2 in Abbildung 52), sind in diesen Domarealen keine deutlich IL4-mRNS⁺ Zellen zu finden. Bei der Mehrheit der Domareale in diesen Gruppen reichen die IL4-mRNS⁺ Zellen nicht bis in den subepithelialen Dom hinauf.

Die mit Abstand deutlichsten IL4-mRNS⁺ Zellen sind in den Follikeln und Domarealen der Proben aus den Schweinen der Gruppe 5 (150 Lebenstage) zu finden (siehe Bilder der Zeilen 4 in Abbildung 51 und 52). Dabei besitzt die Mehrzahl der Domareale dieser Gruppe viele deutlich positive IL4-mRNS⁺ Zellen.

In allen Schweinegruppen sind gruppen- wie auch objektinterne Differenzen in der Anzahl der positiven Zellen, der Intensität der Färbungen und im Signal-Hintergrundverhältnis zu beobachten.

Im Bereich des zum Lumen hin gerichteten Zottenepithels und der Zotten Lamina propria können in keiner Schweinegruppe deutlich IL4-mRNS⁺ Zellen detektiert werden. Lediglich an der Basis einiger Zotten, in direkter Assoziation zu einem stark positiven Follikel bei Schweinen aus Gruppe 5, lassen sich entsprechende Zellen nachweisen. Es kann auch hier nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich im Bereich eines stärkeren Hintergrundsignals, vor allem in den epithelialen Regionen der Krypten, nicht darstellbare IL4-mRNS⁺ Zellen befinden.

3.4.3 Verteilung von IL10-mRNS⁺ Zellen

In nachfolgender Abbildung 53 ist auf transkriptionaler Ebene der funktionelle Zustand von IL10-mRNS⁺ Zellen verschiedener Schweine in den betrachteten Kompartimenten durch die isH festgehalten. Dabei sind auf der linken Seite Domareale mit dazugehörigen Follikeln mit einem Vergrößerungsfaktor x 100 (roter Maßstabsbalken = 100 µm) und rechts jeweils der vergrößerte markierte Ausschnitt dargestellt.

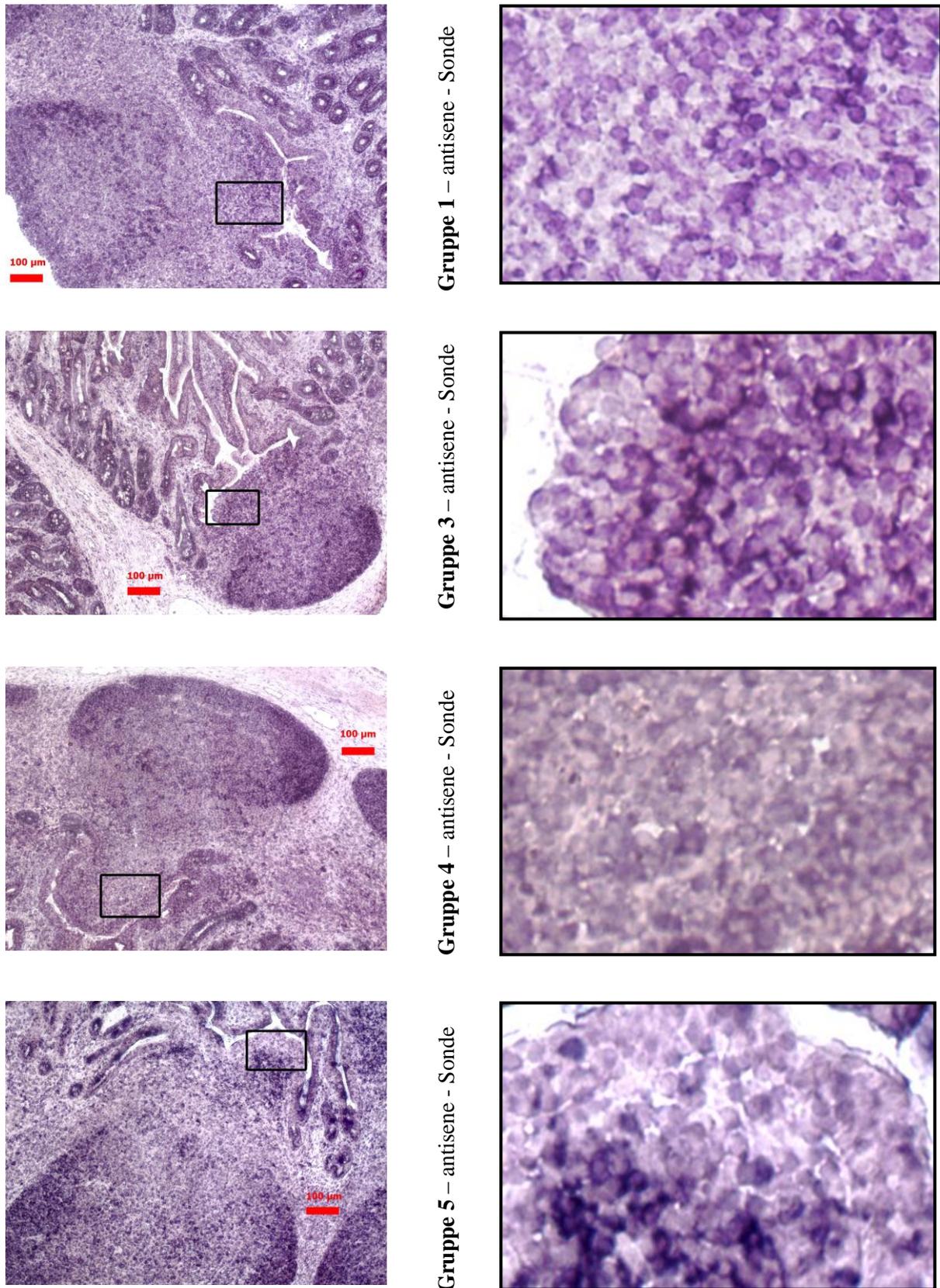


Abbildung 53: Übersicht IL10 mRNA In-situ-Hybridisierung

links: ausgewählte Domareale mit dazugehörigem Follikel aus den Gruppen 1, 3, 4 und 5 Vergrößerung x 100, roter Maßstabsbalken = 100 µm; rechts: vergrößerte Ausschnitte aus den Abbildungen von links; weitere Erklärungen im Text

Die Bilder in der ersten Zeile unter Abbildung 53 zeigen beispielhaft, dass bei den Schweinen aus der Gruppe 1 (28 Lebenstage), im Mantel des Follikels sowie im Domareal deutlich IL10-mRNS⁺ Zellen zu finden sind. Neben Domarealen ohne IL10-mRNS⁺ Zellen konnten in der Gruppe 1 bei zwei von vier Schweinen einzelne Domareale mit eindeutig IL10-mRNS⁺ Zellen dargestellt werden. Weiterhin sind IL10-mRNS⁺ Zellen in den interfollikulären Zonen nachzuweisen.

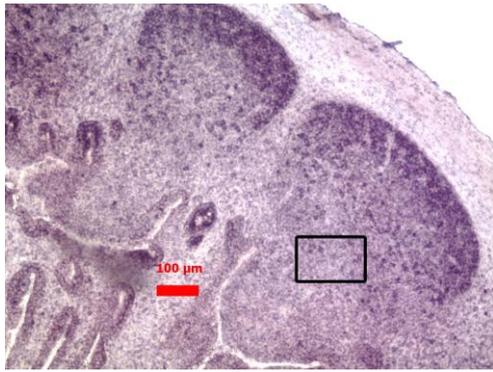
Auch in den Gruppen 2, 3 und 4 mit 39 Lebenstagen sind Follikel mit IL10-mRNS⁺ Zellen, vornehmlich innerhalb der Mantelzone, sowie interfollikulär gelegene IL10-mRNS⁺ Zellen darstellbar. In allen drei Gruppen sind teilweise beieinanderliegende Domareale ohne und mit IL10-mRNS⁺ Zellen in unterschiedlicher Anzahl und Intensität zu finden. Die Bilder in Zeile 2 aus Abbildung 53 zeigen im vergrößerten Ausschnitt recht intensiv IL10-mRNS⁺ Zellen im Domareal eines Schweines aus Gruppe 3, während in Zeile 4, im Ausschnitt eines Domareales von einem Schwein aus Gruppe 4, keine entsprechend positiven Zellen zu finden sind.

In den Proben der 150 Tage alten Tiere aus Gruppe 5 lassen sich, wie in den Bildern aus Zeile 4 der Abbildung 53 dargestellt, in den meisten Follikeln und Domarealen viele stark IL10-mRNS⁺ Zellen nachweisen. Ebenso sind regelmäßig auch interfollikulär gelegene IL10-mRNS⁺ Zellen zu finden.

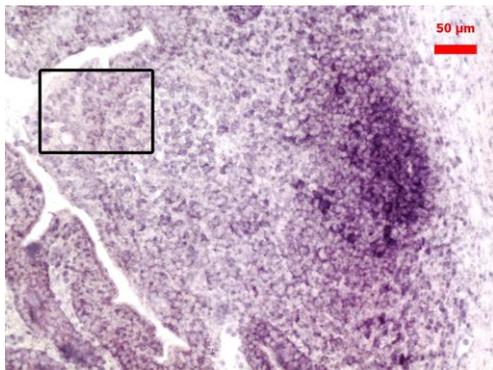
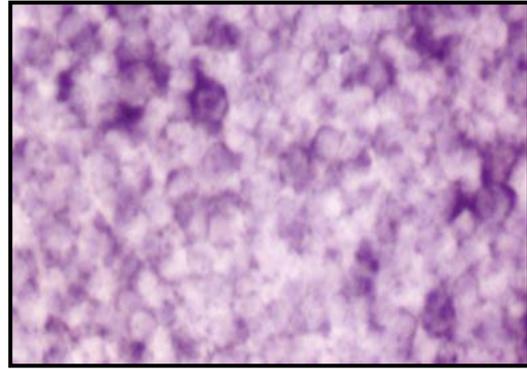
In der Lamina propria der Zotten sind in keiner Gruppe deutlich IL10-mRNS⁺ Zellen detektierbar. Durch ungünstige Signal-Hintergrund-Verhältnisse im Bereich der Krypten und Becherzellen kann das Vorhandensein von IL10-mRNS⁺ Zellen in den entsprechenden Epithelien jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.4.4 Verteilung von IFN γ -mRNS⁺ Zellen

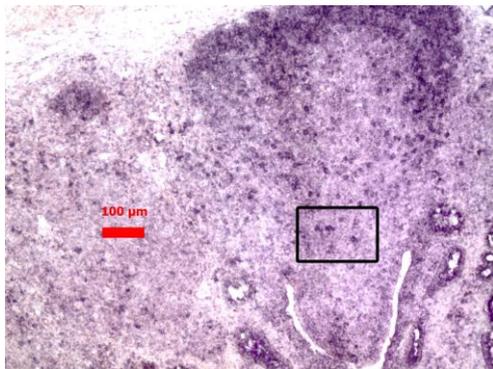
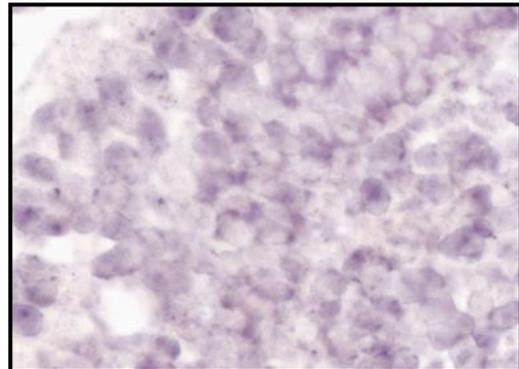
In der folgenden Abbildung 54 spiegeln die per isH dargestellten IFN γ -mRNS⁺ Zellen einen Teil des funktionellen Zustandes in den betrachteten Arealen auf transkriptioneller Ebene wider. Gezeigt sind links Domareale von Schweinen aus den Gruppen 1, 3, 4 und 5 in den Vergrößerungen x 100 und x 200 (100 μ m und 50 μ m Maßstabsbalken) mit und ohne dazugehörigem Follikel. Rechts ist der jeweils markierte vergrößerte Ausschnitt aus dem linken Bild dargestellt.



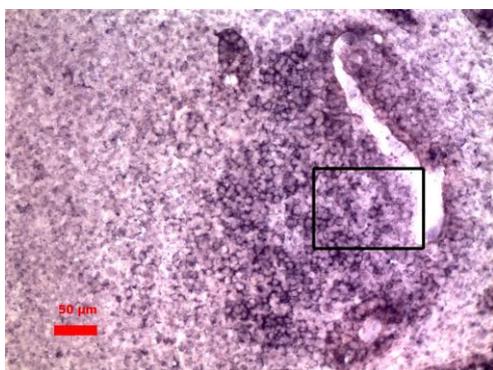
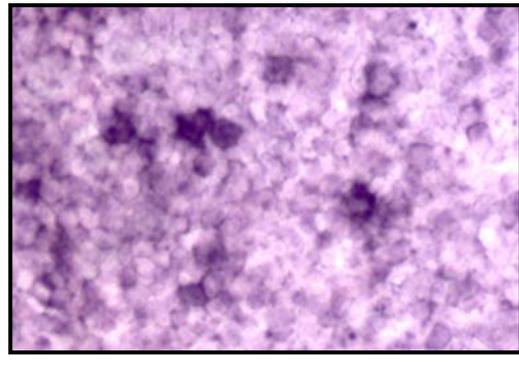
Gruppe 1 – antisense - Sonde



Gruppe 3 – antisense - Sonde



Gruppe 4 – antisense - Sonde



Gruppe 5 – antisense - Sonde

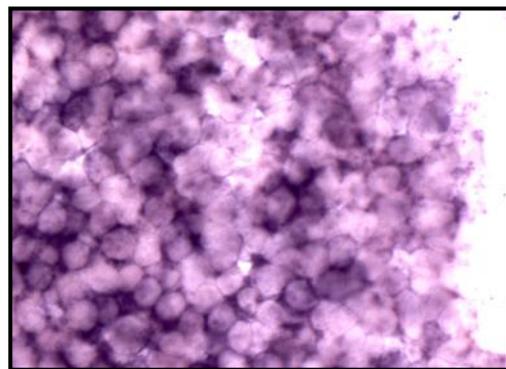


Abbildung 54: Übersicht IFN γ mRNA In-situ-Hybridisierung

links: ausgewählte Domareale mit/ohne dazugehörigem Follikel aus den Gruppen 1, 3, 4 und 5 Vergrößerung x 100 und x 200, roter Maßstabsbalken = 100 μ m bzw. 50 μ m; rechts: vergrößerte Ausschnitte aus den Abbildungen von links; weitere Erklärungen im Text

In den 28 Tage alten Schweinen der Gruppe 1 finden sich IFN γ -mRNS⁺ Zellen regelmäßig in den Mantelregionen der Follikel sowie interfollikulär. Auch einige Domareale in dieser Gruppe besitzen wenige IFN γ -mRNS⁺ Zellen. In Abbildung 54 sind in der Zeile 1 im linken Bild zwei nebeneinander liegende Domareale mit Follikel inklusive IFN γ -mRNS⁺ Zellen gezeigt. Der vergrößerte Ausschnitt rechts stellt einige am Übergang vom Follikel zur Basis des Domareales gelegene IFN γ -mRNS⁺ Zellen dar.

In den 39 Tage alten Schweinen der Gruppen 2, 3 und 4 sind IFN γ -mRNS⁺ Zellen außer im Follikelmantel ebenfalls in vereinzelt Domarealen epithelial wie subepithelial vorhanden (siehe Bild links in Zeile 3, Abbildung 54; Gruppe 4). Die Mehrheit der Domareale ist aber auch hier frei von IFN γ -mRNS⁺ Zellen, wie in Zeile 2 unter Abbildung 54 an einem Ausschnitt aus einem Schwein von Gruppe 3 gezeigt ist.

Die 150 Tage alten Schweine der Gruppe 5 besitzen in den meisten ihrer Domareale (epithelial wie subepithelial) viele deutlich IFN γ -mRNS⁺ Zellen. Dies ist in den beiden Bildern in Zeile 4 von Abbildung 54 exemplarisch dargestellt. Auch in dieser Gruppe existieren entsprechende IFN γ -mRNS⁺ Zellen hauptsächlich in den Mantelzonen der Follikel sowie interfollikulär.

In keiner der Gruppen sind IFN γ -mRNS⁺ Zellen im Bereich der Zotten Lamina propria nachweisbar. Im Bereich der Zottenepithelien kann, vor allem in den Kryptenregionen, aber ein Vorhandensein IFN γ -mRNS⁺ Zellen aufgrund des schlechteren Signal-Hintergrund-Verhältnisses nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

3.4.5 Zusammenfassung isH

Die relativ starken und deutlichen Unterschiede der Anteile immunkompetenter Zellen in den Kompartimenten von Dom- und Zottenareal können auf funktioneller Ebene durch die Darstellung der Zytokin-mRNS nur in gewissen Grenzen ergänzt werden. Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, liegt die meiste Aktivität auf transkriptionaler Ebene in den tiefer gelegenen Bereichen der Follikel und hier, neben wenigen interfollikulär gelegenen positiven Zellen, hauptsächlich in den Gebieten der Mantelzone. Die Region des Follikelmantels mit ihren Zytokin-mRNS-positiven Zellen stellt sich nie ringförmig geschlossen, sondern immer zum Dom hin geöffnet dar. Im Vergleich zu IL-2 sind die IL-4-, IL-10- und IFN γ -mRNS-positiven Zellen in diesem Areal auch bei den jüngeren Schweinen deutlicher darstellbar.

Eindeutige stark positive Signale für alle untersuchten Zytokine gibt es in den Domarealen der 150 Tage alten Schweine der Gruppe 5. Die große Mehrheit der positiven Zellen liegt dabei immer im SED.

Dagegen finden sich nur in einigen Domarealen von 28 Tage alten Schweinen aus der Gruppe 1 nur wenige IFN γ -mRNS⁻ und etwas mehr IL-10-mRNS⁺ Zellen. IL-2- und IL-4-mRNS konnten in dieser Gruppe 1 im Domareal nicht nachgewiesen werden.

In den Gruppen 2, 3 und 4, bei den Schweinen mit je 39 Lebenstagen und unterschiedlichen Einflüssen durch Futter, Sauenmilch und pathogenen *E. coli* Bakterien gibt es in jeder Gruppe vereinzelte Domareale mit einigen deutlich positiven Zellen für die untersuchten Zytokine, die zwischen der Mehrheit von Domarealen ohne entsprechend positive Zellen liegen.

Vergleichbar deutlich Zytokin-mRNS-positive Zellen, wie in den Follikel- und Domarealen, sind in den Zottenarealen des jejunalen Schweinedarmes für keines der untersuchten Zytokine nachzuweisen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass das Vorhandensein Zytokin-mRNS-positiver Zellen in den Kryptenepithelien und epithelialen Bereichen mit vielen Becherzellen, in denen ein schlechtes Signal-Hintergrund-Verhältnis besteht, nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Innerhalb aller Schweinegruppen sowie auch innerhalb einzelner Gewebeschnitte existieren, trotz weitgehend homogener Versuchsbedingungen, Schwankungen in der Anzahl und der Signalintensität der nachweisbar Zytokin-mRNS-positiven Zellen in den untersuchten Kompartimenten. Es können dadurch aktivere und weniger bis nicht aktive Areale abgegrenzt werden.

Folgende Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der isH für alle Zytokin-mRNS-Nachweise abschließend zusammen.

Zytokin	Gruppe	Areal und	Epithel		Epithel	LP	follikulär	interfol.
			SED	Dom-areal				
IFN γ	5		- (++)	+(++)	-	-	+++	+
	4		- (+)	- (+)	-	-	+++	- (+)
	3		- (+)	- (+)	-	-	+++	- (+)
	2		- (+)	- (+)	-	-	+++	- (+)
	1		-	- (+)	-	-	++(+)	- (+)
IL-10	5		- (+)	+(++)	-	-	+++	+
	4		-	- (+++)	-	-	+++	- (+)
	3		-	- (+++)	-	-	+++	- (+)
	2		-	- (+++)	-	-	+++	- (+)
	1		-	- (+++)	-	-	++(+)	- (+)
IL-4	5		-	++(+)	-	- (+)	+++	+
	4		-	- (+)	-	-	+(++)	- (+)
	3		-	- (+)	-	-	+(++)	- (+)
	2		-	- (+)	-	-	+(++)	- (+)
	1		-	-	-	-	++(+)	- (+)
IL-2	5		- (+)	+++	-	-	+++	+
	4		- (+)	+(+)	-	-	+(++)	- (+)
	3		- (+)	+(+)	-	-	+(++)	- (+)
	2		-	-	-	-	+(++)	- (+)
	1		-	-	-	-	+(+)	-

Tabelle 9: Übersicht Zytokin mRNA Transkription in den Kompartimenten (IL-2-, IL-4-, IL-10- und IFN γ -mRNA)

- : nicht nachweisbar; +: 1-9 positive Zellen; ++: ≥ 10 positive Zellen; +++: ≥ 20 positive Zellen pro Kompartiment; Mehrfachangaben und Klammern symbolisieren Differenzen innerhalb der Gruppen sowie auch innerhalb der Gewebeschnitte.

