

Aus der Anatomischen Anstalt (Lehrstuhl II)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer.nat. Dr. med U.Welsch

**Ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen
an den M-Zellen in der Cardidrüsenzzone des Schweinemagens**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Uta Gesell

aus

Karl-Marx-Stadt j. Chemnitz

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Bartels
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. L. J. Wurzinger, Priv.-Doz. Dr. J. Schirra
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	07.12.2006

Inhaltsverzeichnis	1
<hr/>	
1	Einleitung 2
1.1	Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALG)..... 2
1.2	M-Zell-Marker..... 7
1.3	Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe der Cardidrüsen- region des Schweinemagens 9
1.3.1	Der Aufbau des Schweinemagens 9
1.3.2	Die Cardidrüsenzzone des Schweinemagens..... 10
1.3.3	Die Ausbildung des lymphatischen Gewebes in der Cardidrüsenzzone des Schweinemagens 11
1.4	Fragestellung 13
2	Material und Methoden 14
2.1	Organentnahme, Fixierung und Einbettung der Gewebeproben..... 14
2.2	Lichtmikroskopie 17
2.2.1	Übersichtsfärbungen mit HE, PAS und Alcianblau 17
2.2.2	Immunhistochemie 18
2.3	Elektronenmikroskopie – Immungold-Methode 21
2.4	Mikroskopische Technik..... 22
3	Befunde 23
3.1	Lichtmikroskopische Charakterisierung der Cardidrüsen des Schweinemagens..... 23
3.2	Ultrastruktur der M-Zellen 28
3.3	Immunhistochemie 32
3.4	Immungold-Elektronenmikroskopie 44
4	Diskussion 45
5	Zusammenfassung 52
6	Literaturverzeichnis..... 54

1 Einleitung

1.1 Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALG)

Epithelien bilden physische Barrieren, die den Organismus vor potentiellen Pathogenen wie Bakterien, Viren oder Toxinen schützen. Zusätzlich werden die äußere und die inneren Körperoberflächen ständig immunologisch überwacht. Die äußere Körperoberfläche wird von dem vielschichtigen verhornten Plattenepithel der Epidermis gebildet, das vor mechanischen, thermischen, chemischen und mikrobiologischen Noxen schützt, und in dem sich die intraepidermalen Langerhans-Zellen und Lymphozyten mit eingedrungenen Antigenen auseinandersetzen (Streilein 1983). Dagegen weisen die Schleimhäute, deren Gesamtoberfläche die der äußeren Haut um einen Faktor von ca. 200 übertrifft (Gebert et al. 2000), meist nur ein einschichtiges Epithel auf. Ihnen kommt beim initialen Antigenkontakt eine besondere Bedeutung zu. Zum Schutz dieser Oberflächen haben sich daher zusätzliche immunologische Abwehrmechanismen entwickelt. Hierfür sind vor allem im Darm (Owen und Jones 1974, Bockman 1983, Gebert et al. 1996), aber auch im Oropharynx, in den Ausführungsgängen der kleinen Speicheldrüsen (Gebert und Pabst, 1999), entlang der oberen und unteren Atemwege (Racz et al. 1977, Bienenstock et al. 1982, v.d. Brugge-Gamelkoorn 1986) und in der Konjunktiva (Chandler und Axelrod 1980, Knop und Knop 2000) mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (mucosal-associated lymphoid tissue, MALT, Bienenstock et al. 1978) ausgebildet.

Eine solche immunologische Schutzfunktion ist für den Dünndarm besonders wichtig, denn er verfügt für eine effektive Nährstoffresorption durch die Ausbildung von Falten, Zotten und Mikrovilli einerseits über eine vergleichsweise große Oberfläche (Mowat und Viney 1997), ist andererseits stets in großem Umfang von

Mikroorganismen besiedelt und kommt über die Nahrung ständig mit Toxinen und Nahrungsmittelantigenen in Kontakt. Beim Gesunden ist die epitheliale Barriere für niedermolekulare Substanzen wie Aminosäuren, Fettsäuren und Saccharide selektiv permeabel, jedoch werden Makromoleküle, Partikel und Mikroorganismen am Eindringen gehindert (Bjarnason et al. 1995). Neben zahlreichen unspezifischen Schutzmechanismen des Verdauungskanal wie z.B. Speicheldrüsensekretion, niedriger pH-Wert im Magen, Schleimproduktion, Darmmotilität und bakterielle Besiedelung durch die residente Flora, finden sich organisierte lymphatische Gewebe zur Einleitung von spezifischen Immunantworten in den Tonsillen und entlang der Darmwand: die Peyer'schen Plaques des Dünndarms (Folliculi lymphatici aggregati), die Appendix vermiformis, lymphatische Plaques im Colon und Rektum sowie Solitärfoellikel (Folliculi lymphatici solitarii). Darüber hinaus befindet sich lymphatisches Gewebe in unterschiedlicher Ausprägung im Magen (Plenk 1932). Das gesunde intestinale Immunsystem kann zwischen invasiven Pathogenen und harmlosen Antigenen von Nahrungsproteinen und Darmbakterien unterscheiden. Der letztere Fall führt zu einer Immuntoleranz (Mowat et al. 2003).