4 Diskussion

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind vor dem Hintergrund zu betrachten, dass sich das intestinale Epithel im Zeitraum von etwa drei Tagen durch mitotische Teilungen der in den Krypten gelegenen epithelialen Stammzellen mit nachfolgender Differenzierung der Zellen während ihrer Wanderung über die Flanken zum apikalen Dom- bzw. Zottenpol permanent erneuert (Altmann und Enesco 1967; Leblond und Walker 1956). Insofern stellt jede einzelne Untersuchung die Momentaufnahme eines zeitlich begrenzten Zustandes dar, während das gesamte System beeinflusst durch verschiedene Umweltfaktoren kontinuierlich umgebaut wird. Es kommt dabei stetig entweder lokal oder systemisch und in unterschiedlichen Geschwindigkeiten zu kleinen oder auch großen Veränderungen. Einflussgrößen dieses Wandels sind z.B. das Eindringen von Viren, Adhärenz oder gar die Invasion von Bakterien, toxische oder mechanische Beanspruchungen, die Zusammensetzung des Futters, die Wasserverfügbarkeit oder der pH-Wert.

Die vorliegende Arbeit liefert in diesem Bedingungsrahmen einen detaillierten qualitativen sowie quantitativen Einblick in die Entwicklung und Verteilung der immunkompetenten Zellen des jejunalen Schweinedarmes während des Absetzens der Ferkel und darüber hinaus. Im Fokus dieser Arbeit standen dabei insbesondere die direkt an das Darmlumen angrenzenden epithelialen Areale der Domregionen der Peyerschen Platten sowie der Zotten (DE und ZE) und die durch eine Basalmembran abgegrenzten direkt darunter gelegenen Kompartimente subepithelialer Dom (SED) sowie die Zotten Lamina propria (LP) im direkten Vergleich zueinander. Insgesamt wurden fünf differente Schweinegruppen sowie drei ausgewählte Einzeltiere miteinander verglichen. Zur Darstellung der relevanten Zellpopulationen wurden von kryokonservierten Proben hergestellte Kryodünn-Serienschnitte mit (mehrfach-) fluoreszenz- und immunhistochemischen Methoden behandelt. Die gewählte Schnittdicke von nur 5µm ermöglicht dabei die Darstellung nur einer Lage der Zellen des Gewebes. Damit wird die Differenzierung einzelner markierter Zellen deutlich erleichtert. Sämtliche derart dargestellten Zellpopulationen wurden für die folgenden quantitativen Auswertungen separat „per Hand“ am Mikroskop ausgezählt. Dadurch konnten alle relevanten Zellen a) korrekt den einzelnen Kompartimenten zugeordnet werden, b) korrekt gegeneinander abgegrenzt sowie c) ggf. einzeln qualitativ beurteilt und augenscheinlich in Bezug zu anderen angrenzenden Zellen gesetzt werden. Unvermeidliche Schwankungen in der Intensität der Färbungen (vor allem der Mehrfach-Fluoreszenzdarstellungen) sowie Probleme mit vielen einzelnen aber eng beieinander

liegenden Zellen, welche von automatisierten Systemen gar nicht, schlecht bzw. nur mit großen Fehlern behaftet ausgewertet werden könnten, sind bei der Zählung „per Hand“ leicht auszugleichen bzw. treten gar nicht erst auf. Nachteilig erweist sich hierbei aber der deutlich höhere Zeitaufwand.

Für die Ermittlung der individuellen Gesamtzellzahlen und als Grundlage für den Vergleich aller Zellzahlen der einzelnen definierten Kompartimente sowie zwischen den einzelnen Tieren und Schweinegruppen war die Normierung der Zellzahlen auf eine Fläche von $10.000\mu\text{m}^2$ nötig, um diese miteinander vergleichbar zu machen. Bestehende Zählweisen wie etwa die Ermittlung von Zellen pro 100 Enterozyten (Chu et al. 1982), Zellen pro mm Basalmembran oder Zellen pro Sichtbereich bei einem bestimmten Vergrößerungsfaktor waren für die spezifische Fragestellung der Arbeit ungeeignet. So wären zum einen alle Enterozyten nur durch eine zusätzliche Markierung darstell- und gegen andere Zelltypen im Epithel abgrenzbar. Zum anderen unterscheidet sich ihr Anteil zwischen Zotten- und Domareal, so dass eine Zählung über die Enterozyten diese Differenzierung nicht hätte abbilden können. Aufgrund der Tatsache, dass das Epithel im Domareal durch in den M-Zelltaschen beherbergte Lymphozyten streckenweise „mehrschichtig“ oder zumindest mächtiger ist als das Epithel im Zottenareal, sind beide Kompartimente nicht direkt miteinander vergleichbar. Zudem ließe sich auf der Basis eines solchen Vorgehens nur schwer ein Bezug zu den größeren subepithelialen Kompartimenten herstellen (Makala et al. 2000). Gleiches gilt darüber hinaus auch für den Bezug der Zellen zur Basalmembran, insbesondere dann, wenn beispielsweise nicht nur eine direkte Assoziation von Zellen in eben diesem Bereich betrachtet werden soll (Bimczok et al. 2006). Eine Auszählung pro Sichtfeld würde auch nur dann sinnvoll erscheinen, wenn jedes gezählte Sichtfeld immer nur eines der Kompartimente repräsentieren würde, was in den Experimenten dieser Arbeit nicht zu verwirklichen war (Bianchi et al. 1992).

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurden für die Darstellung der Mittelwertunterschiede der T-Test eingesetzt sowie darüber hinaus Einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Um zusätzliche Erkenntnisse gewinnen und die untersuchten Einflußgrößen (Alter, Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“) in ihren Wirkungen auf die Kompartimente genauer beschreiben zu können, wurden speziell im Teil 2 der Arbeit, wie in den Abbildungen 4a und 4b übersichtlich dargestellt, zusätzlich lineare Regressionsanalysen durchgeführt (Benmarzouk-Hidalgo et al. 2011; Noshu et al. 2010; Petrescu et al. 2010; Zhu et al. 2009). Voraussetzung für derartige Analysen ist eine Normalverteilung der Daten. Während nicht-parametrische Tests auf Normalverteilung, wie etwa der Kolmogorov-Smirnov-Test, stets auf eine perfekte Normalverteilung hin prüfen, liegen mittlerweile einige Simulations-

studien vor, die prüfen, ab welchen Werten von einer extremen Abweichung von der Normalverteilung auszugehen ist, die verzerrte Modellschätzungen nach sich ziehen kann. Dabei wird von Grenzwerten ausgegangen, die eine Schiefe der Verteilung $>|2|$ und eine Kurtosis $>|7|$ als problematisch einstufen (Chou et al. 1991; Finch und West 1997). Die in die Analyse einbezogenen Daten zeigten vor diesem Hintergrund keine extreme Abweichung von der Normalverteilungsannahme.

Neben der Datenerhebung zur qualitativen und quantitativen Darstellung der Entwicklung und Verteilung von immunkompetenten Zellen im jejunalen Schweinedarm wurden in dieser Arbeit auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt, um den Immunstatus der beteiligten Zellen in den betrachteten Gewebeabschnitten und Kompartimenten **in situ** demonstrieren zu können. Zu diesem Zweck wurden für den Nachweis funktioneller regulatorischer Prozesse auf Transkriptionsebene eine Reihe (DIG-markierter-) RNS-Sonden kreiert sowie entsprechende Plasmide hergestellt und kloniert. In diesem Zusammenhang musste festgestellt werden, dass trotz intensiver Bemühungen, den Prozess der Sondenherstellung durch Standardisierungen soweit als möglich zu optimieren, qualitative sowie quantitative Schwankungen der Sondenqualität nicht gänzlich zu vermeiden waren. Durch entsprechende qualitative Absicherungen, interne Kontrollen und Vergleiche von Probe-In-situ-Hybridisierungen der hergestellten Sonden konnte ein vertretbarer Standard etabliert werden. Zudem wurden möglichst mehrere verschiedene Gewebeschnitte unterschiedlicher Gruppen, inklusive Kontrollen, in einem Ansatz mit derselben Sondencharge durchgeführt, um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Aufgrund eines nicht eliminierbaren Hintergrundsignales, vor allem im Bereich von Becherzellen und in den Kryptenregionen, konnte nicht immer ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis dargestellt werden, so dass eine korrekte Auswertung hier nicht möglich war und das Vorhandensein Zytokin-mRNS-positiver Zellen in diesen Arealen nicht abschließend beurteilt werden konnte. Im Rahmen der Untersuchungen (isH) wurde zudem festgestellt, dass sich die Schnittdicke von $5\mu\text{m}$, welche für die Fluoreszenz- und Immunhistochemische Darstellung ideal war, eher als nachteilig herausgestellt hat, da hier nur sehr schwache Signale erhalten werden konnten. Als vorteilhaft für die Signalstärke hat sich eine Schnittdicke von $12\mu\text{m}$ erwiesen, welche im Teil 3 der Arbeit daher konsequent beibehalten wurde. Nachteil hierbei ist die Tatsache, dass die Zelldichte im Schnitt höher liegt und bildliche Darstellungen der in-situ-Hybridisierungen teilweise etwas unscharf erscheinen können.

In den folgenden Abschnitten der Diskussion wird auf die einzelnen Marker und die dadurch repräsentierten Gewebebestandteile sowie Zellpopulationen spezifisch eingegangen. Dabei

werden die Ergebnisse der Arbeit in funktionelle, physiologische Abläufe eingeordnet und die ermittelten Daten zum aktuellen Forschungsstand in Beziehung gesetzt.

Eine Hauptfunktion des GALT ist die u.U. lebenswichtige Unterscheidung zwischen harmlosen und potentiell gefährlichen Antigenen. Dafür stehen dem Organismus schon auf der ersten Verteidigungsstufe der angeborenen Immunität verschiedene Erkennungssysteme zur Verfügung. Neben einer ganzen Reihe von Toll-like-Rezeptoren (TLR), die in der Lage sind Bakterien, Viren, Pilze sowie Protozoen zu erkennen, existieren mit den NOD-like-Rezeptoren (NLR), welche bakterielle Produkte erkennen können und RIG-like-Rezeptoren (RLR), die virales Material detektieren, synergistisch wirkende Systeme, deren intrazellulär wirkende Schlüsselfaktoren beispielsweise NF κ B, MAP-Kinasen und Caspase 1 sind. Auf dieser Ebene bestehen bereits regulative Mechanismen, die die Balance zwischen positiver und negativer Regulation des Immunsystems steuern und eine Immun-Homöostase erhalten können. Der Erkennung von Antigenen mit pathogenem Potential muss entsprechend eine Immunantwort folgen. So wird z.B. TLR 5 vorwiegend in die Lamina propria abgegeben, wo es dann bakterielles Flagellin detektieren kann, was wiederum die Bildung von IgA-bildenden Plasmazellen induziert und die Entwicklung von antigenspezifischen Th1 Zellen fördert (Creagh und O'Neill 2006; Kanneganti et al. 2007; Kelly und Conway 2005).

Eine weitere lange bekannte Schnittstelle zum adaptiven Immunsystem stellt die Sekretion von Interleukin-1 dar. Es ist beteiligt an der Induktion lokaler Entzündungsreaktionen sowie an der Entstehung von Fieber. Außerdem wird in den Endothelzellen die Bildung von Selektinen stimuliert und so auch die Diapedese der in der Blutbahn zirkulierenden Leukozyten ermöglicht. Durch eine Entzündungsreaktion können Endothelzellen verdrängt und die Basallamina sowie das umliegende Bindegewebe geschädigt werden. Unter anderem sind auch die M-Zellen Bildungsorte für Interleukin-1 (Pappo und Mahlman 1993; Shirkey et al. 2006; Vezina et al. 1995).

Sind keine pathogenassoziierten Merkmale und Virulenzfaktoren vorhanden, auf welche die oben genannten Systeme reagieren können, wie dies bei Nahrungsmittelbestandteilen im Allgemeinen sowie bei der kommensalen Mikroflora zumindest zum Teil der Fall ist, dürfen entzündliche Prozesse nicht eingeleitet, sondern müssen abgeschaltet bzw. herunterreguliert und durch Toleranzmechanismen ersetzt werden. Dies geschieht, den durch die Umweltfaktoren vorgegebenen Umständen entsprechend, im Wechselspiel mit bzw. in der Weiterführung zur zytokinregulierten adaptiven Immunantwort bzw. Toleranzinduktion. Dabei werden die komplexen regulatorischen Systeme auf der einen Seite durch den Wirt kontrolliert sowie anderer-

seits durch die mikrobiellen Einflüsse im positiven wie im negativen Sinne manipuliert (Kelly et al. 2005).

Das Absetzen der Ferkel vom Muttertier geht mit einschneidenden Veränderungen für den Organismus und großen Modifikationen im Darmlumen einher. Neben den in dieser Arbeit speziell ausgewählten und untersuchten Einflussgrößen Alter, Futter, Sauenmilch sowie der Reaktion auf den pathogenen Erregerstamm *E. coli* „Abbottstown“ existieren noch viele weitere bei lebenden Tieren nicht auszuschließende Einflussgrößen, welche letztendlich in der Gesamtbetrachtung ebenfalls berücksichtigt werden müssen (De Walle et al. 2010; Gutierrez 2010; Hühn et al. 2007; Maresca et al. 2008; Reiners et al. 2007; Zabielski et al. 2008).

Ein wichtiger Punkt sowie eine Voraussetzung für die Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit war zunächst die Visualisierung der Basalmembran als diejenige Komponente, welche die zum Lumen hin gelegenen epithelialen Kompartimente (Dom- und Zottenepithel; DE und ZE) von den tiefer gelegenen Kompartimenten subepithelialer Dom (SED) und Zotten Lamina propria (LP) als natürliche Grenze trennt. Für die Darstellung der Basalmembran wurde der monoklonale anti-Laminin-beta 1 Antikörper (Klon LT3, siehe Tabelle 10 im Anhang) eingesetzt. Die Basallamina ist Bestandteil der Basalmembranen und deren Laminine sind große heterotrimere, nichtkollagene Glykoproteine, die ubiquitär in derselben vorkommen. Sie interagieren miteinander und bilden so mehr oder weniger kontinuierliche Membranen. Außerdem sind sie assoziiert mit Entactin (Nidogen), Kollagen Typ IV und dem Proteoglycan Heparansulfat (Eriksen et al. 1990; Yamamoto et al. 2008).

Wie in den Abbildungen 6 (Domareal) und 7 (Zottenareal) des Ergebnisteiles (3.1.2) veranschaulicht, lässt sich die Basallamina insgesamt sehr gut darstellen. Dabei fällt augenscheinlich auf, dass die Laminin⁺-Strukturen im Dombereich insgesamt schwächer ausfallen und im Vergleich mit dem Zottenareal häufigere sowie größere Unterbrechungen aufweisen. Dieser Befund ist in ähnlicher Weise auch bei anderen Tieren zu finden (McClugage et al. 1986; Neutra et al. 2001; Takeuchi und Gonda 2004). Auch dem follikelassoziierten Epithelium der Kaninchen fehlen die subepithelial gelegenen Myofibroblasten, welche unter dem Zottenepithel eine Scheide bilden. Außerdem ist auch bei Ratten und Affen die Basallamina des follikelassoziierten Epitheliums vom Dom gegenüber den Zotten durch fehlendes Laminin-2 und eine höhere Porösität gekennzeichnet. Die vorhandenen Löcher sind in Zotten- sowie Dombereich unterschiedlich verteilt und in der Nähe vieler M-Zellen größer. Die Existenz der Poren in der Basalmembran korrespondiert mit der Passage immunkompetenter Zellen in die Taschen der M-Zellen bzw. in das Epithel der Zotten. Dies ist auch auf den oben angegeben

Abbildungen nachvollziehbar (McClugage et al. 1986; Neutra et al. 2001; Takeuchi und Gonda 2004). Weil das in dieser Arbeit dargestellte Laminin-beta 1 ubiquitär und somit auch in den Basallaminas der Gefäßwände vorkommt, können auch die multiplen Anfärbungen in der Lamina propria des SED und der Zotten erklärt werden. Es dürfte sich hierbei hauptsächlich um die Basallaminas der subepithelial gelegenen Gefäßnetze handeln. In den gefäßlosen epithelialen Komponenten kommen derartige zusätzliche Anfärbungen dementsprechend so nicht vor.

Bemerkenswert und zu beachten ist auch die unterschiedliche Lage der in den epithelialen Kompartimenten zusätzlich dargestellten immunkompetenten Zellen in ihrem Bezug zur Basalmembran. Es ist deutlich eine intraepithelial zwischen den Enterozyten liegende Zellschicht (nukleares Level) ohne Kontakt zur Basallamina von einer etwas tiefer unterhalb der Enterozyten gelegenen (subnuklearen, intraepithelialen) Schicht mit deutlichem Kontakt zur Basallamina zu unterscheiden. Bereits 1982 wurde durch Chu et al. eine Einteilung der epithelialen Lymphozyten nach ihrer Lage im Bezug zu den Epithelzellen (subnukleares, nukleares und supranukleares Level) geschaffen (Chu et al. 1982). Ähnliche Verhältnisse beschreibt Vega-Lopez auch 1993, wobei sich die „apikal im Epithel“ (= intraepithelial zwischen den Enterozyten und supranuklear davon) gelegenen Zellen $CD2^+ CD4^- CD8^-$ darstellen. Die subnuklear an der Basalmembran gelegenen Zellen exprimieren dagegen $CD8^+$ (Vega-Lopez et al. 1993). Wie die Dreifachfluoreszenzbilder mit der Darstellung von $CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen illustrieren, stellen sich auch hier zwei zu differenzierende intraepitheliale Zellpopulationen dar. Während sich vor allem im Zottenepithel die intraepithelial zwischen den Enterozyten liegenden Zellen fast ausschließlich $CD3^+$ darstellen, sind die tiefer subnuklear gelegenen intraepithelialen Zellen mit Kontakt zur Basallamina außerdem deutlich $CD8^+$. Die klar erkennbaren Intensitätsunterschiede in der $CD3$ -Darstellung lassen sich darauf zurückführen, dass die Dichte von $CD3$ auf $CD2^+$ und $CD8^+$ Zellen relativ gering und heterogen ist, während sie auf $CD2^-$ und $CD8^-$ Zellen höher und eher homogen erscheint (Pescovitz et al. 1998a; Piriou-Guzylack und Salmon 2008; Yang et al. 1996). Da diese Beobachtungen in der Arbeit nur beispielhaft dargestellt wurden, fanden diese Differenzen bei der Auszählung intraepithelialer Lymphozyten im DE und ZE in der Folge keine Berücksichtigung. Eine ähnliche Trennung differenter Zellen konnte innerhalb des Domepithels nicht festgestellt werden. Gleichwohl markiert auch hier die Basallamina deutlich die Grenze zwischen den Kompartimenten und trennt dabei Areale mit unterschiedlichen Konzentrationen von differenten immunkompetenten Zelltypen gegeneinander ab. Von der Basallamina als

Grenze zur Lamina propria hin betrachtet, kommt es augenscheinlich vor allem im Zottenareal eher zu einer geringgradigen Akkumulation von immunkompetenten Zellen in Richtung Basallamina als zum Zentrum hin. Im subepitheliale Dom ist dieser Effekt offensichtlich wesentlich geringer und die immunkompetenten Zellen erscheinen eher gleichmäßig verteilt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Gesamtzellzahlen der einzelnen jejunalen Kompartimente sind hier als Grundlage für die Angabe von Relationen weiterer Zelltypen verwendet worden und können so auch künftig ein adäquates Bezugssystem für weitere Forschungen darstellen. Die repräsentativen Gesamtzellzahlen aus dieser Arbeit verdeutlichen, wie sehr sich die Zelldichte in den verschiedenen Kompartimenten, trotz ihrer Nähe zueinander, z.T. grundlegend unterscheidet. Dieser Umstand bleibt in vielen Studien völlig unberücksichtigt.