In den Darm-assoziierten lymphatischen Geweben (gut-associated lymphoid tissue, GALT) stehen die Lymphfollikel in einer engen topographischen Beziehung zur Oberflächenschleimhaut, die sich meist kuppelartig ins Lumen vorwölbt (Dome-Areal) und ein spezialisiertes Epithel aufweist. Dieses Dome-Epithel oder Follikel-assoziierte-Epithel (FAE) gewährleistet für eine effektive Überwachung des Darminhalts einen direkten Zugang zu potentiell makromolekularen Pathogenen, um gegebenenfalls eine spezifische Immunantwort zu erzeugen.

In diesem Follikel-assoziierten-Epithel gibt es zahlreiche hochspezialisierte Epithelzellen, sog. M-Zellen („microfold“ cells oder „membranous“ cells“), die in engem Kontakt zu intraepithelial gelegenen Lymphozyten stehen (Owen und Jones

1974). Sie nehmen ständig Proben aus dem Darmlumen auf und leiten diese an die darunter liegenden Zellen des Immunsystems weiter, ohne dass diese in den nur in geringer Zahl vorhandenen Lysosomen abgebaut werden (Owen 1977). Die M-Zellen sind somit Antigen-transportierende Zellen. Dabei vollziehen sie eine Art Stichprobenverfahren für luminale Antigene, so dass Immunzellen in Kontakt mit potentiellen Pathogenen kommen (Kraehenbuhl und Neutra 1992, Neutra et al. 1996). Inwieweit M-Zellen auch MHC-II-Klasse-Moleküle aufweisen (Allan et al. 1993) und selbst Antigene präsentieren, ist nach wie vor umstritten. Durch diesen Vorgang der Antigenaufnahme bleibt die intestinale Barriere erhalten, der Kontakt des Immunsystems mit der Außenwelt ist jedoch gleichzeitig gegeben. So nehmen M-Zellen eine Schlüsselrolle für die Einleitung von lokalen oder systemischen Immunantworten oder von Immuntoleranz ein (Pabst 1987, Gebert et al. 1999b).

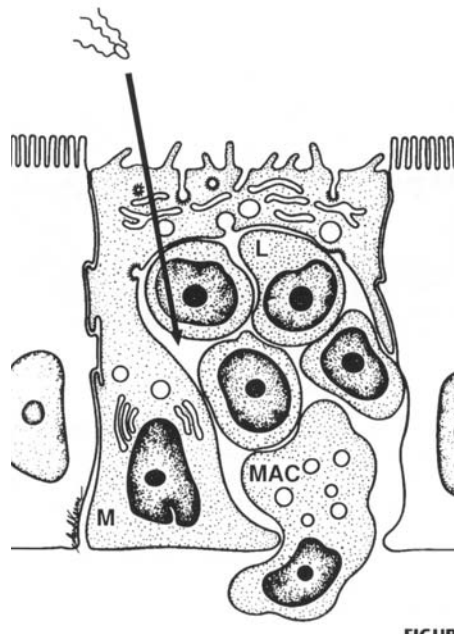


Abbildung 1.1.1 Diagramm einer M-Zelle Die basale Plasmamembran der M-Zellen (M) bildet eine intraepitheliale Tasche gefüllt mit Lymphozyten (L) und Makrophagen (MAC). M-Zellen transportieren luminale Antigene direkt zu den in dieser Tasche und unter dem Epithel gelegenen immunkompetenten Zellen (aus Neutra 1992).

Nach der Initiierung einer Immunreaktion z.B. in den Peyer'schen Plaques als Teil des organisierten Mukosa-assoziierten Lymphgewebes verlassen aktivierte B-Lymphozyten und Lymphoblasten die Darmwand über efferente Lymphgefäße, wandern über intestinale Lymphgefäße, mesenteriale Lymphknoten, Ductus thoracicus und schließlich über das Blut wieder bevorzugt in die Lamina propria des Darms zurück (Scicchitano et al. 1986, Brandtzaeg et al. 1999a). Hier differenzieren sie sich als Teil des diffusen Mukosa-assoziierten Lymphgewebes zu Plasmazellen und produzieren Immunglobulin A (IgA), das nach Transzytose durch das Darmepithel als sIgA (sekretorisches IgA) potentielle Pathogene im Darmlumen agglutiniert und auf diese Weise am Eindringen in die Schleimhaut hindert (Neutra und Kraehenbuhl 1992) (Abbildung 1.1.2).