Unabhängig von der Darmlänge lassen sich für die so beobachteten Zellen „kompartimentspezifische Konzentrationsmaße“ ermitteln und letztendlich in unterschiedlichen Studien vergleichen. Die Ergebnisse sind hier also sehr spezifisch für den jejunalen Schweinedarm und können nicht auf andere Bereiche übertragen werden. Zum einen ändert sich die Zusammensetzung der Zellen in den unterschiedlichen Darmabschnitten und zum anderen sind die Abschnitte morphologisch unterschiedlich gestaltet sowie individuell unterschiedlich lang (Barman et al. 1997; Garside et al. 2004; Larsen und Landsverk 1986; Pabst 1987; Pabst und Rothkötter 2006; Pond und Mersmann 2001). Die relative Verteilung der von Pabst und Trepel geschätzten Gesamtanzahl von 320×10^9 Lymphozyten im gesamten Lymphsystem bzw. den pro Tag in den mesenterialen Lymphknoten 7×10^9 neugebildeten Lymphozyten stellt sich nach den durchgeführten Labelling- und Migrationsexperimenten für den Darmbereich wie folgt dar. In die Dünndarmmukosa wandern etwa 38,6-55,4% der Lymphozyten, auf die PP entfallen 1,2-2,7% der Zellen. Im Colon halten sich 2,1-3,2% der Lymphozyten auf, wobei in den mesenterialen Lymphknoten 14,2-24,8% der untersuchten Zellen wiederzufinden sind. Die restlichen Zellen verteilen sich in dieser Untersuchung auf Milz, Knochenmark, Blut, Leber, Lunge, inguinale und zervikale Lymphknoten sowie die Tonsillen (Pabst und Trepel 1979). Kenntnisse darüber, in welchem Zeitrahmen sich welche Zielzellen mit welcher Dauer in den Kompartimenten tatsächlich aufhalten existieren bislang jedoch nicht. Darüber hinaus kann in diesem Zusammenhang auch die Frage nach dem Einfluss von Zottenlänge und Kryptentiefe auf die Zellzahlen gestellt werden. Zottenlänge und Kryptentiefe werden u.a. durch die lokal in der Lamina propria gelegene und vegetativ innervierte Lamina muscularis mucosae reguliert. Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass beide Eigenschaften nicht durch Probiotikagabe wie z.B. *Enterococcus faecium* affektiert werden (Scharek et al. 2005). Ande-

re Faktoren wie z.B. psychologischer Stress besitzen demgegenüber deutliche Auswirkungen auf die Zottenlänge, die Kryptentiefe, die Apoptoserate sowie die Enzymfunktionen und damit auch auf die Zellzahlen und die Darmgesundheit (Boudry et al. 2007).

Im Teil 1 dieser Arbeit wurden auch die M-Zellen in den Domepithelien der Peyerschen Platten des jejunalen Schweinedarmes untersucht. Nachgewiesenermaßen exprimieren M-Zellen selbst neben den Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR4 auch den TLR9, was darauf schließen lässt, dass sie über die LPS-Detektion hinaus auch durch die Möglichkeit der Erkennung von bakteriellen bioaktiven Oligonukleotiden und ihren engen Kontakt zu dem konduktiven Teil des Immunsystemes initial an der Immunantwort beteiligt sind (Brayden et al. 2005; Shimamoto et al. 2005; Tohno et al. 2005; Tyrer et al. 2006). Sie unterscheiden sich von Epithelzellen durch eine fehlende hochorganisierte „brush border“ (Mikrovilli) mit ihrer Glykokalyx samt digestiver Enzyme. Sie können dafür aber zur Antigentranslokation mehr Transportsysteme, wie z.B. Clathrin-vermittelte-Endozytose, Aktin-abhängige-Phagozytose, Flüssig-Phase-Pinozytose realisieren (Neutra et al. 2001; Niedergang und Kweon 2005). Die M-Zellen können mit immunkompetenten Zellen besetzte Taschen besitzen und kommen augenscheinlich am häufigsten und ausgeprägtesten an den Flanken der Domareale vor. Speziell das follikel-assoziierte Epithel entwickelt sich nach Makala ab Tag 10 von einer ein- zu einer vielschichtigen Struktur (Makala et al. 2000). Dieser Befund scheint insbesondere auf die mit Lymphozyten beladenen Taschen der M-Zellen zurückzuführen zu sein, da sich die immunkompetenten Zellen in Bezug zu den Zellkernen der M-Zellen hauptsächlich in den Taschen auf der luminalen Seite befinden (supranuklear). Die immunkompetenten Zellen können aber auch direkt „unterhalb“ der M-Zellen (subnuklear) sowohl auf der epithelialen Seite als auch auf der dem subepitheliale Dom zugewandten Seite der Basalmembran liegen (siehe Abbildung 15).

Die in dieser Arbeit detektierten immunkompetenten Zellen im Bereich der M-Zellen waren positiv für mindestens einen der Marker CD45, CD2, CD4; CD8, MHCII DR, Ig oder SWC3. Ein augenscheinlich verstärkter Bezug zu den M-Zellen ließ sich für CD45⁺-, CD2⁺-, CD8⁺- sowie MHCII DR⁺- und SWC3⁺-positive Zellen feststellen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass eine aktive Rolle der M-Zell-assoziierten Lymphozyten bei Induktion und Regulation der Immunantwort naheliegend ist, da ihre Anzahl nach Applikation von Bakterien zunimmt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass unter derartigen Umständen große Mengen von Lymphozyten per M-Zell-vermittelter Diapedese auch ins Darmlumen übertreten können (Makala et al. 2004; Regoli et al. 1994). Die M-Zellen können

daher als spezielle Verlängerung der Keimzentren der Follikel angesehen werden, da sich ihr funktioneller Einfluss durch B- und T-Zell-Interaktionen letztlich auch auf die Vorgänge im Keimzentrum zur Differenzierung und zum Überleben von B-Zellen auswirkt (Farstad et al. 1994; Yamanaka et al. 2001). Ältere Kanülierungsexperimente weisen die jejunalen PP schon länger als Quelle von spezifischen IgA Plasmablasten aus (Husband und Gowans 1978; Husband und Lascelles 1974).

Eine Beteiligung der Immunglobulin-positiven B-Zellen an der Entwicklung von Immunantworten stellt sich auch durch die in dieser Arbeit festgestellten deutlichen quantitativen Änderungen dar. Während in den untersuchten Kompartimenten des Zottenareales gar keine Ig⁺ B-Zellen nachzuweisen waren und ihr Anteil im Domepithel bei maximal 1% liegt, erreicht ihr Anteil im subepithelialen Dom beim 28 Tage alten Schwein 1 6%. Davon unterscheidet sich der Anteil beim 39 Tage alten und abgesetzten Schwein 2 mit 10% deutlich, während das 150 Tage alte Schwein 3 nur noch 3% Ig⁺ B-Zellen aufweist. Die erhöhten Werte des Schweines 2 lassen sich vermutlich auf die größeren Anforderungen an immunmodulatorische Anpassungen während des Absatzprozesses zurückführen. Vor diesem Hintergrund ließen sich die geringeren Zellanteile beim 150 Tage alten Schwein 3 als eine bereits erfolgte Anpassung an die vorliegenden Umweltfaktoren interpretieren.

Bemerkenswert ist in der Beobachtung von Schwein 1 das Auftreten von luminal liegenden Ig⁺ Konglomeraten in engstem Bezug zu den Zytokeratin 18⁺ M-Zellen. Da diese deutlichen Konglomerate so nur beim gesäugten Schwein 1 vorkommen, liegt es nahe, dass es sich um reichlich freie Antikörper handelt, die mit der Sauenmilch aufgenommen wurden und u.U. an Fc-Rezeptoren der M-Zellen binden oder anderweitig eine Affinität zu den M-Zellen besitzen. Derartige Ig⁺ Konglomerate konnten beim Schwein 1 außerdem in einigen Krypten nachgewiesen werden. Eventuell spielen sie eine Rolle beim Schutz der dort liegenden Stammzellen und möglicherweise ist dieser Prozess (bzw. dessen Nachweisbarkeit im Rahmen dieser Arbeit) auf die Lebensphase begrenzt, in der das Individuum noch keine eigenen adaptiven Immunantworten mit entsprechender IgA-Sekretion bewerkstelligen kann. Selektive Adhärenz von luminalem IgA Immunglobulinen an die IgA-Rezeptoren der PP M-Zellen wurde von Mantis et al. 2002 in Loop-Versuchen am Mäusedarm gezeigt. Den Beobachtungen in dieser Arbeit entsprechende Immunglobulinablagerungen auf den M-Zellen konnten auch im humanen Darm detektiert werden. Eine vergleichbare Bindung von IgG und IgM an M-Zellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Favre et al. 2005; Mantis et al. 2002).

Es wurde außerdem am Modelltier Kaninchen gezeigt, dass enteroadherente und Diarrhoe auslösende *E. coli* eher an die M-Zellen als an die Enterozyten von Kaninchen PPs adherieren (Inman und Cantey 1983).

Zudem nutzen Pathogene mit noch erheblicherem Schädigungspotential (z.B. *Salmonella typhimurium*; *Yersinia pseudotuberculosis*) diese (erleichterte) Eintrittspforte in den Organismus (Clark et al. 1998a; Clark et al. 1998b).

Der in dieser Arbeit benutzte Marker gegen das Intermediärfilament Zytokeratin 18 stellt die M-Zellen im (Landrasse) Schwein zuverlässig dar (Gebert et al. 1994a; Gebert et al. 1996). Zusätzlich werden auch die Becherzellen visualisiert. Da bei den Schweinen in den follikelassoziierten Epithelien der Domareale keine Becherzellen und umgekehrt in den Epithelien der Zottenareale keine M-Zellen vorkommen und Becherzellen gegen M-Zellen morphologisch sehr gut abgrenzbar sind, stellt dies kein Problem dar.

Immunfluoreszenz-Färbungen auf schweinespezifischen untransformierten IPEC 1/2-Zellen sowie auf Dünnschnittpräparaten von kryokonserviertem jejunalem Darmgewebe frisch geborener Ferkel offenbarten, dass auch die Epithelzellen neugeborener Ferkel und die daher abgeleiteten IPEC 1/2-Zellen Zytokeratin 18 positive Zellskelettstrukturen besitzen (Bimczok et al. 2008; Diesing et al. 2010; Nossol et al. 2011; Pinton et al. 2010; Rasschaert et al. 2010; Schierack et al. 2006; Sonntag et al. 2005). Die Weiterentwicklung der IPEC -Zellkulturen als Air-liquid-Interface einhergehend mit morphologischer und funktioneller Differenzierung hin zu einer reifer erscheinenden Darmepithelzelllinie geht auch mit einer augenscheinlich quantitativen Verminderung der Zytokeratin 18-Expression einher (Nossol et al. 2011; Greco et al. 2010; Pezzulo et al. 2011; Ramsingh et al. 2011). Diese Erkenntnisse unterstützen die Annahme, dass sich die Epithelzellen sowie die M- und die Becherzellen des jejunalen Schweinedarmes aus gemeinsamen Vorstufen entwickeln könnten (Gebert et al. 1999; Mach et al. 2005). In den ausdifferenzierten M- und Becherzellen (sowie auch in den IPEC-Zellkultursystemen) könnte die außergewöhnliche Form der Zellen eine Determinante für die Expression der Zellskelettkomponente Zytokeratin 18 sein.

Experimente mit der bakteriell induzierten Aufnahme von Latexpartikeln aus dem Darmlumen durch die M-Zellen zeigen, dass eine erhöhte Partikelaufnahme höchstwahrscheinlich nicht durch eine Neubildung von M-Zellen, sondern durch eine Steigerung der Kapazität vorhandener M-Zellen erreicht wird (Gebert et al. 2004). Die quantitativen Daten der in dieser Arbeit dargestellten Zytokeratin 18⁺ immunfluoreszenzmarkierten M-Zellen unterstützen diese Sichtweise. Der Anteil an Zytokeratin 18⁺ M-Zellen bewegt sich bei allen drei getesteten Schweinen, trotz der großen individuellen Differenzen im Alter und der unterschiedlichen

Futter- bzw. Sauenmilchaufnahme, zwischen 31 bis 35 Zellen/10.000 μm^2 bzw. bei 31 bis 35% der Zellen im jejunalen Domepithel. Bemerkenswert ist, dass beim seit zehn Tagen abgesetzten Schwein 2 der M-Zellanteil im jejunalen Domepithel zwar mit 31% am geringsten ist, gleichzeitig aber der Anteil der ebenfalls Zytokeratin 18⁺-Becherzellen im jejunalen Zottenepithel dagegen deutlich höher ausfällt als bei den beiden anderen Schweinen und sich um ca. 50% signifikant von diesen unterscheidet. Dieser Befund könnte die Reaktion auf die veränderten Bedingungen im Lumen und die Erhöhung des Schutzes der Darmwand durch eine vermehrte und veränderte Mukusproduktion widerspiegeln. Im Zusammenhang mit dem Prozess des Absetzens wurden auch veränderte Glykosylierungsmuster des Mukus als Anpassung an die Modifizierung der mikrobiellen Besiedelung im Bereich der Becherzellen und apikalen Membranen nachgewiesen (Hedemann et al. 2007). Wie Atuma (2001) zeigt, besteht der Mukus aus zwei Schichten, wobei eine kaum zu entfernende dünnere Schicht den epithelialen Zellen direkt anliegt und eine zweite in ihrer Dicke noch variabelere und außerdem beweglichere Mukuslage zum Lumen hin obenauf liegt. Dabei ist die Mukusschicht im jejunalen Bereich mit durchschnittlich nur 123 μm am dünnsten und im mit wesentlich mehr Bakterien besiedelten Colon im Durchschnitt sogar 830 μm dick. Der Anteil der Becherzellen ist im Colon am größten. Die Tatsache, dass die Mukusschicht im jejunalen Bereich am dünnsten ist, bildet eine der Grundlagen für die höhere Chance, dass luminale hier noch unverdaute Antigene in verstärktem Maße in Kontakt mit den M-Zellen und somit dem induktiven Part des Immunsystems treten können. Dieser Umstand war unter anderem ein Grund für die Auswahl des Jejunum als Zielgewebe in dieser Arbeit (Atuma et al. 2001). Die Glykoproteine der Mukusschicht wirken sehr adherent auf bakterielle Bestandteile und andere luminal existierende Antigene. Dieser Effekt wird verstärkt, intensiviert und spezialisiert durch die zusätzliche Anreicherung mit antimikrobiell wirkenden Proteinen, wie beispielsweise Lysozym, Immunglobulinen hauptsächlich vom Typ A (siehe oben) und immunkompetenten Zellen. Zudem befördert die Peristaltik des Darmrohres den luminalen Inhalt samt beweglichem Mukus unweigerlich nach aboral und damit auch weg von der epithelialen inneren Körperoberfläche, wodurch ein grundsätzlicher angeborener sowie z.T. auch erworbener Schutzmechanismus realisiert wird. Durch entzündliche Prozesse, wie beispielsweise bei *H. pylori* Infektionen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, wird die Mukusschicht pathologisch verändert und kann ihre Schutzfunktion nicht mehr korrekt erfüllen (Brownlee et al. 2007; Hedemann et al. 2007; Macpherson und Uhr 2004; Magnusson und Stjernstrom 1982; Nochi und Kiyono 2006).

Die in dieser Arbeit untersuchten MHCII DR⁺ antigenpräsentierenden Zellen sind in den Kompartimenten von Dom und Zotten in sehr unterschiedlichen Anteilen enthalten. Während im Zottenepithel des jejunalen Schweinedarmes keine MHCII DR⁺ Zellen nachgewiesen werden konnten, erreichen sie im Domepithel dagegen einen Anteil von 18-23%. Der Anteil pro 10.000µm² beträgt in den tiefer gelegenen Kompartimenten SED 100-138 MHCII DR⁺ Zellen und in der Zotten-LP mit 44-73 nur halb soviel MHCII DR⁺ Zellen. Durch die 30% geringere Gesamtzellzahl in der Zotten-LP „relativiert“ sich das Verhältnis auf 67-79% im SED sowie 49-70% in der Zotten-LP. Nur im 150 Tage alten Schwein 3 ist der Unterschied in den Kompartimenten SED und LP deutlich geringer. Diese Tatsache könnte auch hier, wie im Falle der Ig⁺ B-Zellen, als eine abgelaufene Anpassung an die gegebenen Umweltfaktoren eines ansonsten klinisch gesund erscheinenden Schweines interpretiert werden. Zudem können im SED Überlappungen der Populationen durch sowohl MHCII DR- als auch Ig-positive B-Zellen eine Rolle spielen.

Ein gegenteiliger Effekt tritt gleichzeitig in der Zotten-LP durch die Untersuchung der myeloiden SWC3⁺ Zellen zu Tage. Hier unterscheiden sich die Anteile dieser Zellen in der Zotten-LP zwischen den drei Schweinen signifikant. So liegen beim abgesetzten 39 Tage alten Schwein 2 nur 6%, beim 28 Tage alten Schwein 1 27% und beim 150 Tage alten Schwein 3 immerhin 35% myeloide SWC3⁺ Zellen vor. Dabei bleiben die Zellanteile in den anderen Kompartimenten (ZE ≤ 1%; DE 2-5%; SED 33-47%) ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den untersuchten Schweinen. Dieser Effekt, der sich nur in der Zotten-LP nachweisen lässt, kann daher auf die Einflüsse, die mit dem Absetzen in Zusammenhang stehen zurückgeführt werden.

Die nachgewiesenen CD45⁺ Leukozyten beinhalten alle Lymphozyten inklusive der natürlichen Killerzellen, den Granulozyten sowie der Zellen des Monozyten-Makrophagensystemes, was im Folgenden die Differenzierung von weiteren Subtypen möglich macht. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, lassen sich auf der Ebene der Leukozyten innerhalb der analysierten Kompartimente insgesamt keine nennenswerten Unterschiede zwischen den im Teil 1 untersuchten drei Schweinen (28-39-150 LT) feststellen. Während im subepithelialen Dom wie in der Zotten Lamina propria der relative Anteil an CD45⁺ Leukozyten bei 93-99 % liegt, lässt sich zwischen dem Domepithel mit 33-44% und dem Zottenepithel mit nur 17-24% ein deutlicher Unterschied feststellen.

Genauere Untersuchungen der Subfraktionen verweisen ebenfalls auf ausgeprägte Unterschiede. Diese konnten mittels Immunfluoreszenzmarkierung von T-Zellen deutlich gemacht

werden, die durch das in Adhäsion und Aktivierung von T-Zellen involvierte Oberflächenmolekül CD2 oder mittels Antikörpern gegen die extrazelluläre CD ϵ Domäne von T-Zellen mit $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren erfolgte. Die CD2⁺ Zellen beinhalten neben den CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ doppelt positiven, CD4⁻/CD8⁻ doppelt negativen TcR- $\alpha\beta$ -T-Zellen, im Gegensatz zu den CD3⁺ Zellen, zusätzlich die natürlichen Killerzellen und die TcR- $\gamma\delta$ -T-Zellen (Piriou-Guzylack und Salmon 2008). In allen Schweinegruppen und Kompartimenten, mit Ausnahme im DE des 39 Tage alten abgesetzten Schweines aus Teil 1 der Arbeit, ist die Anzahl an CD2⁺ Zellen folgerichtig höher als die Anzahl an CD3⁺ Zellen. Aus dieser Arbeit heraus ist nicht nachzuvollziehen, in welchen Anteilen die Differenz der CD2⁺ Zellen zu den CD3⁺ Zellen den natürlichen Killerzellen bzw. den $\gamma\delta$ -T-Zellen zuzuordnen ist. Bemerkenswert ist daneben der Umstand, dass nur im Zottenepithel des abgesetzten 39 Tage alten sowie des 150 Tage alten Schweines die Population der CD2⁺ Zellen etwa doppelt so groß ist wie die Population der CD45⁺ Zellen. Das heißt, spätestens mit dem Absetzen entwickelt sich entweder eine CD2⁺ CD45⁻ Zellpopulation oder der verwendete Antikörper ist nicht mehr in der Lage die CD45⁺ Zellen zu detektieren. Beide Fälle sind in der aktuellen Literatur nicht konkret beschrieben. Makala et al. (2001) zählten für den Marker CD2 und den Dom als Ganzes, bezogen auf die Fläche von 1mm², beim 28 Tage alten Schwein etwa 5.000 Zellen und stellten bis zum 35 Tage alten Schwein eine Steigerung auf ungefähr 8.000 Zellen fest (Makala et al. 2001). Addiert man die in dieser Arbeit für das Domareal ermittelten Zahlen der Kompartimente DE und SED und rechnet sie auf 1mm² hoch, erhält man für das 28 Tage alte Tier 4.600 CD2⁺ Zellen, für das 39 Tage alte Tier ergeben sich aber nur 3.600 Zellen und im 150 Tage alten Tier ist eine Erhöhung der Zellzahl auf 11.900 CD2⁺ Zellen pro mm² nachweisbar. Gleichzeitig zeigt sich in dieser Arbeit im gesamten Zottenareal (ZE + LP) eine deutliche Zunahme von 4.700 CD2⁺ Zellen beim 28 Tage alten Tier, über 8.000 CD2⁺ Zellen beim 39 Tage alten Tier, auf 10.700 CD2⁺ Zellen pro mm² beim 150 Tage alten Tier. Da es sich hierbei um miteinander vergleichbare schweineindividuelle Zellzahlen handelt, zeigt dieser Versuch, dass sich das Absetzen nicht in jedem Kompartiment gleich auf die Zellpopulationen auswirken muss und dass diese möglicherweise entscheidenden Unterschiede durch statistische Effekte leicht übersehen werden könnten.

Für den T-Zellmarker CD3 stellen Makala et al. (2001) im gesamten Domareal vom 21 bis zum 35 Tage alten Schwein dagegen keine relevanten Veränderungen fest. Die Zellzahl stagniert hier für den gesamten Dom bei etwa 5.000 CD3⁺ T-Zellen pro mm². Differenzierter betrachtet, lassen sich aber sehr wohl signifikante Unterschiede feststellen.

Die im Teil 2 dieser Arbeit ermittelten Anteile von $CD3^+$ T-Zellen repräsentieren die Subpopulationen der $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$ doppelt positiven, $CD4^+/CD8^-$ doppelt negativen, TcR- $\alpha\beta$ -T-Zellen. Fasst man die Mittelwertvergleiche der Marker CD3, CD4 und CD8 zusammen, ergeben sich für die möglichen Subpopulationen in den einzelnen Kompartimenten unterschiedliche Verhältnisse. Für die Kompartimente ZE, SED und LP gilt dabei $CD3 \neq CD4 + CD8$. Im Zottenepithel ist in den Schweinegruppen 1 bis 4 die Anzahl von $CD3^+$ Zellen doppelt so hoch wie die Summe der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen. Hier sei noch einmal auf die in den Mehrfachfluoreszenz-Färbungen dargestellte räumliche Trennung der im ZE liegenden $CD3^-$ und $CD8^-$ positiven intraepithelialen Lymphozyten verwiesen. In der Schweinegruppe 5 liegt die Anzahl der $CD3^+$ Zellen nur noch geringfügig höher als die Summe der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen, was auf einen fortgeschrittenen Entwicklungsprozess der T-Lymphozytenpopulation hinweist. Im Domepithel dagegen entspricht in allen Gruppen die Anzahl an $CD3^+$ Zellen in etwa der Summe der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen. In den tiefer gelegenen Kompartimenten SED und Zotten-LP stellen sich umgekehrte Verhältnisse dar. Hier liegt die Summe der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen im SED um etwa 40-30% höher als die Anzahl an $CD3^+$ Zellen, wobei der Effekt von Gruppe 1 bis hin zur Gruppe 5 abzunehmen scheint. In der Zotten-LP liegt die Summe der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen um 45-80% noch höher als die Anzahl der $CD3^+$ Zellen.

Die konkrete Zuordnung der $CD3^+$ T-Zellen in ihre möglichen Subpopulationen von $CD4^+$ -, $CD8^+$ -, $CD4^+/CD8^+$ doppelt positiven T-Lymphozyten kann aus dieser Arbeit heraus letztlich nicht gänzlich erfolgen, da die $CD3^-$ -, $CD4^-$ und $CD8^-$ -Mehrfachfluoreszenzfärbungen nur beispielhaft an einem Schwein aus der Gruppe 3 dargestellt wurden (siehe 3.3.4). Hier liegt der Anteil an $CD4^+/CD8^+$ doppelt positiven T-Zellen im Dom- wie im Zottenareal noch unter 1%. Zuckermann und Gaskins beschreiben nach durchflusszytometrischen Messungen für die jejunalen Peyerschen Platten 6-7 Monate alter Schweine Anteile von 12% $CD4^+$ T-Zellen, 28% $CD8^+$ -T-Zellen sowie einen 10%-Anteil von $CD4^+/CD8^+$ doppelt positiven T-Lymphozyten (Zuckermann und Gaskins 1996). Da die Population der $CD4^+/CD8^+$ doppelt positiven T-Lymphozyten als funktionelle reife sowie Gedächtnis-T-Zellen beschrieben werden, ist eine entsprechende Steigerung des Anteiles im Laufe der Entwicklung nachvollziehbar (Charern-tanakul und Roth 2006; Zuckermann und Gaskins 1996). Eine sich mit dem Absetzen stark entwickelnde Population von $CD2^+ CD3^- CD4^- CD8^+$ natürlichen Killerzellen (NKZ) ist neben den $CD4^+/CD8^+$ doppelt positiven T-Zellen eine weitere mögliche Erklärung für die scheinbaren Überschüsse der T-Zell-Subpopulationen. Die zytolytische Aktivität der NKZ könnte bei der Virusbelastung während des Prozesses des Absetzens eine besondere Rolle

zum Schutz und zur Erhaltung der Integrität der Darmepithelbarriere spielen (Gerner et al. 2008).

Wie durch die multiple lineare Regression mit den Stichprobenwerten aller fünf Schweinegruppen gemeinsam im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, hat letztendlich das Futter der Tiere in allen Kompartimenten den größten Einfluss auf die Population der CD3⁺ T-Zellen. Im Domareal ist die Einwirkung der Variable Sauenmilch auf die CD3⁺ T-Zellen im Epithel deutlich größer als die der Variable „*E. coli*“. Im subepithelialen Dom ist es gerade umgekehrt, hier spielt der Effekt durch die Beeinflussung der pathogenen *E. coli* Bakterien die größere Rolle. Im Vergleich dazu zeigt sich im Zottenareal ein anderes Bild. Hier ist der Effekt durch die Sauenmilch im Epithel verhältnismäßig größer und auch die Variable „*E. coli*“ hat in diesem Kompartiment einen deutlich größeren Einfluss als jenseits der Basalmembran. In der Zotten Lamina propria ist allerdings auch wieder der Einfluss der Variable „*E. coli*“ größer als der von Sauenmilch, ähnlich wie im SED. Die Sauenmilch wirkt stärker auf die CD3⁺ T-Zellpopulation der Epithel-Kompartimente und der Einfluss von schweinepathogenen *E. coli* Bakterien manifestiert sich eher in den profunder gelegenen Kompartimenten SED und LP. In diesen beiden Kompartimenten hat der Faktor Sauenmilch aber auch noch einen nachweislich positiven Effekt auf den Anteil an CD3⁺ T-Zellen.

In der linearen Regression nicht dargestellt, aber aus den Mittelwertvergleichen ablesbar, ist der Effekt des Absetzens im Vergleich zum Effekt, der durch eine 10 Tage längere Sauenmilchgabe auf die CD3⁺ T-Zell-Population in den Epithelien von Dom und Zotten deutlich wird, signifikant negativ und in den darunter liegenden Kompartimenten statistisch nicht mehr nachweisbar.

Im Falle der Marker CD4 und CD8 für die Subpopulationen der CD2 und/oder CD3 positiven T- bzw. NK-Zellen liegen die im Teil 1 der Arbeit mittels Mehrfach-Fluoreszenzfärbungen ermittelten schweineindividuellen Zellzahlen für die einzelnen Kompartimente erwartungsgemäß grundsätzlich innerhalb der entsprechenden statistischen Gruppenparameter (Konfidenzintervalle) der im Teil 2 festgestellten Zellzahlen der entsprechenden Schweinegruppen. Wie die lineare Regression zeigt, hat die unabhängige Variable Futter (Alter) auch auf den Bestand der CD4⁺ T-(Helfer)-Zellen in allen untersuchten Kompartimenten der Dom- und Zottenareale die größten Auswirkungen. Dabei muss festgestellt werden, dass in den Epithelien von Dom und Zotten der Anteil an CD4⁺ T-(Helfer)-Zellen bei maximal 1-3% liegt. Zumindest für das Kompartiment Domepithel lässt sich aber registrieren, dass gegenüber der Variable Futter die Einflüsse durch Sauenmilch und „*E. coli*“ nur sehr gering sind. Dies ist analog im subepithelialen Dom feststellbar. Obwohl die Beta-Koeffizienten für die Variablen

Sauenmilch und „*E. coli*“ in den beiden Kompartimenten des Domareales auf einem sehr niedrigen Niveau liegen, findet sich hier dasselbe Muster in abgeschwächtem Umfang wie bei den CD3⁺ T-Zellen wieder. Sauenmilch wirkt stärker im Epithel und pathogene *E. coli* Bakterien entfalten eine größere Wirkung subepithelial. In der Zotten Lamina propria zeigt sich in allen Parametern nahezu dasselbe Bild beim Einfluss auf die CD4⁺ T-Helfer-Zellpopulation wie auf die CD3⁺ T-Zellpopulation. Nach dem Futter hat hier die Variable „*E. coli*“ deutlich vor der Sauenmilch den größeren Effekt. Ein direkter Effekt auf die CD4⁺ T-Helfer-Zellpopulation durch das Absetzen ist, wie schon die geringen Einflüsse der Sauenmilch nahelegen, im Mittelwertvergleich der Gruppen nicht feststellbar.

Verschiedenste Studien beschreiben die Verteilung sowie die Veränderungen im CD4⁺ T-Helfer-Zellen Pool des Darmes aus unterschiedlichsten Blickwinkeln und stellen differenzierte Reaktionen auf Umwelteinflüsse, wie unterschiedliche Diäten, Virusbelastungen, spezifische Allergene, Milch- und Fettkomponenten, pathogene Bakterien sowie das Absetzen fest (Binter et al. 2008; Darwich et al. 2002; Dreau et al. 1995; Duncker et al. 2006; Handl et al. 2009; Haverson et al. 1999; Hontecillas et al. 2005; Tingstedt et al. 2003; Vega-Lopez et al. 1995; Zentek et al. 2002; Zuckermann und Gaskins 1996). Charerntantanakul und Roth (2006) beschreiben zusammenfassend für die schweinespezifischen CD4⁺ T-Helfer-Zellen funktionell eine Dominanz bei Immunantworten vorrangig gegen parasitäre und bakterielle Pathogene. Die CD4⁺ T-Helfer-Zellpopulation entwickelt sich durch Antigenkontakt z.T. von einfach CD4⁺ zu CD4⁺ CD8⁺ doppelt positiven T-Helfer-Zellen mit Gedächtniszellfunktion, der Möglichkeit zur Zellproliferation, der Expression von IL2-Rezeptoren, IFN α , IL2, IFN γ , MHCII-Molekülen und der Stimulation von B-Zellen. Eine Minorität der CD4⁺ CD8⁺ doppelt positiven T-Zellen ist mit zytotoxischen Funktionen ausgestattet. Zu den CD4⁺ T-Helfer-Zellen müssen auch die regulatorischen T-Zellen gezählt werden. Hervorzuheben ist hier ihre Fähigkeit IL10 zu produzieren.

Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen sind während einer Immunantwort auf virale Antigene/Pathogene CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen die vorherrschende T-Zell-Subpopulation (Charerntantanakul und Roth 2006; Gerner et al. 2008; Kaser et al. 2008). Die Gesamtheit der CD8⁺ Zellen umfasst die zytotoxischen $\alpha\beta$ -T-Zellen (ZTZ), die natürlichen Killerzellen (NKL) sowie die CD4⁺ CD8⁺ doppelt positiven Gedächtnis-T-Zellen, welche in diesem Rahmen letztlich nicht gegeneinander abgegrenzt werden können.

Im Gegensatz zu den Einflüssen der unabhängigen Variablen auf die Populationen der CD3⁺- und CD4⁺ T-Zellen, hat die Variable Futter hier nicht in allen Kompartimenten den größten Einfluss. Im subepithelialen Dom hat der Faktor pathogene „*E. coli*“ den größten Anteil an

den jedoch insgesamt geringen Veränderungen. Im darüber liegenden Domepithel hat das Futter den bedeutendsten und die Variablen Sauenmilch sowie „*E. coli*“ einen etwa gleichgroßen im Vergleich relativ starken Effekt auf die CD8⁺ Zellen. Im Zottenareal, speziell im Epithel, lassen sich mit dem angewendeten linearen Regressionsmodell 81% der hier vorfindbaren Varianzen erklären. Neben dem wiederum größten Einfluss der Variable Futter, wirken hier auch die Variablen Sauenmilch und „*E. coli*“ ähnlich stark auf die Entwicklung der CD8⁺ Zellpopulation ein. In der tiefen Zotten Lamina propria ist neben dem starken Einfluss des Futters der Effekt der Sauenmilch nur noch halb so groß wie der Einfluss durch die pathogenen *E. coli* Bakterien. Das Absetzen der Schweine hat in den Kompartimenten DE, ZE und LP hier auch nachweislich höchst signifikante Effekte, die im SED so nicht festzustellen sind.

Insgesamt ist der Einfluss auf die untersuchten Zellpopulationen durch das Absetzen der Schweine nach Hinzuziehen weiterer Parameter (länger Sauenmilch und Beeinträchtigung durch pathogene *E. coli*) bei gleichalten Schweinen besser darstellbar. Erst im Vergleich der 39 Tage alten und unterschiedlich behandelten Tiere (Gruppe 2, 3, 4) untereinander und im Bezug zu den 28 bzw. 150 Tage alten Kontrolltieren (Gruppe 1, 5) treten die unterschiedlichen Effekte und Einflussgrößen in den verschiedenen Kompartimenten des jejunalen Schweinedarmes deutlicher zu Tage. Für das aus den unterschiedlichen Schweinegruppen abgeleitete lineare Regressionsmodell mit den Einflussgrößen bzw. unabhängigen Variablen Alter, Futter, Sauenmilch und „*E. coli*“ lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Effekte auf das Epithel im Dom-, wie im Zottenareal stets größer und mit dem Modell besser erklärbar sind. Im Umkehrschluss sind die Einflüsse der unabhängigen Variablen des Modells auf die tiefer gelegenen Kompartimente insgesamt stets kleiner, was in noch größerem Ausmaß weitere andere, in diesem Modell nicht erfasste, Einflussfaktoren nahelegt.

Zu benennen ist in erster Linie der unterschiedliche genetische Hintergrund der Individuen und die daraus resultierende differente Suszeptibilität gegenüber allen möglichen Patho- und Antigenen. Weitere Faktoren, die z.B. regulierend auf die Zusammensetzung der Darmflora und somit letztlich auch auf die Zellkonstellation in der Darmwand wirken, wären u.a. die tatsächlich verfügbaren Nährstoffe nach/ durch Konkurrenz um dieselben, der pH-Wert, das Redoxpotential, die Gallensäuren, die Peristaltik, die Temperatur, der „Turnover“ der Epithelzellen, die Antikörper im Lumen, Phagozytose, Bindung an Muzine, Lysozyme, lang- und kurzkettige Fettsäuren, Schwefelwasserstoff, Bakteriozide und Bakteriophagen (Kemal Isik 2004). In den tiefer gelegenen Kompartimenten gewinnen offensichtlich die lokalen regu-

lativen Faktoren einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung des Zellpools als die „Stör- oder Schutzfaktoren“ aus der Umwelt des Darmlumens.

Untersuchungen an durchfallerkrankten Tieren zeigten, dass unabhängig von Hygiene-, technischen und immunpräventiven Maßnahmen in fast allen Beständen säugender und abgesetzter Ferkel Enteropathogene wie Coronavirus, Rotaviren, enterotoxische *E. coli* (ETEC) sowie die einzelligen Parasiten *Isospora suis* und *Cryptosporidium parvum* (Kokzidiosen) im Faezes nachweisbar sind (Wieler et al. 2001). Dies zeigt die Notwendigkeit auf, dass spätestens mit dem Absetzen in den untersuchten Kompartimenten die Entwicklung und Aufrechterhaltung entsprechender Zytokinmilieus notwendig sind. Im Zuge der Initialisierung, Steuerung und Regulation von Immunantworten kommt es durch eine Reihe von Zellen entsprechend zur Expression und Ausschüttung von Zytokinen in interstitielle Räume und über immunologische Synapsen direkt an andere Zielzellen (Thauland und Parker 2010). Eine zentrale Rolle spielen dabei die in dieser Arbeit untersuchten T-Zellpopulationen sowie die folliculären und interdigerierenden dendritischen Zellen. Neben der Initialisierung sowie der Beendigung oder Aufrechterhaltung der Immunreaktion ist die (antigen- und umständeabhängige) Regulation zwischen einer humoralen und/ oder zellulären Reaktion für den letztendlichen Erfolg der Antwort entscheidend. Da es während des Absetzens zu einer massiven Beeinflussung des Darmimmunsystems einerseits durch Antigene aus der Nahrung, andererseits durch Antigene/ Pathogene mikrobiellen Ursprungs kommt, müssen sowohl toleranzvermittelnde als auch humoral bzw. zellulär wirksame Immunantworten entsprechend reguliert werden (Bailey et al. 2001). Th-1- und Th-2-Zellen induzieren unterschiedliche Immunglobulin-Isotypen sowie unterschiedliche Subklassen von IgG. Die CD4⁺ T-Zellen sind wichtig für die Regulation der IgA-Antwort und deren Verlust führt (im Dünndarm von Mäusen) zur dramatischen Abnahme von Plasmazellen, wobei auch die PP insgesamt verkleinert und weniger Keimzentren vorhanden sind (Xu-Amano et al. 1992).

Versuche mit neugeborenen Ferkeln, die getrennt unter niedrigen oder hohen Hygienebedingungen bis zum 28. Lebenstag entweder bei der Sau oder im Isolator aufwachsen, zeigen, dass die geringeren Hygienebedingungen zwar zu einer höheren Diversität der Mikroflora führen, dabei aber keine Unterschiede in der Entwicklung der mukosalen sowie systemischen T-Zellen bis zum 20. Tag nachzuweisen waren. Allerdings findet in diesem Zeitraum eine quantitative Entwicklung der dendritischen Zellen statt, was als Ausdruck ihrer steuernden Funktion verstanden werden kann. Isolierte und in vitro mit ConA stimulierte jejunale Zotten-Lamina-propria-Leukozyten (ohne PP) zeigen hier lediglich für die unter niedrigen Hygienebedingungen bei den Sauen gehaltenen Ferkeln eine signifikant höhere IL-4 Produktion

gegenüber den im Isolator aufgewachsenen Tieren. Für die IL-2-, IL-10- und IFN γ -Produktion konnten keine entsprechenden Effekte durch Alter oder Umwelt festgestellt werden. Bei den Leukozyten aus den mesenterialen Lymphknoten sowie der Milz, die ebenfalls *in vitro* mit ConA stimuliert wurden, zeigten im Gegensatz zu den Zellen der jejunalen Mukosa diejenigen aus der Gruppe der unter hohen Hygienebedingungen in den Isolatoren aufgewachsenen Schweine eine signifikant höhere Produktion von IL-2. Für IL-4, IL-10 und IFN γ konnte kein Effekt durch die Einflüsse Alter oder Umwelt festgestellt werden. Ohne ConA-Stimulus der oben beschriebenen *in vitro* Zellkulturen sind mukosal wie systemisch gar keine Zytokine detektierbar (Inman et al. 2010).

Nicht unerwartet stellt sich daher durch die im Teil 3 dieser Arbeit durchgeführten *In-situ*-Hybridisierungen gegen die mRNA der Zytokine IL2, IL4, IL10 und IFN γ ein vielschichtiges Ergebnis dar. Während die deutlichen und signifikanten Unterschiede in den Anteilen immunkompetenter Zellen in den Kompartimenten der Dom- und Zottenareale der 39 Tage alten Tiergruppen (Gruppe 2, 3 und 4) auf der funktionellen Ebene der Transkription von Zytokin mRNA nicht entsprechend nachvollziehbar sind, können im Vergleich der Randgruppen (Gruppe 1: 28 LT, nicht abgesetzt und Gruppe 5: 150 LT) deutliche Unterschiede auf dieser Ebene dargestellt werden.

Für das in Generation und Regulation einer adaptiven Immunantwort entscheidende Zytokin Interleukin 2, welches von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen als typisches Th1-Zytokin produziert wird, sind in den noch nicht abgesetzten 28 Tage alten Schweinen der Gruppe 1 und nur in diesem Falle auch bei den 39 Tage alten nicht abgesetzten Tieren der Gruppe 2 im Domareal noch keine transkriptionellen Aktivitäten nachweisbar. Diese beginnen in diesem Areal erst mit dem Absetzen. Dies könnte einerseits der schützenden Wirkung der Sauenmilch oder andererseits dem Umstand zu verdanken sein, dass noch keine Ferkelfutteraufnahme mit entsprechenden Konsequenzen für die Änderung der Darmflora und des -milieus stattgefunden hat. Mit dem Absetzen scheint sich dann im Domareal eine IL2-Zytokin-mRNA-Transkription zu entwickeln zumal auch ein mit dem Absetzen assoziiertes inflammatorisches Zytokinmilieu beschrieben ist (Pie et al. 2004). Die subepithelialen Domareale der 150 Tage alten Schweine sind regelmäßig stark positiv für IL2-Zytokin-mRNA-positive Zellen und spiegeln wohl einen „Erhaltungstatus“ des reifen Immunsystems in diesem Gebiet wider. Einige der IL2-Zytokin-mRNA-positiven Zellen in den Schweinegruppen 3, 4 und 5 konnten auch im Domepithel lokalisiert werden (de Groot et al. 2005).