Im Darmlumen neutralisiert IgA ferner ohne Aktivierung des Komplementsystems bakterielle Toxine und schützt so gegen mukosale Entzündungsreaktionen (Biewenga et al. 1993). Auch zeigen Migrationsstudien, dass Lymphoblasten aus dem Darm ebenso zu den Schleimhäuten anderer Organe wandern (Brandtzaeg et al. 1999b). Dieses am Darm beschriebene Konzept des MALG ist auch auf andere Schleimhäute anwendbar, in denen Lymphfollikel vorkommen (Gebert und Pabst 1999).

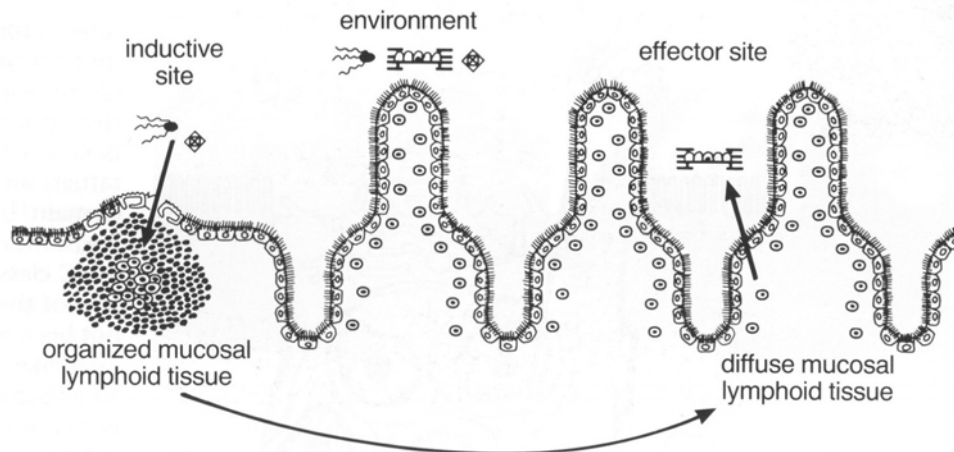


Abbildung 1.1.2 Das Mukosa-assoziierte Immunsystem: afferenter („inductive site“) und efferenter („effector site“) Schenkel des MALT am Beispiel der Peyer'schen Plaques. Das Immunsystem ist von Antigenen und Mikroorganismen z.B. aus dem Darmlumen (hier „environment“) durch ein Epithel abgegrenzt. Antigene werden von M-Zellen, die nur im Follikel-assoziierten-Epithel oberhalb von organisiertem Lymphgewebe (Follikel) auftreten, in das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe aufgenommen. Aktivierte B-Zellen, die von Antigenen in den Lymphfollikeln stimuliert worden sind, wandern zu entfernten Drüsen- und Schleimhautgeweben, wo sie sich in IgA-produzierende Plasma-Zellen, die einen Teil des diffusen Mukosa-assoziierten Lymphgewebes repräsentieren, differenzieren. IgA Antikörper werden über Rezeptor-vermittelte Transzytose durch das Drüsen- und Schleimhautepithel transportiert und nach Abspaltung vom Rezeptor als sIgA (sekretorisches IgA) sezerniert, so dass sie im Darmlumen mit Antigenen interagieren können. Ein Bakterium, Virus und sIgA wird im Darmlumen gezeigt (aus Neutra und Kraehenbuhl 1992).

Die ersten Beschreibungen von M-Zellen gehen auf Dünnschnitt-Elektronenmikroskopie an der Appendix des Kaninchens (Bockman und Cooper 1973) sowie auf Raster-Elektronenmikroskopie an den Peyer'schen Plaques des Menschen zurück (Owen und Jones 1974). Zumeist weisen M-Zellen eine unregelmäßige apikale Oberfläche mit kurzen Mikrovilli oder Mikrofallen (Microplicae) oder sogar eine flache Oberfläche auf (Owen und Jones, 1974, Owen und Nemanic 1978, Chu et al. 1979, Bockman 1983). Mit ihrer basolateralen Membran umfassen

sie taschenartig intraepitheliale Lymphozyten und gelegentlich Makrophagen (Schmedtje 1980, Jarry et al. 1989). Oft ist diese Tasche der basolateralen Membran so weit eingefaltet, dass nur eine „membranös“ dünne Zytoplasmaschicht das Lumen von den umschlossenen Lymphozyten trennt. Auf diese Weise verkleinert sich die Distanz zwischen der apikalen und der Taschenmembran und das Durchschleusen von Antigenen wird effizienter (Neutra et al. 1996). Dieser membranös dünne Zytoplasmabereich zwischen den beiden Membranen führte zu dem heutigen Ausdruck „membranous“ (M) Zelle.

Die Fähigkeit der Transzytose von Antigenen durch M-Zellen wurde experimentell in zahlreichen Studien mit makromolekularen und partikulären Tracern nachgewiesen (Bockman und Cooper 1973, Owen 1977, Wolf et al. 1981, Rosen et al. 1981, Owen et al. 1986, Neutra et al. 1987, Weltzin et al. 1989, Neutra und Kraehenbuhl 1992, Gebert 1995, Gebert und Bartels 1995). In Anbetracht der Tatsache, dass M-Zellen in den verschiedenen Lokalisationen und Spezies ultrastrukturell erhebliche morphologische Unterschiede aufweisen können, ist diese funktionelle Eigenschaft der M-Zellen das am besten geeignete Merkmal für ihre Definition (Gebert 2000).

1.2 M-Zell-Marker

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Morphologie allein nicht ausreicht, um alle M-Zellen eindeutig zu erfassen (Torres-Medina 1981, Inman und Cantey 1983, Bye et al. 1984, Gebert und Hach 1993). M-Zellen lassen sich zwar elektronenmikroskopisch identifizieren, nicht jedoch ohne weiteres mit lichtmikroskopischen Routinetechniken, da sie sich oft nur schwer von Enterozyten

unterscheiden. Daher wurde die besondere Struktur der M-Zellen in verschiedenen Lokalisationen charakterisiert, und es wurden histochemische Marker zum Nachweis von M-Zellen etabliert. Die derzeit verfügbaren Marker umfassen Besonderheiten in der Enzymaktivität, bislang nicht identifizierte Protein-Epitope, Besonderheiten des Zytoskeletts und membranständige Glykoproteine und/oder Glykolipide (Gebert 2000). Es wurde jedoch bisher kein universeller histochemischer Marker für M-Zellen gefunden und die meisten für M-Zellen beschriebenen, histochemischen Besonderheiten sind auf individuelle Tierarten oder sogar Lokalisationen von MALT beschränkt. So stellt Vimentin einen zytoplasmatischen Marker für M-Zellen des Kaninchens dar (Gebert et al. 1992, Jepson et al. 1992, Gebert 1995, Gebert 1996), während M-Zellen in den Peyer'schen Plaques und den Tonsillen des Schweines Zytokeratin 18 enthalten (Gebert et al. 1994). Dagegen unterscheiden sich M-Zellen in den Peyer'schen Plaques von BALB/c-Mäusen nicht in der Komposition der Intermediärfilamentproteine von den benachbarten Enterozyten, wohl aber in der Glykokalyx ihrer apikalen Membran, die große Mengen an Fukoseresten enthält, die durch das Lektin UEA-I nachgewiesen werden können (Clark et al. 1994, Gebert et al. 1999a).

Die Mehrzahl der Untersuchungen an M-Zellen konzentriert sich auf Mäuse, Ratten, Kaninchen sowie menschliche Gewebeproben. Andere Spezies wie z.B. Meerschweinchen, Schwein, Schaf oder Rind sind weniger gut untersucht, und für M-Zellen von Hund, Affen, Koala und Huhn liegen nur einzelne Befunde vor (Atkins und Schofield 1972, Naukkarinen et al. 1978, Beezhold et al. 1983, Kato et al. 1992, Hanger und Heath 1994, Davenport und Allen 1995).

1.3 Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe der Cardidrüsenregion des Schweinemagens

Nachdem anfangs vornehmlich die M-Zellen der Peyerschen Plaques in verschiedenen Spezies untersucht worden sind, wurden anschließend auch M-Zellen in anderen Abschnitten des Verdauungstrakts wie z.B. dem Dickdarm (Liebler et al. 1988) ausgemacht und identifiziert. Obwohl Ellenberger bereits 1884 in der von ihm zuerst beschriebenen Cardidrüsenzzone des Schweinemagens entdeckte, dass hier reichlich lymphatisches Gewebe anzutreffen ist und zwar viel mehr, als in den übrigen Regionen des Magens und bei anderen Haussäugetieren, gibt es bislang jedoch noch keine Untersuchungen über das Vorkommen von M-Zellen im Magen.

1.3.1 Der Aufbau des Schweinemagens

Das Schwein besitzt einen einhölig-zusammengesetzten Magen, der aus einer Pars nonglandularis, bedeckt von einer drüsenlosen „kutanen“ Schleimhaut, und einer Pars glandularis, bedeckt von einer drüsenhaltigen Schleimhaut, besteht. Ferner weist der Schweinemagen als arttypisches Merkmal einen dem Fundus aufsitzenden, kapuzenförmigen Blindsack, Diverticulum ventriculi, auf, der sich an seiner Basis durch die Spiralfalte vom restlichen Magen absetzt (Nickel et al. 2004).

Die „kutane“ Schleimhaut der Pars nonglandularis ist makroskopisch von weißlicher Farbe, glatt und derb und trägt auf einem deutlichen Papillarkörper ein zum Teil verhorntes, vielschichtiges Plattenepithel. Dieser Teil, der auf Grund des Epithels auch Pars oesophagea genannt wird, bildet in der Umgebung der Einmündung des Ösophagus in den Magen (Cardia), ein langgezogenes, ovales Feld, das über die Spiralfalte hinweg einen kleinen Teil des Divertikels auskleidet (Nickel et al. 2004).