IFN γ entsteht früh bei viralen Infektionen als Teil der angeborenen Immunantwort und kann als ebenfalls proinflammatorisch wirkendes Glykoprotein nach Antigenkontakt außer von

natürlichen Killerzellen auch von CD4⁺ Th1-Zellen, CD8⁺ T-Zellen sowie dendritischen Zellen exprimiert werden (Wesley et al. 2006). Neben der Supprimierung der Aktivität von Th2-Zellen ist eine weitere Hauptaufgabe die Aktivierung von Makrophagen. Außerdem wird die Antigenpräsentation durch Einfluss auf die Synthese von MHCI- und MHCII-Molekülen gefördert und der Antikörper-Klassenwechsel von IgM zu IgG positiv und zu IgE negativ beeinflusst. IFN γ erhöht die Fähigkeit der Zellen virale Proteine zu verarbeiten sowie zu präsentieren und führt auch zu einer Verminderung des elektrischen Widerstandes (TEER) in in-vitro Zellkultursystemen (Brett et al. 1992; Janeway und Travers 1997; Paludan 1998; Youakim und Ahdieh 1999). Dass im Gegensatz zum IL2 vereinzelte IFN γ -Zytokin-mRNS-positive Zellen schon bei den 28 und 39 Tage alten nicht abgesetzten Schweinen im subepithelialen Dom gefunden werden konnten, mag Ausdruck frühzeitiger Reaktionen des angeborenen Armes des Immunsystems sein. Im Vergleich zum IL2 sind bei den 39 Tage alten abgesetzten Schweinen im Domareal insgesamt weniger IFN γ -Zytokin-mRNS-positive Zellen zu finden, aber ähnlich wie bei IL2 konnten auch hier im Domepithel außer bei den Schweinegruppen 3, 4 und 5 auch schon bei Schweinegruppe 2 IFN γ -Zytokin-mRNS-positive Zellen nachgewiesen werden.

In den Mantelzonen der Follikel sind dagegen auch schon bei den Schweinen der Gruppe 1 insgesamt mehr IFN γ -Zytokin-mRNS-positive Zellen zu finden als bei IL2. Da die Mantelregionen der Follikel typische T-Zell-Zonen sind, werden hier Th1 Zytokine wie IL2 und IFN γ bevorzugt konstitutiv exprimiert (Kalies et al. 2006).

Die zwei Zytokine IL4 und IFN γ spielen aufgrund ihrer antagonistischen Funktionen eine zentrale Rolle in der Generation und Regulation der Immunantworten. Während IFN γ die Th2-Differenzierung inhibiert, die Th1-Entwicklung stabilisiert, die Makrophagenaktivierung verstärkt sowie den Antikörper-Klassenwechsel und die Fc-Rezeptor Expression entsprechend beeinflusst, wird durch Interleukin 4 die Th2-Antwort bei gleichzeitiger Hemmung der Th1-Differenzierung forciert (Paludan 1998).

Das IL4, welches von CD4⁺ T-Zellen und auch von Mastzellen gebildet werden kann, ist somit beteiligt an der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, der Antikörperproduktion sowie dem Schutz vor extrazellulären Antigenen und Mikroorganismen (Netea et al. 2005; Neurath et al. 2002; Paludan 1998; Romagnani 1997). Vergleichbar mit der IFN-Transkription sind bei den 39 Tage alten Tieren wenige IL4-Zytokin-mRNS-positive Zellen in einigen subepithelialen Domarealen nachzuweisen. Während die 28 Tage alten Tiere noch keine IL4-Zytokin mRNS-Transkripte im SED besitzen, können bei den 150 Tage alten Tieren in allen SED mehr oder weniger IL4-Zytokin-mRNS-positive Zellen dargestellt werden.

Im Domepithel können im Gegensatz zu den Zytokinen IL2 und IFN γ keine IL4-Zytokin-mRNS-positive Zellen gezeigt werden. Nur für IL4 und die 150 Tage alten Tiere konnten wenige IL4-Zytokin-mRNS-positive Zellen in der Zotten Lamina propria nachgewiesen werden. Da offensichtlich die Expression von IL4 und IL10 bei Mäusen durch Ausschluss der enteralen Fütterung negativ beeinflusst werden kann, sollte im Umkehrschluss entsprechend eine Futteraufnahme die Expression von IL4 und IL10 steigern (Hauer et al. 1998; Klein et al. 1995; Pie et al. 2004). In den Mantelzonen und der Basis der Follikel kommen vom 28 Tage alten Schwein an regelmäßig relativ viele IL4-Zytokin-mRNS-positive Zellen vor.

Wie IL4 gehört auch IL10 zu den antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen, kann von CD4⁺ T-Helferzellen und Monozyten gebildet werden und verhindert regulatorisch pathogene Th1- sowie Th2-Antworten gegen kommensale Mikroorganismen (Izcue et al. 2009; Netea et al. 2005; Romagnani 1997; Sartor 2006). Die IL10-Zytokin-mRNS-positiven Zellen kommen auch schon in einigen der SED Areale bei den 28 Tage alten Tieren in größeren Anzahlen als bei den anderen untersuchten Zytokinen IL2, IL4 und IFN γ vor. Auch hier ist auffällig, dass sich SED Areale mit relativ vielen IL10-Zytokin-mRNS-positiven Zellen z.T. in enger Nachbarschaft mit entsprechenden Arealen mit wesentlich weniger oder keinen IL10-Zytokin-mRNS-positiven Zellen befinden. Dies ist vor allen in den Schweinegruppen 1 bis 4 markant. Nur bei den 150 Tage alten Tieren aus der Gruppe 5 sind auch IL10-Zytokin-mRNS-positive Zellen im Domepithel nachzuweisen. Ähnlich wie bei IFN γ und IL4 sind die Mantelzonen der Follikel auch schon bei den jüngsten Schweinen mit vielen IL10-Zytokin-mRNS-positiven Zellen gefüllt. Ein u.U. wünschenswerter zeitiger Einfluss auf die Entwicklung der B-Zellreichen folliculären Keimzentren ist hier vorstellbar (Choe und Choi 1998).

Die hier beschriebenen in der Mukosa des jejunalen Darmes vorhandenen, durch den Kontakt mit den luminalen Antigenen hoch aktivierten, zur Auslösung lokaler oder gar systemischer Immunantworten fähigen Th1-Lymphozyten können durch die ebenfalls anwesenden antiinflammatorische Zytokine produzierenden Th2-Lymphozyten reguliert werden, so dass ein insgesamt eher immunsuppressives Umfeld geschaffen wird. Zu diesem Umfeld könnte auch das Konzept der T-Zell-Anergie beitragen (Izcue et al. 2009; Mannick und Udall, Jr. 1996).

Eindeutig identifiziert sich durch die isH in dieser Arbeit das Domareal gegenüber dem Zottenareal als die grundsätzlich funktionell aktivere immuninduktive Region im jejunalen Schweinedarm. Die Tatsache, dass während des Zeitraums des Absetzens in den drei Gruppen der 39 Tage alten Tiere nahezu in allen Tieren gleichzeitig funktionell „aktive sowie inaktive“ Domareale zu finden sind, ist sicher Ausdruck lokaler Differenzen in der Antigenaufnahme sowie eines entwicklungsfähigen domindividuellen Immunstatus (Makala et al. 2001).

Im Epithel der Zottenareale konnten keine positiven Zellen für die untersuchte Zytokin-mRNS nachgewiesen werden, wobei aber das Vorhandensein Zytokin-mRNS-positiver Zellen in den Kryptenepithelien und epithelialen Bereichen mit vielen Becherzellen aufgrund eines schlechten Signal-Hintergrund-Verhältnisses bei allen Zytokinen nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Das Hintergrundsignal scheint im Bereich der Becherzellen und Krypten bei den Tieren aus der Schweinegruppe 4 vergleichsweise stärker zu sein, was sich möglicherweise auf den Einfluss des pathogenen des *E. coli*-Stammes zurückführen lässt.

Da die Zytokine letztlich innerhalb eines Netzwerkes interagieren, in dem sie sich gegenseitig induzieren sowie ihre Oberflächenrezeptoren modulieren, um dann durch synergistische, additive und/oder antagonistische Effekte Zellfunktionen zu steuern, kann es auch sein, dass die Proliferation sowie die Zytokinantwort intraepithelialer T-Zellen durch intestinale Epithelzellen herunterreguliert ist (Yamamoto et al. 1998).

Obwohl beschrieben ist, dass intestinale CD4⁺ Lamina propria Lymphozyten nach Stimulation IL4 und wenig IL2 exprimieren, konnten in dieser Arbeit entsprechend Zytokin-mRNS-positive Zellen nur in der Lamina propria der subepithelialen Dome nachgewiesen werden. Lediglich in der Zotten Lamina propria der 150 Tage alten Schweine konnten vereinzelte IL4-Zytokin-mRNS-positive Zellen gefunden werden (Brown et al. 2006; Stokes et al. 1996).

Neben vereinzelten Zytokin-mRNS-positiven Zellen in den interfollikulären Regionen (alle Zytokine) sind hauptsächlich die T-Zellreichen Mantelzonen und da besonders die Basisbereiche der Follikel Aufenthalts- und Wirkungsraum für die Zytokin-mRNS-positiven Zellen. Die B-Zellreichen Keimzentren sind zwar nicht völlig frei von Zytokin-mRNS-positiven Signalen, heben sich aber regelmäßig als entsprechend helleres Areal ab (Bhalla et al. 1981; Brandtzaeg et al. 1999; MacLennan 1994; Park und Choi 2005). Die Region des Follikelmantels mit seinen Zytokin-mRNS-positiven Zellen stellt sich nie ringförmig geschlossen, sondern immer „zum Dom hin geöffnet“ dar. Eine „Vorverlagerung“ der funktionellen zellulären immunologischen Aktivitäten auf Transkriptionsebene findet offensichtlich allmählich mit dem Absetzen statt und ist beim 150 Tage alten Schwein stabil etabliert.

Neben der Regulation der Immunantwort durch das vorherrschende Zytokinmilieu sind auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) an der Steuerung der Immunantwort beteiligt. Dabei aktivieren beispielsweise hohe Dosen LPS den TLR4, Flagellin den TLR5 und CpG DNS den TLR9, was in der Folge zur Induktion einer Th-1-Antwort führt (Netea et al. 2005; Romagnani 1997). Vor dem Hintergrund entzündlicher Darmerkrankungen wie Kolitis ulzerosa und Morbus Crohn durchgeführte isH-Studien mit humanen Darmbiopsien konnten zeigen, dass entsprechend mRNS-positive Zellen für proinflammatorische Zytokine in großen Mengen in

entzündeter und ebenso in gesunder normaler Mukosa vorhanden sind (Kelly et al. 2005; Woywodt et al. 1994).

Die in dieser Arbeit auf transkriptioneller Ebene detektierte Zytokinproduktion zeigt eine mit dem Alter zunehmende Tendenz und ist in den hier untersuchten mit 150 Lebenstagen ältesten Schweinen auf einem hohen Level stabil für alle vier untersuchten Zytokine darstellbar. Aus dem Nachweis für die zelluläre Zytokin mRNA-Transkription kann durchaus auf Expression des Zytokines geschlossen werden. Unzweifelhaft existieren trotzdem Stellmöglichkeiten auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene zur Regulation. Beim anschließenden Transport der Proteine bieten sich weitere Einflussmöglichkeiten (de Groot et al. 2005; Grogan et al. 2001; Katayama et al. 2005; Ma et al. 2010; Makalowska et al. 2005; Vitolo et al. 1993; Woywodt et al. 1994).

Aussagen über eine besonders vorherrschende Richtung der Immunantwort im Zusammenhang mit den Veränderungen und Belastungen im jejunalen Schweinedarm können auf der Basis der vorliegenden Arbeit letztlich nicht getroffen werden. Dies liegt vor allem in der Tatsache begründet, dass an dem beobachteten Prozess eine ganze Reihe unterschiedlicher Faktoren beteiligt sind, die kaum in ihrer Gesamtheit in den Blick geraten können. Zu vielfältig sind die möglichen Belastungen durch Nahrungsmittelantigene, mikrobielle Pathogene und Toxine, Viren, Pilze sowie Protozoen, durch die letztlich auch alle zur Verfügung stehenden immunologischen Komponenten und Funktionen gefordert sind und entsprechend reguliert werden müssen. Die Befunde dieser Arbeiten konnten deutlich auf die Relevanz dieses Bedingungsgefüges verweisen.

5 Zusammenfassung

In einem Zeitraum von der Geburt bis zum Alter von etwa zehn Wochen vergrößert sich der Durchmesser des Schweinedünndarmes um den Faktor 3,5, während sich das Fassungsvermögen dabei insgesamt um den Faktor 43 erhöht. Im Gegensatz zum natürlichen Absetzprozess, der etwa 12 Wochen andauern würde, werden die meisten Ferkel in der industrialisierten Fleischproduktion abrupt mit 25-28 Lebenstagen vom säugenden Muttertier entfernt und auf die Ernährung mit Ferkelfutter umgestellt. Durch diese Umstellung kommt es im Ökosystem des Schweinedarmes zu großen qualitativen sowie quantitativen Änderungen der im Lumen befindlichen Antigene. Diese beeinflussen, neben den normalen Wachstumsprozessen, das Epithel der Darmwand und damit auch das mukosale Immunsystem. Zur Untersuchung wurde der jejunale Darmabschnitt ausgewählt, da hier der Mukus am dünnsten und die Aufnahmerate am höchsten ist. Außerdem ist in diesem Darmabschnitt der Anteil neuer (unvollständig) unverdauter Antigene am größten. Hier sind in den immunologischen Strukturen der PP und Follikel auch mehr T-Zellen als im Ileum zu finden. Die im Organismus zirkulierenden T-Zellen können in die Lamina propria des Dünndarmes über die in der Submukosa gelegenen Venen eintreten, die PP mit den interfollikulären Zonen erreichen sie über dort befindliche hochendotheliale Venulen. Die T-Zellen erreichen auch als intraepitheliale Zellen das Darmpithel sowohl im Bereich der Dom- als auch der Zottenareale und sind in der Lage auf Umweltreize aus dem Darmlumen vor Ort zu reagieren. Die T-Zellen verlassen die Region der PP über das intestinale Lymphsystem, werden dabei zu den mesenterialen Lymphknotenstationen geschleust und u.U. darüber hinaus bis in die Blutbahn. Durch diese Mechanismen und Wechselwirkungen kommt es permanent zu Veränderungen in der Mukosa. Vier Kompartimente wurden differenziert und genauer betrachtet. Zu diesem Zweck wurden die epithelialen Kompartimente Domepithel (DE) sowie Zottenepithel (ZE) und die jenseits der Basalmembran profunder gelegenen Kompartimente subepithelialer Dom (SED) sowie Zotten Lamina propria (LP) gegeneinander abgegrenzt und separat ausgezählt.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit in drei Teilen folgende Untersuchungen durchgeführt:

Teil 1

Am Beispiel von drei Schweinen (Schwein 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; Schwein 2: 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; Schwein 3: 150 LT, 28 T SM, 122

T Futter, gesund) wurde eine qualitativ-semiquantitative Analyse zur Kolo-kalisation von M-Zellen und immunkompetenten Zellen durchgeführt. In diesem Teil der Arbeit wurden zehn verschiedene Zellmarker etabliert und zur Darstellung der differentiellen Zellpopulationen mittels Mehrfach-Fluoreszenz-Markierungen verwendet. Zur qualitativen sowie quantitativen Auswertung wurden fotografische Mehrfach-Fluoreszenz-Aufnahmen erstellt. Die einzelnen Zellpopulationen wurden per Hand markiert und die Zellzahl pro Fläche festgestellt. Auf diese Weise konnten für alle untersuchten Zellpopulationen schweineindividuelle, für den jejunalen Darmabschnitt sehr genaue, miteinander vergleichbare Zellzahlen pro $10.000\mu\text{m}^2$ erhoben werden. Diese Daten wurden anschließend anhand von Mittelwertvergleichen, T-Tests und posthoc-Tests statistisch ausgewertet.

So konnten in diesem Teil der Arbeit präzise Gesamtzellzahlen für die differenzierten Kompartimente ermittelt werden. Diese dienten als Bezugsgröße, um relative/prozentuale Vergleiche zwischen den Kompartimenten, Schweinen und Zellpopulationen anstellen zu können. Insgesamt konnten hier für die Populationen der CD2^+ - sowie die der CD8^+ T-Zellen die größten und markantesten Änderungen im Zusammenhang mit dem Absetzen der Tiere festgestellt werden. Alle Marker wurden zudem miteinander in Bezug gesetzt, qualitativ und teilweise quantitativ ausgewertet.

Teil 2

Aufgrund der im Teil 1 festgestellten Änderungen der T-Zellzahlen wurde in diesem Abschnitt der Arbeit eine qualitativ-quantitative Analyse der CD3^- , CD4^- und CD8^+ T-Zellpopulationen in den Kompartimenten von Dom- und Zottenareal im Kontext des Absetzens an fünf differentiellen Schweinegruppen mit je vier Tieren durchgeführt (Gruppe 1: 28 LT, 28 T Sauenmilch (SM), kein Futter, gesund; Gruppe 2: 39 LT, 39 T SM, kein Futter, gesund; Gruppe 3: 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, gesund; Gruppe 4: 39 LT, 28 T SM, 10 T Futter, krank; Gruppe 5: 150 LT, 28 T SM, 122 T Futter, gesund). Zu diesem Zweck wurde für jeden Marker eine entsprechende immunhistochemische Färbung etabliert. Für die Auswertung wurden analog zu Teil 1 fotografische Aufnahmen erstellt und alle Zellen in ihren Kompartimenten wurden durch Markierung per Hand ausgezählt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Mittelwertvergleiche, T-Tests und posthoc-Tests und in diesem Teil der Arbeit zusätzlich durch Multiple lineare Regressionen für die einzelnen Kompartimente mit jeweils allen Stichproben aller Tiere aus den fünf Schweinegruppen. Dadurch konnten die Einflüsse der

Variablen Alter, Futter, Sauenmilch sowie die Wirkung eines pathogenen *E. coli* Stammes auf die Zellpopulationen der differenzierten Kompartimente quantitativ beschrieben werden.

Die Vergleiche stellen die Differenzen zwischen den Schweinegruppen und Kompartimenten dar und liefern vergleichbares Zahlenmaterial. Das Regressionsmodell zeigt auf, dass die Variable Futter den größten Anteil an den Veränderungen der Zellpopulationen in den Kompartimenten hat. Die Effekte auf die epithelialen Kompartimente sind insgesamt stets größer. Der Faktor Sauenmilch wirkt stärker auf das Epithel und der Einfluss des pathogenen *E. coli* Stammes manifestiert sich besonders in den tiefer gelegenen Kompartimenten SED und Zotten Lamina propria. Die Verhältnisse der Einflussgrößen zueinander sind zwischen den Markern und Kompartimenten unterschiedlich.

Teil 3

Abschließend wurde eine qualitativ-funktionelle Analyse der Zytokinproduktion auf transkriptionaler Ebene durch In-situ-Hybridisierung mittels RNS-Sonden durchgeführt. Auch hier wurde Material aus den fünf differenten Schweinegruppen (siehe Teil 2) verwendet. Als Zielstrukturen wurden je zwei typische Th1- und Th2-Zytokine ausgewählt (Th1: IL2 und IFN γ ; Th2: IL4 und IL10). Im Rahmen der Arbeit wurden 16 verschiedene Sonden entworfen, kloniert und getestet. Mit einer Auswahl der besten Sonden wurden die nicht-radioaktiven isH durchgeführt. Zur Auswertung wurden neben der Betrachtung und Auszählung der Zytokin-mRNS-positiven Zellen pro Areal direkt am Mikroskop auch beispielhaft fotografische Aufnahmen angefertigt.

Festgestellt werden musste, dass die relativ starken und deutlichen Unterschiede der Anteile immunkompetenter Zellen in den Kompartimenten von Dom- und Zottenareal auf funktioneller Ebene durch die Darstellung der Zytokin-mRNS nur in gewissen Grenzen ergänzt werden konnte. Die meiste Aktivität auf transkriptionaler Ebene lässt sich, neben wenigen interfollikulär gelegenen positiven Zellen, hauptsächlich in den basalen und lateralen Gebieten des Follikelmantels feststellen. Die Regionen des Follikelmantels mit ihren Zytokin-mRNS-positiven Zellen stellen sich nie ringförmig geschlossen, sondern immer zum Dom hin geöffnet dar. Eindeutige und in jedem Tier vorhandene stark positive Signale für alle untersuchten Zytokine gibt es nur in den Domarealen der 150 Tage alten Schweine der Gruppe 5. Die große Mehrheit der positiven Zellen liegt dabei immer im SED. In den jüngeren Schweinen liegen oft aktive Domareale mit mehreren Zytokin-mRNS-positiven Zellen neben inaktiven Domarealen mit nur wenigen oder ohne Zytokin-mRNS-positiven Zellen. Eine funktionell

vorherrschende immunologische Situation (Th1/Th2; zellulär/humoral; entzündlich/suppressiv) lässt sich aus diesen Untersuchungen jedoch letztlich nicht herleiten.