Die Pars glandularis setzt sich aus drei Zonen zusammen (König und Liebich, 2003):

- Cardiadrüsenzzone (Pars cardiaca) mit Cardiadrüsen (Gll. cardiacae)
- Fundusdrüsenzzone (Pars propria) mit Fundusdrüsen (Gll. gastricae propriae)
- Pylorusdrüsenzzone (Pars pylorica) mit Pylorusdrüsen (Gll. pyloricae).

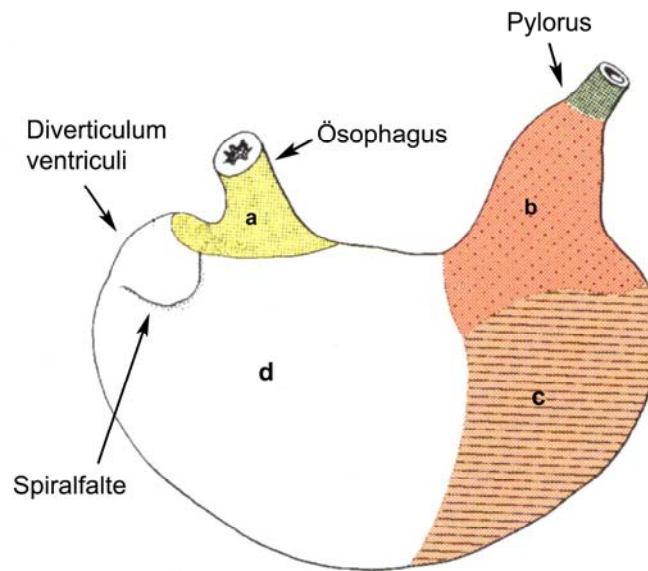


Abbildung 1.3.1 Schematische Darstellung eines Schweinemagens. a Pars nonglandularis sive oesophagea, b Pars pylorica, c Pars propria, d Pars cardiaca (aus König und Liebich 2003)

1.3.2 Die Cardiadrüsenzzone des Schweinemagens

Die Cardiadrüsenzzone ist beim Schwein auffallend groß: Sie umfasst etwa ein Drittel der Drüenschleimhaut des Magens und kleidet einen Teil des Corpus ventriculi einschließlich des Fundus und des Divertikels aus. Hierbei sei angemerkt, dass die Cardiadrüsenzzone gemäß ihrer Bezeichnung nicht nur in der Cardia lokalisiert ist, sondern sich bis weit in die Region des Magenfundus ausdehnt. Sie besitzt eine blassrote Farbe, ist glatt, von weicher Konsistenz und setzt sich scharf gegen die Pars nonglandularis sowie gegen die Zone der Fundusdrüsen ab. Durch eine schmale Schleimhautbrücke steht sie an der kleinen Kurvatur mit der

Pylorusdrüsenzzone in Verbindung (Nickel et al. 2004). Im Gegensatz zu den anderen Drüsenzonen ist die Schleimhaut im Bereich der Cardidrüsenzzone relativ dünn (Trautmann 1925).



Abbildung 1.3.2 Innenansicht eines Schweinemagens

1 Cardidrüsenzzone, 2 Einmündung des Ösophagus, 3 Pars oesophagea („kutane“ Schleimhaut mit mehrschichtigem Plattenepithel) (aus König und Liebich 2003)

1.3.3 Die Ausbildung des lymphatischen Gewebes in der Cardidrüsenzzone des Schweinemagens

Die Magenschleimhaut des Schweins ist sehr reich an lymphatischem Gewebe, wobei die Cardidrüsenzzone an hervorragender Stelle steht (Nickel et al. 2004). Trautmann (1925) spricht von einem Ausmaß lymphatischen Gewebes in der Magenschleimhaut des Schweines, insbesondere in der Cardidrüsenzzone, wie es im Magen keines anderen Haustieres gefunden wird. Die Cardidrüsenzzone weist sowohl einen Reichtum an Solitärfollikeln (Noduli lymphatici solitarii) als auch

makroskopisch sichtbare Anhäufungen von Follikeln, regelrechte Platten (Noduli lymphatici aggregati), in der Schleimhaut auf (Fröhlich 1907, Mönning 1909, Trautmann 1925, Nickel et al. 2004). Ellenberger (1911) spricht sogar von einem Magentonsillarkomplex, in dem auf einen cm² Magenfläche 15-50 „Lymphknötchen“ vorkommen.

Die Lymphfollikel befinden sich vornehmlich in der Grenzzone der Cardidrüsen-schleimhaut zu den benachbarten Schleimhautfeldern hin und im Divertikel. Eine starke Anhäufung findet sich ferner in der Schleimhautbrücke an der kleinen Kurvatur des Magens, wo alle drei Drüsenzonen zusammentreffen (Nickel et al. 2004). In der Nachbarschaft zur Pars nonglandularis häufen sich die Lymphfollikel in der Cardidrüsenzzone derart, dass stellenweise überhaupt kein Zwischenraum zwischen den einzelnen Noduli bleibt, so dass solche Stellen den Eindruck einer „Lymphknötchenplatte“, ähnlich den Peyer'schen Plaques im Darm, hervorrufen (Trautmann 1925).

Die Größe, Form sowie der Sitz der Follikel sind verschieden. Die Follikel liegen in der Regel in der Lamina propria mucosae und ragen von hier in die Höhe, wobei sie die Cardidrüsen zur Seite drängen. Vielfach reichen sie bis an das Oberflächenepithel heran (Ellenberger 1911). Die größeren, insbesondere die aus mehreren Follikeln bestehenden Plaques, buchten die Schleimhaut deutlich vor. Große Follikel reichen oft in die Submucosa, wobei dann die Muscularis mucosae unterbrochen wird. Hierbei werden die Foveolae gastricae und die Cardidrüsen meist zur Seite gedrängt und verlagert (Trautmann 1925).

1.4 Fragestellung

Wie bereits oben erwähnt, haben Ellenberger (1884) und in der Nachfolge Trautwein (1925) auf den Reichtum an lymphatischem Gewebe in der Schleimhaut insbesondere der Cardidrüsenregion des Magens vom Schwein hingewiesen. Detaillierte Untersuchungen insbesondere zum Vorkommen von M-Zellen fehlen jedoch. Das Ziel dieser Arbeit ist es deshalb zunächst mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden zu klären, ob das Epithel in der Nachbarschaft der Lymphfollikel in der Cardidrüsenzzone des Schweinemagens Zellen enthält, die morphologisch die Kriterien von M-Zellen erfüllen. Darüber hinaus wurde das Epithel der Cardidrüsenregion mit einer Reihe von Antiseren gegen Intermediärfilamentproteine immunhistochemisch mit dem Ziel untersucht, ob Unterschiede in der Zytokeratinexpression zwischen den verschiedenen Epithelzellen vorliegen, insbesondere ob einzelne Zellen sich selektiv mit einem Anti-Zytokeratin-18-Antiserum darstellen lassen, das sich als Marker für M-Zellen in den Tonsillen und Peyer'schen Plaques des Schweins erwiesen hat (Gebert et al. 1994).

2 Material und Methoden

2.1 Organentnahme, Fixierung und Einbettung der Gewebeproben

Die Cardidrüsenschleimhaut wurde von insgesamt 14 Schweinen, die auf dem Schlachthof München und von einem privaten Schlachter aus Kirchdorf bei Allershausen getötet wurden, untersucht. Darunter waren eine 1½-jährige, zwei 2-jährige und eine 4-jährige Sau, die restlichen Schweine (Sauen oder männliche Kastrate) waren allesamt 6 Monate alt.

Nach Elektrobetäubung und Ausbluten erfolgte ein ventral medianer Längsschnitt und die Entnahme des Magen-Darm-Traktes durch den Schlachter. Der Magen wurde entlang der großen Kurvatur aufgeschnitten, der Inhalt verworfen, die Cardidrüsenschleimhaut am Divertikel aufgesucht, mit Ringer-Laktat-Lösung gespült und kleine Schleimhautstücke von einer Größe von 1 x 2 cm aus folgenden Stellen entnommen (Abb.2.1.1):

- Übergang Pars nonglandularis – Pars cardiaca (entlang des Margo plicatus)
- Pars cardiaca aus dem schmalen Schleimhautstreifen Richtung Pars pylorica (= Schleimhautbrücke)
- Pars cardiaca aus dem Diverticulum

Außerdem wurden aus dem terminalen Ileum Gewebeproben entnommen, die Peyer´sche Plaques enthielten.

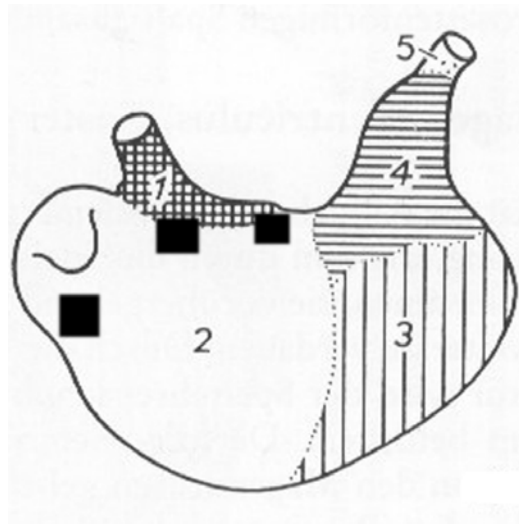


Abbildung 2.1.1 Entnahmestellen der Schleimhautproben Die schwarzen Quadrate kennzeichnen die entnommenen Schleimhautareale.