Die in verschiedenen Studien ermittelten Zellzahlen für periphere lymphatische Organe wie das GALT konnten in dieser Arbeit speziell für den jejunalen Schweinedarm wesentlich konkretisiert werden. Der Fokus lag dabei einerseits auf dem Vergleich der funktionell differenzierten Areale der Dome und Zotten bei Unterteilung in Epithel (DE, ZE) sowie den tiefer gelegenen Bereichen in der Lamina propria (SED, LP). Andererseits richtete sich das Augenmerk in dieser Arbeit auf den Zeitraum des Absetzens der Ferkel vom Muttertier als eine Zäsur in der (immunologischen) Entwicklung der Tiere. Die festgestellten Änderungen der Zellkonzentrationen in den definierten Kompartimenten sind signifikant und die unterschiedlichen Einflüsse durch äußere Faktoren konnten durch ein lineares Regressionsmodell auch quantitativ ausgewertet werden.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die entsprechenden Reaktionen und Veränderungen im Organismus am Modelltier Schwein zu beobachten. Insbesondere galt das Augenmerk den durch veränderte Umweltbedingungen hervorgerufenen Reaktionen in den direkt betroffenen Arealen der Darmschleimhaut. Diese konnten **in situ** auf der Ebene der beteiligten Zellen nachvollzogen, dargestellt, quantitativ erfasst und funktionell eingeordnet werden

6 Ausblick

Die von der Darmlänge unabhängigen festgestellten kompartimentspezifischen Konzentrationsmaße können in unterschiedlichen Studien als adäquates Bezugssystem dienen. Die ermittelten Relationen der Zellen zueinander können z.B. in Zellkultursysteme übertragen werden. Für zukünftige Experimente können sämtliche in dieser Arbeit hergestellten Plasmide und daraus herstellbare Sonden genutzt werden, um z.B. sinnvollerweise die Nachweisgrenze durch die Nutzung radioaktiver Markierungstechniken weiter herabzusetzen. Da auch natürlich vorkommende antisense-Transkripte (NATs) vielfach beschrieben sind (Galante et al. 2007), ist zu überlegen, ob z.B. durch protection-assay-Experimente mit radioaktiv markierten Sonden Nachweise für mögliche transkriptionale oder/ und translationale Kontrollmechanismen geführt werden könnten. Da es sich hierbei aber um flüssig-flüssig-Hybridisierungen handeln würde, wäre der Vorteil der Lokalisierbarkeit der Ereignisse in situ nicht mehr gegeben. Eine vorangehende Quantifizierung der Signale per Real-time-PCR wäre sicher möglich. Um die Signale in situ zu erhalten, sie zu verstärken und Hintergrundsignale zu vermindern, könnte es eventuell auch lohnenswert sein in-situ-PCR Verfahren für den Nachweis von Zytokin-mRNS zu etablieren (Amaro Filho und Nicol 2010; Bagasra und Harris 2006; Itakura et al. 2011; Koji und Hishikawa 2010; Shaker et al. 2006).

Eine weitere Möglichkeit, die individuellen Gegebenheiten der einzelnen Kompartimente konkret aufzuklären und gleichzeitig intrazelluläre funktionelle Vorgänge zu verfolgen, wäre die Laser-Mikrodissektion kombiniert mit Singlezell-PCR-Methoden (Grigoriadou et al. 2003; Hahn et al. 2002; Junker et al. 2007; Kuppers 2004; Villasenor et al. 2008; Voswinkel et al. 2008).

Im besonderen Maße attraktiv scheint die Möglichkeit des zukünftigen Erkenntnisgewinns durch Live-Imaging und Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie am lebenden Gewebe zur direkten Feststellung der Zellbewegungen zwischen den Kompartimenten (Egawa et al. 2011; Grigorova et al. 2010; Matheu et al. 2011; Melichar et al. 2010).

Vor dem Hintergrund, dass beispielsweise nur für die durch Diarrhoe gekennzeichneten enteralen Erkrankungen nach dem Absetzen mehr als 25 verschiedene Erreger bzw. andere Ursachen aufgezählt werden, welche letztlich alle ihre eigene Ätiologie und Symptomatik besitzen, auf die das individuelle Immunsystem auch individuell mit unterschiedlichen Entwicklungen reagiert, scheinen Loopversuche attraktiv. In solchen Versuchen könnte man innerhalb eines Tieres vor einem identischen genetischen Hintergrund gute Abbilder der realen lokalen

Veränderungen erhalten (Clark et al. 1998b; Clark et al. 2001; Jepson et al. 1996; Jones et al. 1994; Pappo und Ermak 1989; Regoli et al. 1994).

Mittlerweile ist es außerdem möglich aus humanen pluripotenten Stammzellen *in vitro*, durch den abgestuften Einsatz von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren sowie speziellen Kultursystemen, ein komplexes dreidimensionales intestinales Gewebe mit einem polarisierten Säulenepithel, Zotten- und Kryptenstrukturen inklusive proliferativer Zonen, funktionellen Enterozyten, Becher-, Paneth- und enteroendokrinen Zellen zu entwickeln (Jason R. Spence 2010). Ebenso werden auch die nichthumanen intestinalen Zellkulturen, wie z.B. IPEC-1 und IPEC-2 ständig weiterentwickelt, um letztendlich noch besser als artifizielle Testsysteme zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen, z.B. aus den Bereichen Toxikologie, Ernährung etc., beitragen zu können (Diesing et al. 2010; Maresca et al. 2008). Erstrebenswert erscheint es auch, derartige Zellkultursysteme weiterhin in Kokulturen mit immunkompetenten Zellen zu kombinieren und somit den Fragestellungen aus dem Bereich der Darmimmunologie zugänglich zu machen (Bimczok et al. 2008; Clark et al. 2005; De Walle et al. 2010; Kerneis et al. 1997; Schierack et al. 2006; Sonntag et al. 2005; Nossol et al. 2011).

In diesem Zusammenhang müssen die Auswahl der immunkompetenten Zellen, ihr funktioneller Status und vor allem ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Kompartimenten bzw. ihre Zutritts- und Einflussmöglichkeiten auf dieselben kritisch betrachtet und mit der *in vivo*-/ *in situ*-Situation entsprechend verglichen und gegebenenfalls in Einklang gebracht werden.

Dazu sollte diese Arbeit beitragen können.

7 Literaturverzeichnis

- Altmann, G.G., Enesco, M., 1967. Cell number as a measure of distribution and renewal of epithelial cells in the small intestine of growing and adult rats. *Am. J. Anat.* 121, 319-336.
- Alvarez, B., Sanchez, C., Bullido, R., Marina, A., Lunney, J., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., 2000. A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens* 55, 342-351.
- Amanna, I.J., Slifka, M.K., 2010. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunol. Rev.* 236, 125-138.
- Amaro Filho, S.M., Nicol, A.F., 2010. The utility of in situ detection, including RT in situ PCR, of viral nucleic acid and the co-localization of the cytokine response to the study of viral pathogenesis. *Methods* 52, 332-342.
- Andersen, J.K., Takamatsu, H., Oura, C.A., Brookes, S.M., Pullen, L., Parkhouse, R.E., 1999. Systematic characterization of porcine ileal Peyer's patch, I. apoptosis-sensitive immature B cells are the predominant cell type. *Immunology* 98, 612-621.
- Artis, D., 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 411-420.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L., 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 280, 922-929.
- Bagasra, O., Harris, T., 2006. Latest developments in in situ PCR. *Methods Mol. Biol.* 334, 221-240.
- Bailey, M., Plunkett, F.J., Rothkötter, H.J., Vega-Lopez, M.A., Haverson, K., Stokes, C.R., 2001. Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 427-435.
- Balkwill, F.R., Burke, F., 1989. The cytokine network. *Immunol. Today* 10, 299-304.
- Bao, S., Goldstone, S., Husband, A.J., 1993. Localization of IFN-gamma and IL-6 mRNA in murine intestine by in situ hybridization. *Immunology* 80, 666-670.

- Barman, N.N., Bianchi, A.T., Zwart, R.J., Pabst, R., Rothkötter, H.J., 1997. Jejunal and ileal Peyer's patches in pigs differ in their postnatal development. *Anat. Embryol. (Berl)* 195, 41-50.
- Basta, S., Knoetig, S.M., Spagnuolo-Weaver, M., Allan, G., McCullough, K.C., 1999. Modulation of monocytic cell activity and virus susceptibility during differentiation into macrophages. *J. Immunol.* 162, 3961-3969.
- Benmarzouk-Hidalgo, O.J., Cisneros, J.M., Cordero, E., Martin-Pena, A., Sanchez, B., Martin-Gandul, C., Gentil, M.A., Gomez-Bravo, M.A., Lage, E., Perez-Romero, P., 2011. Therapeutic Effect of the Acquisition of Cytomegalovirus-Specific Immune Response During Preemptive Treatment. *Transplantation.* 91(8), 927-933
- Bhalla, D.K., Murakami, T., Owen, R.L., 1981. Microcirculation of intestinal lymphoid follicles in rat Peyer's patches. *Gastroenterology* 81, 481-491.
- Bianchi, A.T., Zwart, R.J., Jeurissen, S.H., Moonen-Leusen, H.W., 1992. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33, 201-221.
- Bimczok, D., Post, A., Tschernig, T., Rothkötter, H.J., 2006. Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 325, 461-468.
- Bimczok, D., Rau, H., Sewekow, E., Janczyk, P., Souffrant, W.B., Rothkötter, H.J., 2008. Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro. *Toxicol. In Vitro* 22, 652-658.
- Binns, R.M., 1982. Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3, 95-146.
- Binns, R.M., Licence, S.T., 1985. Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patch in the young pig. *Adv. Exp. Med. Biol.* 186, 661-668.
- Binns, R.M., Licence, S.T., Whyte, A., Wilby, M., Rothkötter, H.J., Bacon, M., 1995. Genetically determined CD45 variant of value in leucocyte tracing in vivo in the pig. *Immunology* 86, 25-33.
- Binter, C., Khol-Parisini, A., Hellweg, P., Gerner, W., Schafer, K., Hulan, H.W., Saalmüller, A., Zentek, J., 2008. Phenotypic and functional aspects of the neonatal immune system as related to the maternal dietary fatty acid supply of sows. *Arch. Anim Nutr.* 62, 439-453.

- Boudry, G., Jury, J., Yang, P.C., Perdue, M.H., 2007. Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 292, G1228-G1232.
- Brandtzaeg, P., Baekkevold, E.S., Farstad, I.N., Jahnsen, F.L., Johansen, F.E., Nilsen, E.M., Yamanaka, T., 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol. Today* 20, 141-151.
- Brandtzaeg, P., Pabst, R., 2004. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol.* 25, 570-577.
- Braun, F., Hosseini, M., Wieland, E., Sattler, B., Muller, A.R., Fandrich, F., Kremer, B., Ringe, B., 2004. Kinetics and localization of interleukin-2, interleukin-6, heat shock protein 70, and interferon gamma during intestinal-reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 36, 267-269.
- Brayden, D.J., Jepson, M.A., Baird, A.W., 2005. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov. Today* 10, 1145-1157.
- Brett, F., Mowat, A., Farquharson, M.A., McGill, M., Hind, C., Richmond, J., Murray, D., Khan, N.U., Foulis, A.K., 1992. The distribution of immunoreactive interferon-gamma-containing cells in normal human tissues. *Immunology* 77, 515-519.
- Brown, D.C., Maxwell, C.V., Erf, G.F., Davis, M.E., Singh, S., Johnson, Z.B., 2006. Ontogeny of T lymphocytes and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in the postnatal period. *J. Anim Sci.* 84, 567-578.
- Brownlee, I.A., Knight, J., Dettmar, P.W., Pearson, J.P., 2007. Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 800-808.
- Burmester, G.-R., Pezzutto, A. *Taschenatlas der Immunologie.* 1998. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
- Cappello, M., Keshav, S., Prince, C., Jewell, D.P., Gordon, S., 1992. Detection of mRNAs for macrophage products in inflammatory bowel disease by in situ hybridisation. *Gut* 33, 1214-1219.
- Carrasco, C.P., Rigden, R.C., Schaffner, R., Gerber, H., Neuhaus, V., Inumaru, S., Takamatsu, H., Bertoni, G., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2001. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 104, 175-184.

- Chapman, H.A., Johnson, J.S., Cooper, M.D., 1974. Ontogeny of Peyer's patches and immunoglobulin-containing cells in pigs. *J. Immunol.* 112, 555-563.
- Chareerntantanakul, W., Roth, J.A., 2006. Biology of porcine T lymphocytes. *Anim Health Res. Rev.* 7, 81-96.
- Chidlow, J.W., Porter, P., 1979. Intestinal defence of the neonatal pig: interrelationship of gut and mammary function providing surface immunity against colibacillosis. *Vet. Rec.* 104, 496-500.
- Choe, J., Choi, Y.S., 1998. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 508-515.
- Chou, C.P., Bentler, P.M., Satorra, A., 1991. Scaled test statistics and robust standard errors for non-normal data in covariance structure analysis: a Monte Carlo study. *Br. J. Math. Stat. Psychol.* 44 (Pt 2), 347-357.
- Chu, R.M., Glock, R.D., Ross, R.F., 1982. Changes in gut-associated lymphoid tissues of the small intestine of eight-week-old pigs infected with transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.* 43, 67-76.
- Clark, E., Hoare, C., Tanianis-Hughes, J., Carlson, G.L., Warhurst, G., 2005. Interferon gamma induces translocation of commensal *Escherichia coli* across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated process. *Gastroenterology* 128, 1258-1267.
- Clark, M.A., Blair, H., Liang, L., Brey, R.N., Brayden, D., Hirst, B.H., 2001. Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells. *Vaccine* 20, 208-217.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., Jepson, M.A., 1998a. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 66, 724-731.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., Jepson, M.A., 1998b. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* 66, 1237-1243.
- Creagh, E.M., O'Neill, L.A., 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27, 352-357.
- Darwich, L., Segales, J., Domingo, M., Mateu, E., 2002. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched unin-

- fected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 9, 236-242.
- de Groot, J., Kruijt, L., Scholten, J.W., Boersma, W.J., Buist, W.G., Engel, B., van Reenen, C.G., 2005. Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs. *Immunology* 115, 495-505.
- De Walle, J.V., Sergent, T., Piront, N., Toussaint, O., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., 2010. Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 291-298.
- Denham, S., Zwart, R.J., Whittall, J.T., Pampusch, M., Corteyn, A.H., Bianchi, A.T., Murtaugh, M.P., Parkhouse, R.M., Tlaskalova, H., Sinkora, J., Sinkora, M., Rehakova, Z., 1998. Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60, 317-328.
- Diaz, G., Canas, B., Vazquez, J., Nombela, C., Arroyo, J., 2005. Characterization of natural peptide ligands from HLA-DP2: new insights into HLA-DP peptide-binding motifs. *Immunogenetics* 56, 754-759.
- Diesing, A.K., Nossol, C., Panther, P., Walk, N., Post, A., Kluess, J., Kreutzmann, P., Danicke, S., Rothkötter, H.J., Kahlert, S., 2010. Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol. Lett.* 200, 8-18
- Dreau, D., Lalles, J.P., Toullec, R., Salmon, H., 1995. B and T lymphocytes are enhanced in the gut of piglets fed heat-treated soyabean proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47, 69-79.
- Duncker, S.C., Lorentz, A., Schroeder, B., Breves, G., Bischoff, S.C., 2006. Effect of orally administered probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 239-250.
- Egawa, G., Honda, T., Tanizaki, H., Doi, H., Miyachi, Y., Kabashima, K., 2011. In Vivo Imaging of T-Cell Motility in the Elicitation Phase of Contact Hypersensitivity Using Two-Photon Microscopy. *J. Invest Dermatol.* 131, 977-979
- El Albani, A., Bengtson, S., Canfield, D.E., Bekker, A., Macchiarelli, R., Mazurier, A., Hammarlund, E.U., Boulvais, P., Dupuy, J.J., Fontaine, C., Fursich, F.T., Gauthier-Lafaye, F., Janvier, P., Javaux, E., Ossa, F.O., Pierson-Wickmann, A.C., Riboulleau, A., Sardini, P., Vachard, D., Whitehouse, M., Meunier, A., 2010. Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature* 466, 100-104.

- Eriksen, K., Landsverk, T., Bodahl, E.G., 1990. Cell differentiation in intestinal adenomatosis of pigs studied by histochemistry of laminin and enzymes of epithelial and subepithelial tissue. *Res. Vet. Sci.* 49, 1-7.
- Facci, M.R., Auray, G., Buchanan, R., van Kessel, J., Thompson, D.R., Mackenzie-Dyck, S., Babiuk, L.A., Gerds, V., 2010. A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs. *Immunology* 129, 396-405.
- Farhadi, A., Banan, A., Fields, J., Keshavarzian, A., 2003. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 479-497.
- Farstad, I.N., Halstensen, T.S., Fausa, O., Brandtzaeg, P., 1994. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology* 83, 457-464.
- Favre, L., Spertini, F., Corthesy, B., 2005. Secretory IgA possesses intrinsic modulatory properties stimulating mucosal and systemic immune responses. *J. Immunol.* 175, 2793-2800.
- Finch, J.F., West, S.G., 1997. The investigation of personality structure: Statistical models. *J. Res. Pers.* 31, 439-485.
- Gabor Bilkei. *Ferkelverluste nach dem Absetzen.* 1996. Gustav Fischer Verlag.
- Galante, P.A., Vidal, D.O., de Souza, J.E., Camargo, A.A., de Souza, S.J., 2007. Sense-antisense pairs in mammals: functional and evolutionary considerations. *Genome Biol.* 8, R40.
- Garside, P., Millington, O., Smith, K.M., 2004. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029, 9-15.
- Gebert, A., Bartels, H., 1995. Ultrastructure and Protein-Transport of M-Cells in the Rabbit Cecal Patch. *Anat. Rec.* 241, 487-495.
- Gebert, A., Fassbender, S., Werner, K., Weissferdt, A., 1999. The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am. J. Pathol.* 154, 1573-1582.
- Gebert, A., Rothkötter, H.J., Pabst, R., 1994. Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res.* 276, 213-221.
- Gebert, A., Rothkötter, H.J., Pabst, R., 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int. Rev. Cytol.* 167, 91-159.

- Gebert, A., Steinmetz, I., Fassbender, S., Wendlandt, K.H., 2004. Antigen transport into Peyer's patches: increased uptake by constant numbers of M cells. *Am. J. Pathol.* 164, 65-72.
- Germain, R.N., Bajenoff, M., Castellino, F., Chieppa, M., Egen, J.G., Huang, A.Y., Ishii, M., Koo, L.Y., Qi, H., 2008. Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol. Rev.* 221, 163-181.
- Gerner, W., Kaser, T., Saalmüller, A., 2008. Porcine T lymphocytes and NK cells-An update. *Dev. Comp Immunol.* 33(3), 310-320
- Greco, D., Vellonen, K.S., Turner, H.C., Hakli, M., Tervo, T., Auvinen, P., Wolosin, J.M., Urtti, A., 2010. Gene expression analysis in SV-40 immortalized human corneal epithelial cells cultured with an air-liquid interface. *Mol. Vis.* 16, 2109-2120.
- Griebel, P.J., Hein, W.R., 1996. Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol. Today* 17, 30-39.
- Grigoriadou, K., Boucontet, L., Pereira, P., 2003. Most IL-4-producing gamma delta thymocytes of adult mice originate from fetal precursors. *J. Immunol.* 171, 2413-2420.
- Grigorova, I.L., Pantelev, M., Cyster, J.G., 2010. Lymph node cortical sinus organization and relationship to lymphocyte egress dynamics and antigen exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 20447-20452.
- Grogan, J.L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D.A., Sedat, J.W., Locksley, R.M., 2001. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 14, 205-215.
- Gutierrez, O.P. Unraveling Piglet Gut Microbiota Dynamics in Response to feed Additives. Thesis 2010., Wageningen University
- Gutman, G.A., Weissman, I.L., 1972. Lymphoid tissue architecture. Experimental analysis of the origin and distribution of T-cells and B-cells. *Immunology* 23, 465-479.
- Hahn, S., Zhong, X.Y., Holzgreve, W., 2002. Single cell PCR in laser capture microscopy. *Methods Enzymol.* 356, 295-301.
- Handl, S., Wehr, U., Zentek, J., Krammer-Lukas, S., 2009. Histological and immunohistochemical evaluation of duodenal and colonic biopsies after oral bovine lactoferrin supplementation in beagle puppies. *J. Anim Physiol Anim Nutr. (Berl)* 93, 76-82.