1. Kutane, drüsenlose Schleimhaut des Ösophagus und der Pars oesophagea (kariert)
2. Cardiadrüsenzzone (weiß)
3. Fundus- oder Eigendrüsenzzone (längsgerichtet)
4. Pylorusdrüsenzzone (quergerichtet)
5. Duodenalschleimhaut

(modifiziert nach Nickel et al. 2004)

Alle Präparate wurden sofort nach der Entnahme in einer der folgenden Lösungen fixiert:

- A) 4,5 % Formaldehyd (FA) in PBS 0,1 M, pH 7,4
- B) 100 % Alkohol
- C) 3,5 % Glutaraldehyd (GA) in Na-Cacodylat-HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,4)
- D) 2,5 % GA und 2 % FA in Na-Cacodylat-HCl-Puffer 0,1 M.

Zwischen der Tötung des Schweins und der Fixierung der Schleimhautstücke lagen im Schlachthof ca. 20 min, beim privaten Schlachter ca. 4 min.

Einbettung in Paraffin für die Lichtmikroskopie und Immunhistochemie

Die in 4,5 % Formaldehyd fixierten Schleimhautstücke wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und in Paraffin eingebettet. Die in Alkohol fixierten Schleimhautstücke wurden gleich über Xylol in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Schlittenbahnmikrotoms (LEICA SM 2000R) wurden Schnittserien mit einer Dicke von ca. 5 µm angefertigt.

Einbettung in Epon für die Elektronenmikroskopie

Die in den Lösungen C und D fixierten Gewebeproben wurden unter einem Stereomikroskop in Blöcke mit einer Kantenlänge von 1-2 mm zerkleinert, gründlich in 0,1 M Na-Cacodylat-HCl-Puffer gewaschen, in einer 1 % OsO₄ Lösung in Aqua bidest. für 2h nachfixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und über Propylenoxid in Kunstharz (Epon[®] 812) eingebettet. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Reichert-Jung, Ultracut) wurden zunächst 0,5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Toluidinblau (1 g Toluidinblau in 100 ml Aqua dest. und Zusatz von 1 g Borax) gefärbt. Anhand dieser Schnitte wurden für Ultradünnschnitte geeignete Gewebeareale ausgesucht. Ultradünnschnitte (ca. 60 nm dick) wurden auf Kupfernetze oder mit Pioloform beschichteten Einlochblenden aufgefangen und nach Standardverfahren mit gesättigten wässrigen Lösungen von Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert (Reynolds 1963).

Für die Immun-Gold-Technik wurden zusätzlich kleine Gewebeproben, die in Lösung A fixiert wurden, in Epon eingebettet. Diese Proben wurden statt in 0,1 M Na-Cacodylat-HCl-Puffer in PBS gespült und nicht mit OsO₄ nachfixiert.

2.2 Lichtmikroskopie

2.2.1 Übersichtsfärbungen mit HE, PAS und Alcianblau

Zur Übersicht wurden von jedem Block Paraffinschnitte einer Hämalaun-Eosin-, einer PAS- oder einer Alcianblau-Färbung nach Standardmethoden unterzogen. Alle Schnitte wurden dann in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und nach erfolgter Färbung in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Eukitt eingedeckt.

Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung):

Farbstoffe:

- saures Hämalaun nach Mayer: 1 g Hämatoxylin und 0,2 g Natriumjodatin + 50 g Kalialaun in 1 l Aqua dest. lösen, dazu noch 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure geben. Die Lösung wurde vor Gebrauch filtriert.
- 1 % wässriges Eosin G

Durchführung der Färbung:

Die Färbung mit Hämalaun nach Mayer erfolgte für 5 Minuten, anschließend wurden die Objektträger 15 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Daraufhin wurden sie für eine Minute in 1 % Eosin gefärbt und kurz in Aqua dest. ausgewaschen (10 Sekunden).

PAS-Färbung:

Farbstoff:

- Schiff'sches Reagenz
- saures Hämalaun nach Mayer: s.o.

Durchführung der Färbung:

Die Objektträger wurden für 10 Minuten in 1 % Perjodsäure inkubiert, dann 3 mal für 2 Minuten in Aqua dest. gespült, für 5 Minuten in Schiff'sches Reagenz und

anschließend für eine Minute in SO₂-Wasser (10 ml 1 N HCL + 10 ml 10 % K-Metadisulfid ad 200 ml Leitungswasser) inkubiert und für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 4 Minuten in Hämalaun nach Mayer (s.o.) gefärbt und in fließendem Leitungswasser für 15 Minuten gebläut.

Alcianblau-Färbung:

Farbstoffe:

- Alcianblau: 1 g Alcianblau 8 GS in 100 ml 3 % Essigsäure lösen, den pH auf 2,5 einstellen und Lösung vor Gebrauch filtrieren.