- Hauer, A.C., Bajaj-Elliott, M., Williams, C.B., Walker-Smith, J.A., MacDonald, T.T., 1998. An analysis of interferon gamma, IL-4, IL-5 and IL-10 production by ELISPOT and quantitative reverse transcriptase-PCR in human Peyer's patches. *Cytokine* 10, 627-634.
- Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C.R., 1999. T-cell populations in the pig intestinal lamina propria: memory cells with unusual phenotypic characteristics. *Immunology* 96, 66-73.
- Haverson, K., Zuckermann, F., Saalmüller, A., Lipp, J., Aasted, B., Stokes, C.R., 1998. Summary of workshop findings for porcine adhesion molecule subgroup. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60, 351-365.
- Hedemann, M.S., Hojsgaard, S., Jensen, B.B., 2007. Lectin histochemical characterisation of the porcine small intestine around weaning. *Res. Vet. Sci.* 82, 257-262.
- Hines, M.E., Frazier, K.S., 2000. Expression of inflammatory cytokine mRNA in lymphoid tissue from swine experimentally infected with *Mycobacterium avium* serovar 2. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1487-1491.
- Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., Wilson, J., Hutto, D.L., Wannemuehler, M.J., 2005. CD4+ T-cell responses and distribution at the colonic mucosa during *Brachyspira* hyodysenteriae-induced colitis in pigs. *Immunology* 115, 127-135.
- Hopkins, S.A., Niedergang, F., Corthesy-Theulaz, I.E., Kraehenbuhl, J.P., 2000. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2, 59-68.
- Hossain, Z., Hirata, T., 2008. Molecular mechanism of intestinal permeability: interaction at tight junctions. *Mol. Biosyst.* 4, 1181-1185.
- Hühn, U., Wölfershausen, Dr.Leiding, C. Die Milchleistung der Sau - ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Ferkelaufzucht. 60-64. 2007. Zuchtwahl und Besamung 2007.
- Husband, A.J., Gowans, J.L., 1978. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J. Exp. Med.* 148, 1146-1160.
- Husband, A.J., Lascelles, A.K., 1974. The origin of antibody in intestinal secretion of sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 52, 791-799.
- Inman, C.F., Haverson, K., Konstantinov, S.R., Jones, P.H., Harris, C., Smidt, H., Miller, B., Bailey, M., Stokes, C., 2010. Rearing environment affects development of the immune system in neonates. *Clin. Exp. Immunol.* 160(3), 431-439

- Inman, L.R., Cantey, J.R., 1983. Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J. Clin. Invest* 71, 1-8.
- Itakura, E., Huang, R.R., Wen, D.R., Paul, E., Wunsch, P.H., Cochran, A.J., 2011. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod. Pathol.* 24(6), 801-809
- Izcue, A., Coombes, J.L., Powrie, F., 2009. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 313-338.
- Janczyk, P., Pieper, R., Smidt, H., Souffrant, W.B., 2009. Effect of alginate and inulin on intestinal microbial ecology of weanling pigs reared under different husbandry conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72(1), 132-142.
- Janeway, C.A., Travers, P. *Immunologie*. 1997. Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Jason R.Spence. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Christopher N.Mayhew, Scott A.Rankin, Matthew F.Kuhar, Jefferson E.Vallance, Kathryn Tolle, Elizabeth E.Hoskins, Vladimir V.Kalinichenko, Susanne I.Wells, Aaron M.Zorn, Noah F.Shroyer, and James M.Wells. 2010. *Nature*. 470, 105-109.
- Jepson, M.A., Clark, M.A., Foster, N., Mason, C.M., Bennett, M.K., Simmons, N.L., Hirst, B.H., 1996. Targeting to intestinal M cells. *J. Anat.* 189 (Pt 3), 507-516.
- Jones, B.D., Ghori, N., Falkow, S., 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180, 15-23.
- Jonjic, S., Koszinowski, U.H., 1984. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine. *J. Immunol.* 133, 647-652.
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinel, E., Hohlfeld, R., Dornmair, K., 2007. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130, 2789-2799.
- Kalies, K., Blessenohl, M., Nietsch, J., Westermann, J., 2006. 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.

- Kanneganti, T.D., Lamkanfi, M., Nunez, G., 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27, 549-559.
- Kapuscinski, J., 1995. Dapi - A Dna-Specific Fluorescent-Probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70, 220-233.
- Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmüller, A., 2008. Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 122, 153-158.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., Suzuki, H., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Wells, C., Frith, M., Ravasi, T., Pang, K.C., Hallinan, J., Mattick, J., Hume, D.A., Lipovich, L., Batalov, S., Engstrom, P.G., Mizuno, Y., Faghihi, M.A., Sandelin, A., Chalk, A.M., Mottagui-Tabar, S., Liang, Z., Lenhard, B., Wahlestedt, C., 2005. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566.
- Kelly, D., Conway, S., 2005. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol. Immunol.* 42, 895-901.
- Kelly, D., Conway, S., Aminov, R., 2005. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol.* 26, 326-333.
- Kemal Isik. Untersuchungen zur präbiotischen Wirkung von Lactulose auf die Mikroflora des Magen-Darm-Traktes von Sauen im peripartalen Zeitraum. 2004. Leipzig.
- Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.P., Pringault, E., 1997. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 277, 949-952.
- Klein, S.C., van Wichen, D.F., Golverdingen, J.G., Jacobse, K.C., Broekhuizen, R., de Weger, R.A., 1995. An improved, sensitive, non-radioactive in situ hybridization method for the detection of cytokine mRNAs. *APMIS* 103, 345-353.
- Koji, T., Hishikawa, Y., 2010. [The methods for molecular pathological analysis (in situ hybridization, in situ PCR, and HELMET)]. *Nippon Rinsho* 68 Suppl 8, 219-226.
- Konstantinov, S.R., Favier, C.F., Zhu, W.Y., Williams, B.A., Kluss, J., Souffrant, W.B., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L., Smidt, H., 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Animal Research* 53, 317-324.

- Konstantinov, S.R., Smidt, H., Akkermans, A.D., Casini, L., Trevisi, P., Mazzoni, M., De Filippi, S., Bosi, P., de Vos, W.M., 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 599-607.
- Kruml, J., Kovaru, F., Ludvik, J., Trebichavsky, I., 1970. The development of lymphoid and haemopoietic tissues in pig fetuses. *Folia Microbiol. (Praha)* 15, 17-22.
- Kuhns, M.S., Davis, M.M., Garcia, K.C., 2006. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24, 133-139.
- Kuppers, R., 2004. Molecular single-cell PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes as a tool to determine the clonal composition of normal and malignant human B cells. *Methods Mol. Biol.* 271, 225-238.
- Lapointe, T.K., O'Connor, P.M., Buret, A.G., 2009. The role of epithelial malfunction in the pathogenesis of enteropathogenic *E. coli*-induced diarrhea. *Lab Invest* 89, 964-970.
- Larsen, H.J., Landsverk, T., 1986. Distribution of T and B lymphocytes in jejunal and ileo-caecal Peyer's patches of lambs. *Res. Vet. Sci.* 40, 105-111.
- Leblond, C.P., Walker, B.E., 1956. Renewal of cell populations. *Physiol Rev.* 36, 255-276.
- Liebler-Tenorio, E.M., Pabst, R., 2006. MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research* 37, 257-280.
- Lunney, J.K., Walker, K., Goldman, T., Aasted, B., Bianchi, A., Binns, R., Licence, S., Bischof, R., Brandon, M., Blecha, F., ., 1994. Overview of the First International Workshop to Define Swine Leukocyte Cluster of Differentiation (CD) Antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 193-206.
- Ma, F., Liu, X., Li, D., Wang, P., Li, N., Lu, L., Cao, X., 2010. MicroRNA-466l upregulates IL-10 expression in TLR-triggered macrophages by antagonizing RNA-binding protein tristetraprolin-mediated IL-10 mRNA degradation. *J. Immunol.* 184, 6053-6059.
- Mach, J., Hsieh, T., Hsieh, D., Grubbs, N., Chervonsky, A., 2005. Development of intestinal M cells. *Immunol. Rev.* 206, 177-189.
- MacLennan, I.C., 1994. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117-139.
- Macpherson, A.J., Uhr, T., 2004. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029, 36-43.

- Magnusson, K.E., Stjernstrom, I., 1982. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (SIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. *Immunology* 45, 239-248.
- Makala, L.H., Kamada, T., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C.R., Bland, P.W., 2001. Ontogeny of pig discrete Peyer's patches: expression of surface antigens. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 625-636.
- Makala, L.H., Kamada, T., Nishikawa, Y., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., Haverson, K., Bailey, M., Stokes, C.R., Bland, P.W., 2000. Ontogeny of pig discrete Peyer's patches: distribution and morphometric analysis. *Pathobiology* 68, 275-282.
- Makala, L.H., Nishikawa, Y., Suzuki, N., Nagasawa, H., 2004. Immunology. Antigen-presenting cells in the gut. *J. Biomed. Sci.* 11, 130-141.
- Makalowska, I., Lin, C.F., Makalowski, W., 2005. Overlapping genes in vertebrate genomes. *Comput. Biol. Chem.* 29, 1-12.
- Malissen, B., Malissen, M., 1996. Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 383-393.
- Mannick, E., Udall, J.N., Jr., 1996. Neonatal gastrointestinal mucosal immunity. *Clin. Perinatol.* 23, 287-304.
- Mantis, N.J., Cheung, M.C., Chintalacheruvu, K.R., Rey, J., Corthesy, B., Neutra, M.R., 2002. Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J. Immunol.* 169, 1844-1851.
- Maresca, M., Yahi, N., Younes-Sakr, L., Boyron, M., Caporiccio, B., Fantini, J., 2008. Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1beta effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 84-92.
- Matheu, M.P., Cahalan, M.D., Parker, I., 2011. Immunoimaging: studying immune system dynamics using two-photon microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011(1), 147-155
- McClugage, S.G., Low, F.N., Zimny, M.L., 1986. Porosity of the basement membrane overlying Peyer's patches in rats and monkeys. *Gastroenterology* 91, 1128-1133.
- Melichar, H.J., Li, O., Herzmark, P., Padmanabhan, R.K., Oliaro, J., Ludford-Menting, M.J., Bouso, P., Russell, S.M., Roysam, B., Robey, E.A., 2010. Quantifying subcellular

- distribution of fluorescent fusion proteins in cells migrating within tissues. *Immunol. Cell Biol.* 89(4), 549-557.
- Miyazawa, K., Aso, H., Kanaya, T., Kido, T., Minashima, T., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M.T., Tahara, K., Yamasaki, T., Yamaguchi, T., 2006. Apoptotic process of porcine intestinal M cells. *Cell Tissue Res.* 323, 425-432.
- NADIS. (National Animal Disease Information Service, UK Veterinary Sentinel Practice Network), Neonatal Colibacillosis. 2009.
- Netea, M.G., Van der Meer, J.W., Suttmuller, R.P., Adema, G.J., Kullberg, B.J., 2005. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3991-3996.
- Neurath, M.F., Finotto, S., Glimcher, L.H., 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.* 8, 567-573.
- Neutra, M.R., Mantis, N.J., Kraehenbuhl, J.P., 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 2, 1004-1009.
- Nickel, R., 2003. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Parey Bei Mvs, Stuttgart*
- Niedergang, F., Kweon, M.N., 2005. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol.* 13, 485-490.
- Nochi, T., Kiyono, H., 2006. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr. Pharm. Des* 12, 4203-4213.
- Nosho, K., Baba, Y., Tanaka, N., Shima, K., Hayashi, M., Meyerhardt, J.A., Giovannucci, E., Dranoff, G., Fuchs, C.S., Ogino, S., 2010. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J. Pathol.* 222, 350-366.
- Nossol, C.; Diesing, A.K.; Walk, N.; Faber-Zuschratter, H.; Hartig, R.; Post, A.; Kluess, J.; Rothkotter, H.J.; Kahlert, S., 2011. Air-liquid interface cultures enhance the oxygen supply and trigger the structural and functional differentiation of intestinal porcine epithelial cells (IPEC). *Histochem. Cell Biol.* 136, 103-115.
- Owen, R.L., 1999. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective. *Semin. Immunol.* 11, 157-163.
- Pabst, R., 1987. The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat. Embryol. (Berl)* 176, 135-144.

- Pabst, R., Binns, R.M., 1989. Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. *Immunol. Rev.* 108, 83-109.
- Pabst, R., Geist, M., Rothkötter, H.J., Fritz, F.J., 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 64, 539-544.
- Pabst, R., Rothkötter, H.J., 2006. Structure and function of the gut mucosal immune system. *Immune Mechanisms in Inflammatory Bowel Disease. Adv. Exp. Med. Biol.* 579, 1-14.
- Pabst, R., Trepel, F., 1979. Selective labeling of mesenteric lymph nodes: cell production and emigration of newly formed lymphocytes to other organs. *Anat. Rec.* 195, 341-355.
- Paludan, S.R., 1998. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand. J. Immunol.* 48, 459-468.
- Pancer, Z., Cooper, M.D., 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 497-518.
- Pape, K.A., Catron, D.M., Itano, A.A., Jenkins, M.K., 2007. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 491-502.
- Pappo, J., Ermak, T.H., 1989. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin. Exp. Immunol.* 76, 144-148.
- Pappo, J., Mahlman, R.T., 1993. Follicle epithelial M cells are a source of interleukin-1 in Peyer's patches. *Immunology* 78, 505-507.
- Park, C.S., Choi, Y.S., 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 114, 2-10.
- Pescovitz, M.D., Aasted, B., Canals, A., Dominguez, J., Vizcaino, J.S., Pospisil, R., Sinkora, J., Salmon, H., Valpotic, I., Davis, W.C., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Zuckerman, F., Weiland, E., Saalmüller, A., 1994a. Analysis of Monoclonal-Antibodies Reactive with the Porcine Cd2 Antigen. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 229-232.
- Pescovitz, M.D., Book, B.K., Aasted, B., Dominguez, J., Ezquerra, A., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Boyd, P.C., Walker, J., Lee, R., Lackovic, G., Kirkham, P., Parkhouse, R.M.E., 1998a. Analyses

- of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60, 261-268.
- Pescovitz, M.D., Book, B.K., Aasted, B., Dominguez, J., Ezquerra, A., Trebichavsky, I., Novikov, B., Valpotic, I., Sver, L., Nielsen, J., Arn, S., Sachs, D.H., Lunney, J.K., Boyd, P.C., Walker, J., Lee, R., Davis, W., Barbosa, I.R., Zuckermann, F., Saalmüller, A., 1998b. Summary of workshop findings for antibodies reacting with porcine T-cells and activation antigens: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60, 251-260.
- Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., Sachs, D.H., 1984. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol.* 133, 368-375.
- Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., Sachs, D.H., 1985. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 134, 37-44.
- Pescovitz, M.D., Sakopoulos, A.G., Gaddy, J.A., Husmann, R.J., Zuckermann, F.A., 1994b. Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 53-62.
- Petrescu, L., Stancu, S., Tardei, G., Santimbrea, C., Penescu, M., Mircescu, G., 2010. Tuberculin skin test, interferon-gamma assay, and T cells subpopulations in hemodialysis patients. *J. Ren Nutr.* 20, S109-S117.
- Pezzulo, A.A., Starner, T.D., Scheetz, T.E., Traver, G.L., Tilley, A.E., Harvey, B.G., Crystal, R.G., McCray, P.B., Jr., Zabner, J., 2011. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 300, L25-L31.
- Pie, S., Lalles, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Seve, B., Oswald, I.P., 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 134, 641-647.
- Pinton, P., Braicu, C., Nougayrede, J.P., Laffitte, J., Taranu, I., Oswald, I.P., 2010. Deoxyribose impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J. Nutr.* 140, 1956-1962.
- Piriou-Guzylack, L., Salmon, H., 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet. Res.* 39.
- Pond, G.W., Mersmann, J.H. *Biology of the Domestic Pig.* 2001. Cornell University Press.

- Ramsingh, R., Grygorczyk, A., Solecki, A., Cherkaoui, L.S., Berthiaume, Y., Grygorczyk, R., 2011. Cell deformation at the air-liquid interface induces Ca²⁺-dependent ATP release from lung epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 300, 587-595
- Rasschaert, K., Devriendt, B., Favoreel, H., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2010. Clathrin-mediated endocytosis and transcytosis of enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 fimbriae in porcine intestinal epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 243-250.
- Regoli, M., Borghesi, C., Bertelli, E., Nicoletti, C., 1994. A morphological study of the lymphocyte traffic in Peyer's patches after an in vivo antigenic stimulation. *Anat. Rec.* 239, 47-54.
- Reiners, K., Hessel, E.F., Van den Weghe, H. Öffnen von Buchtentrennwänden bei der Haltung von ferkelführenden Sauen im Kastenstand. *Landtechnik* 2/2007, 104-105.
- Romagnani, S., 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* 18, 263-266.
- Rothkötter, H.J., Hriesik, C., Barman, N.N., Pabst, R., 1999. B and also T lymphocytes migrate via gut lymph to all lymphoid organs and the gut wall, but only IgA⁺ cells accumulate in the lamina propria of the intestinal mucosa. *Eur. J. Immunol.* 29, 327-333.
- Rothkötter, H.J., Hriesik, C., Pabst, R., 1994. Many newly formed T lymphocytes leave the small intestinal mucosa via lymphatics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 355, 261-263.
- Rothkötter, H.J., Kirchhoff, T., Pabst, R., 1994. Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. *Gut* 35, 1582-1589.
- Rothkötter, H.J., Kirchhoff, T., Pabst, R., 1995. In vivo proliferation of T and B lymphocytes in the epithelium and lamina propria of the small intestine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371A, 149-150.
- Rothkötter, H.J., Pabst, R., 1989. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology* 67, 103-108.
- Rothkötter, H.J., Pabst, R., Bailey, M., 1999. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 157-165.
- Rothkötter, H.J., Sowa, E., Pabst, R., 2002. The pig as a model of developmental immunology. *Hum.Exp. Toxicol.* 21, 533-536.
- Rothkötter, H.J., Ulbrich, H., Pabst, R., 1991. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr. Res.* 29, 237-242.

- Saalmüller, A., Hirt, W., Reddehase, M.J., 1989. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19, 2011-2016.
- Saalmüller, A., Reddehase, M.J., Buhning, H.J., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., 1987. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 17, 1297-1301.
- Saalmüller, A., Werner, T., Fachinger, V., 2002. T-helper cells from naive to committed. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 137-145.
- Sachs, D.H., 1994. The pig as a potential xenograft donor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 185-191.
- Sarrazin, E., Fritzsche, C., Bertschinger, H.U., 2000. [Main virulence factors in *Escherichia coli* isolates from swine over two weeks old with edema disease and/or *E. coli* diarrhea]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142, 625-630.
- Sartor, R.B., 2006. Microbial and dietary factors in the pathogenesis of chronic, immune-mediated intestinal inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 579, 35-54.
- Sato, A., Iwasaki, A., 2005. Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1333-1338.
- Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M.F., Wieler, L.H., Tedin, K., 2005. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 151-161.
- Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K.D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., Wieler, L.H., 2006. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem. Cell Biol.* 125, 293-305.
- Sewekow, E., Kessler, L.C., Seidel-Morgenstern, A., Rothkötter, H.J., 2008. Isolation of soybean protein P34 from oil bodies using hydrophobic interaction chromatography. *BMC Biotechnol.* 8, 27-31.
- Shaker, O.G., Moustafa, W., Essmat, S., Abdel-Halim, M., El Komy, M., 2006. The role of interleukin-12 in the pathogenesis of psoriasis. *Clin. Biochem.* 39, 119-125.

- Shimosato, T., Tohno, M., Kitazawa, H., Katoh, S., Watanabe, K., Kawai, Y., Aso, H., Yamaguchi, T., Saito, T., 2005. Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol. Lett.* 98, 83-89.
- Shirkey, T.W., Siggers, R.H., Goldade, B.G., Marshall, J.K., Drew, M.D., Laarveld, B., Van Kessel, A.G., 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231, 1333-1345.
- Sinkora, J., Rehakova, Z., Samankova, L., Haverson, K., Butler, J.E., Zwart, R., Boersma, W., 2001. Characterization of monoclonal antibodies recognizing immunoglobulin kappa and lambda chains in pigs by flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80, 79-91.
- Smith, K.A., 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240, 1169-1176.
- Soderholm, J., Ahlen, G., Kaul, A., Frelin, L., Alheim, M., Barnfield, C., Liljestrom, P., Weiland, O., Milich, D.R., Bartenschlager, R., Sallberg, M., 2006. Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut* 55, 266-274.
- Sonntag, A.K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L.H., Schmidt, M.A., Karch, H., 2005. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8855-8863.
- Stokes, C.R., Bimczok, D., Sewekow, E., Koch, J., Rau, H., Post, A., Miller, B.G., Baily, M., Rothkötter, H.J. 2006. The intestinal immune system and nutrial antigens.
- Stokes, C.R., Haverson, K., Bailey, M., 1996. Antigen presenting cells in the porcine gut. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 171-177.
- Summerfield, A., Guzylack-Piriou, L., Schaub, A., Carrasco, C.P., Tache, V., Charley, B., McCullough, K.C., 2003. Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* 110, 440-449.
- Takeuchi, T., Gonda, T., 2004. Distribution of the pores of epithelial basement membrane in the rat small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 695-700.
- Thauland, T.J., Parker, D.C., 2010. Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* 131, 466-472.

- Tingstedt, J.E., Tornehave, D., Lind, P., Nielsen, J., 2003. Immunohistochemical detection of SWC3, CD2, CD3, CD4 and CD8 antigens in paraformaldehyde fixed and paraffin embedded porcine lymphoid tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94, 123-132.
- Tohno, M., Shimosato, T., Kitazawa, H., Katoh, S., Iliev, I.D., Kimura, T., Kawai, Y., Watanabe, K., Aso, H., Yamaguchi, T., Saito, T., 2005. Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 547-554.
- Tyrer, P., Foxwell, A.R., Cripps, A.W., Apicella, M.A., Kyd, J.M., 2006. Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium. *Infect. Immun.* 74, 625-631.
- Van der Stede, Y., Verdonck, F., Verfaillie, T., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2005. Porcine-specific CpG-oligodeoxynucleotide activates B-cells and increases the expression of MHC-II molecules on lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 115-124.
- Vega-Lopez, M.A., Bailey, M., Telemo, E., Stokes, C.R., 1995. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44, 319-327.
- Vega-Lopez, M.A., Telemo, E., Bailey, M., Stevens, K., Stokes, C.R., 1993. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37, 49-60.
- Vezina, S.A., Roberge, D., Fournier, M., Dea, S., Oth, D., Archambault, D., 1995. Cloning of porcine cytokine-specific cDNAs and detection of porcine tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-1 beta gene expression by reverse transcription PCR and chemiluminescence hybridization. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 2, 665-671.
- Villasenor, J., Besse, W., Benoist, C., Mathis, D., 2008. Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15854-15859.
- Vitolo, D., Kanbour, A., Johnson, J.T., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., 1993. In situ hybridisation for cytokine gene transcripts in the solid tumour microenvironment. *Eur. J. Cancer* 29A, 371-377.
- Voswinkel, J., Kerkdijk, A.J., Mueller, A., Assmann, G., Pfreundschuh, M., Held, G., 2008. A novel system to test for specificity of B cell receptors from tissue of Wegener's granulomatosis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 26, 90-96.

- Wesley, R.D., Lager, K.M., Kehrli, M.E., Jr., 2006. Infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus stimulates an early gamma interferon response in the serum of pigs. *Can. J. Vet. Res.* 70, 176-182.
- Wieler, L.H., Ilieff, A., Herbst, W., Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R., Failing, K., Klos, H., Wengert, D., Baljer, G., Zahner, H., 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 151-159.
- Williams, A.M., Whiting, C.V., Bonhagen, K., Reimann, J., Bregenholt, S., Claesson, M.H., Bland, P.W., 1999. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) transcription and translation in the CD4+ T cell-transplanted scid mouse model of colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 116, 415-424.
- Woywodt, A., Neustock, P., Kruse, A., Schwarting, K., Ludwig, D., Stange, E.F., Kirchner, H., 1994. Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 387-395.
- Xu-Amano, J., Beagley, K.W., Mega, J., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J.R., 1992. Induction of T helper cells and cytokines for mucosal IgA responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 327, 107-117.
- Yamamoto, M., Fujihashi, K., Kawabata, K., McGhee, J.R., Kiyono, H., 1998. A mucosal intranet: intestinal epithelial cells down-regulate intraepithelial, but not peripheral, T lymphocytes. *J. Immunol.* 160, 2188-2196.
- Yamamoto, S., Fukumoto, E., Yoshizaki, K., Iwamoto, T., Yamada, A., Tanaka, K., Suzuki, H., Aizawa, S., Arakaki, M., Yuasa, K., Oka, K., Chai, Y., Nonaka, K., Fukumoto, S., 2008. Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via fibroblast growth factor expression. *J. Biol. Chem.* 283, 23139-23149.
- Yamanaka, T., Straumfors, A., Morton, H.C., Fausa, O., Brandtzaeg, P., Farstad, I.N., 2001. M cell pockets of human Peyer's patches are specialized extensions of germinal centers. *Eur. J. Immunol.* 31, 107-117.
- Yang, H., Oura, C.A., Kirkham, P.A., Parkhouse, R.M., 1996. Preparation of monoclonal anti-porcine CD3 antibodies and preliminary characterization of porcine T lymphocytes. *Immunology* 88, 577-585.
- Yang, H., Parkhouse, R.M., 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89, 76-83.

- Yang, H., Parkhouse, R.M., 1997. Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets. *Immunology* 92, 45-52.
- Youakim, A., Ahdieh, M., 1999. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am. J. Physiol* 276, G1279-G1288.
- Zabielski, R., Godlewski, M.M., Guilloteau, P., 2008. Control of development of gastrointestinal system in neonates. *J. Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 1, 35-54.
- Zentek, J., Hall, E.J., German, A., Haverson, K., Bailey, M., Rolfe, V., Butterwick, R., Day, M.J., 2002. Morphology and immunopathology of the small and large intestine in dogs with nonspecific dietary sensitivity. *J. Nutr.* 132, 1652S-1654S.
- Zhu, X., Gadgil, A.S., Givelber, R., George, M.P., Stoner, M.W., Sciruba, F.C., Duncan, S.R., 2009. Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol.* 182, 3270-3277.
- Zuckermann, F.A., 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 55-66.
- Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R., 1996. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology* 87, 493-499.

8 Anhang

8.1 *Übersicht: benutzte Geräte*

Cryostat Leica CM 3050S; Leica

Feinwaage Scaltec SBC22; Sartorius

Geldokumentation Modell FluorChem; Alpha Innotech Corporation

Heiz-Thermo-Mixer HTML132; Haep Labor Consult

Hybridisierofen Omnislide; Hybaid

Kamera Spot 2.3.1; Diagnostic Instruments Inc.

Mastercycler Gradient; Eppendorf

Mikroskop Axioplan 2 imaging; Carl Zeiss AG

Mikroskop Primostar; Carl Zeiss AG

pH-Meter CG 842; Schott

Photometer SmartSpec 3000; Biorad

Schüttler IKA-Vibrax-VXR; Janke & Kunkel

Schüttelinkubator Environmental Shaker ES-20; Lab4you

Sicherheitswerkbank Autair BSK; Camfil

Sicherheitswerkbank HeraSafe KS12; Kendro

Thermoblock Heatblock II ; VWR

Thermomixer Comfort; Eppendorf

Tischzentrifuge; Roth

Tischzentrifuge DW41BR-230; Qualitron INC.

UV Flächenstrahler N36 M; Benda

Vakuumblot Vacu-Blot VB21; Whatmann Biometra

Vortexer ReaxControl; Heidolph

Wasserbad mit Thermostat Polystat 37; Fisher Scientific

Wasserbad WB-4MS; Lab4you

Wipptisch WT15; Whatmann Biometra

Zentrifuge 5417R, Rotor F 45-30-11; Eppendorf

Zentrifuge 5810R, Rotoren F 34-6-38, A-4-62; Eppendorf

8.2 Tabellen

Epitop	Spezifität	Verdünnung	Isotyp	Klon	Herkunft
CD2 ¹	Schwein	1 : 20	IgG1 Ratte	MAC 80	VMRD, Serotec
CD3 ^{2,3}	Schwein	1 : 50	IgG1	8E6	VMRD
CD3 ^{2,3,4}	Schwein	1 : 50	IgG1κ	PPT3	SouthernBiotech
CD4 ^{3,5}	Schwein	1 : 1 – 20	IgG2b	74-12-4	VMRD
CD8 ³	Schwein	1 : 1 – 100 *	IgG2a	295/33	BD Pharmingen
CD21	Schwein	1 : 10	IgG1	5K109	USBiological
CD45 ¹	Schwein	1 : 50	IgG2a	MAC323	Serotec
Cytokeratin18 ⁶	Mensch	1 : 5000	IgG1	Cy-90	Sigma
MHC-II DR ⁷	Schwein	1 : 20	IgG2a	MSA3	VMRD
Laminin ^{8,9}	Schwein	1 : 100	IgG1 Ratte	LT3	Abcam
surfaceIg ¹⁰	Schwein	1 : 20	IgG2a	K139 3E1	Serotec
SWC3 ^{3,11}	Schwein	1 : 1 *	IgG2b	74-22-15	ATCC

Tabelle 10: Benutzte monoklonale Antikörper

Alle Antikörper sind, falls nicht anders bezeichnet, Mausantikörper. * = Hybridom-Überstände

1 (Pescovitz et al. 1994a); 2 (Pescovitz et al. 1998a); 3 (Pescovitz et al. 1998a; Tingstedt et al. 2003); 4 (Yang et al. 1996); 5 (Pescovitz et al. 1998b); 6 (Gebert et al. 1994b); 7 (Haverson et al. 1998); 8 (Eriksen et al. 1990); 9 (Eriksen et al. 1990; Yamamoto et al. 2008); 10 (Denham et al. 1998); 11 (Alvarez et al. 2000)

Epitop/Spezifität	Verdünnung	Herkunft
Ziege α Ratte IgG – TXRD	1 : 200	Abcam
Kaninchen α Ratte IgG – Biotin	1 : 100	Vector Lab.
Ziege α Maus IgG1 – FITC	1 : 100	SouthernBiotech
Ziege α Maus IgG1 – TXRD	1 : 100	SouthernBiotech
Ziege α Maus IgG2a – FITC	1 : 100	SouthernBiotech
Ziege α Maus IgG2b – FITC	1 : 100	SouthernBiotech
Ziege α Maus IgG2a – Biotin	1 : 100	SouthernBiotech
Ziege α Maus IgG2b – Biotin	1 : 100	SouthernBiotech
Ziege α Maus IgG2a – AlexaFluor488	1 : 200	Invitrogen
α DIG – AP - Fab	1 : 200	Roche Diagnostics

Tabelle 11: Benutzte sekundäre Antikörper

Spezifität	Verdünnung/ Konzentration	Herkunft
AMCA – Avidin D	1 : 50	Vector Lab.
AP – Streptavidin	1 : 50	Dianova
AP-Vectastain-ABC-Kit	lt. Protokoll	Vector Lab.
Streptavidin – AlexaFluor350	1 : 100	Invitrogen
Streptavidin – TXRD-X	1 : 200	Invitrogen
FastBlue BB Salt	lt. Protokoll	Sigma
NBT/BCIP	lt. Protokoll	Sigma

Tabelle 12: Benutzte Konjugate und Substrate

Plasmid	Merkmale/ Verwendung	Referenz
pBluescript II SK (+/-) Amp ^R	Originalplasmid/ Klonierung	Stratagene
pIL2_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	Sowa E.; Hannover*
pIL4_template_GA18	Klonierung	diese Arbeit/ Genearth
pIL4_template_BSKSII	Klonierung/ RNS-Produktion für isH	diese Arbeit
pIL4_202_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIL4_211_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIL4_256_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIL4_334_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIL10_5_587_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIL10_3_256_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIL10_6_488_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIFN γ _template_GA15kan ^R	Klonierung	diese Arbeit/ Genearth
pIFN γ _template_BSKSII	Klonierung/ RNS-Produktion für isH	diese Arbeit
pIFN γ _248_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIFN γ _266_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIFN γ _334_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIFN γ _206_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIFN γ _300_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit
pIFN γ _577_BSKSII	RNS-Sondenproduktion für isH	diese Arbeit

Tabelle 13: Benutzte und erschaffene Plasmide

Alle in der Tabelle aufgeführten Plasmide wurden bzw. waren in den Laborstamm *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' von Stratagene (Genotype: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' *proAB lacIqZAM15 Tn10* (Tetr)]) transfiziert. Dieser Stamm wurde zur Herstellung von Stammkulturen sowie zur Vermehrung der Plasmide benutzt.; * Dr. E. Sowa; Medizinische Hochschule Hannover, Anatomie II

Primer	Sequenz 5`-3`	Herkunft
IFN γ _248_A	aatgagctcgctttgcgtgactt	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _248_B	aatggtaccgaatggcctggta	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _266_A	aatgagctcaatggtggacctctt	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _266_B	aatggtaccttgcgctggatct	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _206_A	aatgagctcgctctgggaaactgaa	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _206_B	aatggtaccaggcaggatgacaat	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _300_A	aatgagctcaagccatcagtgaa	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _300_B	aatggtaccggatacaggaatcata	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _577_A	aatgagctcaatgcaagtacctcag	diese Arbeit/ MWG
IFN γ _577_B	aatggtaccggatacaggaatcata	diese Arbeit/ MWG
IL10_256_A	aatgagctccatagaagcctacatgac	diese Arbeit/ MWG
IL10_256_B	aatggtaccagaggctcggtaaata	diese Arbeit/ MWG
IL10_587_A	aatgagctccagccagcattaagtc	diese Arbeit/ MWG
IL10_587_B	aatggtaccaaccttggagcagatt	diese Arbeit/ MWG
IL10_488_A	aatgagctcagcctctctgtgaacta	diese Arbeit/ MWG
IL10_488_B	aatggtaccttcccagaggaattg	diese Arbeit/ MWG
IL4_202_A	aatgagctctctcacctcccaactg	diese Arbeit/ MWG
IL4_202_B	aatggtaccttccgctcgtgttctct	diese Arbeit/ MWG
IL4_334_A	aatgagctctcacctcccaactgat	diese Arbeit/ MWG
IL4_334_B	aatggtaccgcttcatgcacagaac	diese Arbeit/ MWG
IL4_256_A	aatgagctcctcacagcgagaaaga	diese Arbeit/ MWG
IL4_256_B	aatggtaccgcttccaagaagtc	diese Arbeit/ MWG
IL4_211_A	aatgagctcttctgccggcctcgactgt	diese Arbeit/ MWG
IL4_211_B	aatggtaccgtacctagtcagcttcaaca	diese Arbeit/ MWG

Tabelle 14: Benutzte Primer

MWG = Eurofins MWG Operon

8.3 Zur Färbung verwendete Lösungen

Methanol-Aceton; 1: 1; 80 ml Küvette

Methanol (Roth)	40 ml
Aceton (Roth)	40 ml

TBS- Stammlösung; 10x

Tris-Base (Sigma)	60,56 g
NaCl (Roth)	86,1 g
H ₂ O bidest	ad 1000 ml
HCl konz (Roth)	pH 7,6

Tween-Stammlösung; 5%

Tween 20 (Fluka)	25 ml
H ₂ O bidest	500 ml

TBS-Tween-Gebrauchslösung

TBS-Stammlösung; 10x	100 ml
Tween-Stammlösung; 5%	10 ml
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

5% Schweineserum

Je nach Bedarf 5% Schweineserum in Antikörper-Verdünnungspuffer.

PB-Stammlösung; 0,2 MLösung 1

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Roth)	35,6 g
H ₂ O bidest	1000 ml

Lösung 2

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Roth)	8,28 g
H ₂ O bidest	300 ml

Unter pH-Meter Kontrolle wird Lösung 2 zu Lösung 1 gegeben und ein pH von 7,4 eingestellt.

Antikörper-Verdünnungspuffer

PBS 0,1 M	1000 ml
BSA (Sigma)	10 g
NaN ₃ (Serva)	1 g
NaCl (Roth)	9 g

Die Lösung wird mit einem Spritzenfilter (0,22 µm Porengröße, Roth) sterilfiltriert.

Tris-Puffer 0,1 M

Tris HCl (Sigma)	1,21 g
Tris Base (Sigma)	0,28 g
H ₂ O bidest	ad 100 ml
NaOH 10 N (Riedel de Häen)	pH 8,2

APAAP-Substrat

Naphthol-AS-MX-Phosphat (Sigma)	20 mg
N, N-Dimethylformamid (Sigma)	2 ml
Tris-Puffer 0,1 M pH 8,2	98 ml
Levamisole 1 M (Sigma)	100 µl

Fast Blue-Lösung

Fast Blue BB Salt F3378 (Sigma)	2 mg
APAAP-Substrat	4 ml

Eindeckmedium für Fluoreszenz; 2% DABCO

Eindeckmedium (Vectashield)	10 ml
Glycerol konz. (Sigma)	10 ml
DABCO (Sigma)	400 mg

8.4 Nährmedium für *E. coli*

LB-(Luria-Bertani) Medium (Sigma)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurden einem Liter LB-Medium 15 g Agar zugesetzt.

Medienzusatz	Stammlösung`	Konzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O bidest	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in EtOH 50%	12,5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O bidest	50 µg/ml

Tabelle 15: Verwendete Antibiotika

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Restriktionsenzyme	Plasmid/ Zytokin	Polymerase/ resultierende Sonde
EcoRI	pIL2_BSKSII	T3 – sense-Sonde
HindIII	pIL2_BSKSII	T7 – antisense-Sonde
SacI	pIL4 (alle BSKSII)	T3 – sense-Sonde
SacI	pIL10 (alle BSKSII)	T3 – sense-Sonde
SacI	pIFN γ (alle BSKSII)	T3 – sense-Sonde
KpnI	pIL4 (alle BSKSII)	T7 – antisense-Sonde
KpnI	pIL10 (alle BSKSII)	T7 – antisense-Sonde
KpnI	pIFN γ (alle BSKSII)	T7 – antisense-Sonde

Tabelle 16: Verwendete Restriktionsenzyme, Polymerasen, Plasmide und resultierende Sonden

T3/ T7 = virale RNS-Polymerasen für in-vitro-Transkription

Zytokin	IL-2		IL-4		IL-10		IFN γ	
Enzym	EcoRI	HindIII	SacI	KpnI	SacI	KpnI	SacI	KpnI
Polymerase	T3	T7	T3	T7	T3	T7	T3	T7
Sonde	sense	antisense	antisense	sense	antisense	sense	antisense	sense

Tabelle 17: Übersicht Restriktionsenzym \leftrightarrow RNS-Polymerase \leftrightarrow DIG-markierte RNS-Sonde
antisense = komplementär zur Ziel-mRNS = bindende Sonde; sense = homolog zur Ziel-mRNS = nicht bindende negative Kontroll-Sonde; T3/ T7 = virale RNS-Polymerasen

8.5 Zur *isH* verwendete Lösungen

10x PBS-Puffer

Komplettsubstanz (Biochrom KG)	95,5 g
H ₂ O bidest	1000 ml
DEPC (Sigma)	1000 μ l
60 min Einwirkzeit, dann autoklavieren	

20x SSC-Puffer

NaCl (Roth)	175,5 g
Na-Citrat (Roth)	88,23 g
H ₂ O bidest	1000 ml
pH 7 einstellen	
DEPC	1000 μ l
60 min Einwirkzeit, dann autoklavieren	

ALP-Puffer

Tris-HCl (Sigma)	6,05 g
NaCl	4,4 g
H ₂ O bidest	500 ml
pH 9,5 einstellen und autoklavieren	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,1 g
steriel filtrieren mit Filter 0,22 μ m Porengröße (Roth)	
Lagerung bei Raumtemperatur	

RNase-Puffer

NaCl	11,69 g
Tris-HCl	6,06 g
EDTA (Sigma)	9,31 g
H ₂ O bidest	500 ml

NBT-Stammlösung (75mg/ml)

NBT (Sigma)	75 mg
DMF (Fluka)	700 µl
H ₂ O bidest	300 µl

BCIP-Stammlösung (50 mg/ml)

BCIP (Roth)	50 mg
DMF	1000 µl

0,1 M TEA-Lösung

Triethanolamin	1,86 g
DEPC	100 µl

mit 8 M NaOH auf pH 7,8 einstellen

20% DSF-Lösung

Dextransulfat (Sigma)	2 g
Formamid, deionisiert (Roth)	10 ml

im Wasserbad bei 55 °C unter Schütteln lösen

4% PFA-Lösung

Paraformaldehyd (Merck)	4 g
PBS-Puffer pH 7,6	100 ml

auf 60 °C erhitzen, bis PFA gelöst ist, dann auf Eis abkühlen

4% Triton Stammlösung

Triton X-100 (Firma)	4 ml
DEPC H ₂ O	100 ml
Lagerung bei 4 °C	

2x Hybridisierungslösung

<u>Stammlösung</u>	<u>2x Hybridisierungslösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Tris 0,5 M	200 mM	100 mM
20x SSC Puffer	0,2- 2x	0,1- 1x
EDTA 0,1 M	2 mM	1 mM
tRNS 10 mg/ml (Sigma)	1mg/ml	0,5 mg/ml
Denhardt Lösung 50x (Sigma)	2x	1x
	20% Dextransulfat	10% Dextransulfat
	100% Formamid (deion.)	50% Formamid (deion.)

Die 2x Hybridisierungslösung und die Dextransulfat-Formamid-Lösung (DSF) wurden separat bei -20 °C gelagert. Direkt vor der Verwendung wurden die Lösungen 1: 1 gemischt, wodurch sich die angegebenen Endkonzentrationen ergaben.

9 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AMCA	Aminomethylcoumarinessigsäure
APAAP	Alkalische Phosphatase anti Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BALT	Bronchus Associated Lymphoid Tissue
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
Cy	Cytokeratin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Domepithel
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
Fab	Antigenbindendes Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
isH	In-situ-Hybridisierung
ITAMs	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
KbE	Koloniebildende Einheiten
LB	Luria-Bertani
LP	Lamina propria
LT	Lebenstage

kDa	kilo Dalton
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NKZ	Natürliche Killerzelle
PCR	Polymerase Chain Reaction
PB	Phosphatbuffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PP	Peyersche Platten
T	Tage
TEA	Triethanolamin
TEER	Transepitheliale elektrische Resistenz
TBS	Tris-buffered Saline
Th	T-Helfer-Zelle
TXRD	Texas Red
SED	Subepithelialer Dom
SIRP	Signal Regulatory Protein
SM	Sauenmilch
SSC	Saline Sodium Citrat
SWC	Swine Workshop Cluster
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
ZE	Zottenepithel
ZTZ	Zytotoxische T-Zelle

Andreas Post
Feuerbachstraße 78
06114 Halle

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema:

Verteilung und Funktion immunkompetenter Zellen während der Entwicklung und des Absetzens im jejunalen Schweinedarm

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Halle, 12.8.2011