Durchführung der Färbung:

Die Schnitte wurden für 3 Minuten in 3 % Essigsäure getaucht, anschließend für 30 Minuten in Alcianblau gefärbt, kurz in 3 % Essigsäure und dann für 2 Minuten im Leitungswasser gespült. Anschließend wurden sie für 3 Minuten in Aqua dest. gespült.

2.2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen an Paraffinschnitten wurde der indirekte Nachweis mittels der Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex- (ABC-) Technik eingesetzt (Hsu et al. 1981). Als primäre Antikörper dienten jeweils monoklonale oder auch polyklonale Antiseren gegen verschiedene Zytokeratine, Vimentin und Desmin (Tabelle 2.1). Zur Differenzierung von serösen und mukösen Drüsenzellen kam ein Anti-Lysozym-Antiserum zum Einsatz. Alle sekundären Antikörper stammten von der Ziege. Einige immunhistochemische Schnittserien wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

Tabelle 2.1

<u>KLON</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Quelle</u>	<u>Arbeitsverdünnung für Formaldehyd (FA)-und Alkohol (A)- fixierte Gewebe</u>
K8.13	Zytokeratine 1,5,6,7,10,11,8,18	Sigma	FA 1:100, A 1:2000
KS 18.04 biotinyliert	Zytokeratin 18	Progen	FA 1:100, A 1:200
DC-10	Zytokeratin 18	Serotec	FA 1:4000 A 1:320000
CY 90	Zytokeratin 18	Sigma	FA 1:10000, A 1:500000
170.2.14	Zytokeratin 19	Boehringer	FA 1:2000, A 1:10000
OV-TL 12/30	Zytokeratin 7	Dako	FA 1:100, A 1:1000
35βH11	Zytokeratin 8	Dako	A 1:50
6B10	Zytokeratin 4	Serotec	FA 1:300, A 1:1000
D5/16B4	Zytokeratin 5/6	Boehringer	FA 1:50, A 1:250
LL002	Zytokeratin 14	Serotec	FA 1:50, A 1:1000
VIM 13.2	Vimentin	Sigma	FA 1:400, A 1:800
ZC18	Desmin	Zymed	FA 1:1, A 1:10
A0099, N1515	Lysozym EC3.2.1.17	Dako	A 1:1000

Paraffineinbettung, ABC-Methode:

Nach Paraffin-Entfernung der Formalin-fixierten Präparate in Xylol und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe erfolgte die Demaskierung der Antigene durch Erhitzen in einer mit Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0) gefüllten Küvette 3x5 Minuten in der Mikrowelle (Reynolds et al. 1994, Brown u. Chirala 1995). Nach Abkühlen bei

Raumtemperatur (ca. 15 Minuten) wurden die Schnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidase 10 Minuten mit 3 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt. Danach wurden die Präparate mit 0,004 % Trypsin in PBS (0,15 M NaCl) bei 37 °C im Brutschrank für 20 min angedaut und anschließend mit Leitungswasser gespült. Daraufhin wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 3 % Schweine-Nullserum blockiert (30 Minuten, 20 °C) und mit den verschiedenen primären Antikörpern in den spezifischen Verdünnungen nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-(ABC-)Methode inkubiert (24 h, 4 °C) (Hsu et al., 1981). Die Inkubationszeit mit dem sekundären Antiserum (biotinyliertes IgG), das zusätzlich 1,5 % Schweine-Nullserum enthielt, betrug 45 Minuten bei 20 °C. Hierauf erfolgte die Behandlung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (VECTOR) ebenfalls für 45 Minuten bei 20 °C.

Die eingesetzten Antiseren und Reagenzien wurden in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung verdünnt (0,01 M Phosphatpuffer (PB), in 0,15 M NaCl- Lösung, pH 7,3). Die Verdünnung der ABC-Reagenzien erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Der Ansatz für den Peroxidasekomplex-Nachweis bestand aus 0,7 mM DAB (3'3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, SIGMA No. D 5637) und 0,06 % Wasserstoffperoxid in 0,15 M NaCl-Puffer, pH 7,6. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei einer Temperatur von 20 °C.

Zwischen den oben genannten Arbeitsschritten wurden die Schnitte jeweils gründlich mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gespült. Diese bestand aus 0,01 M Phosphatpuffer in 0,15 M NaCl-Lösung, pH 7,6. Zum Schluss wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und über Xylol mit Eukitt eingedeckt.

Alkohol-fixierte Schnitte

Bei den Alkohol-fixierten Präparaten war keine Mikrowellen-Vorbehandlung nötig. Die Verdünnung des primären Antikörpers konnte um den Faktor 10-1000 erhöht werden. Ansonsten entsprach das immunhistochemische Protokoll dem der Formalin-fixierten Präparate.

Spezifitätskontrollen

Zum Ausschluss von methodisch bedingten unspezifischen Reaktionen wurden Spezifitätskontrollen durchgeführt (Grube und Kusomoto 1986, Sternberger 1986, Grube und Yoshie 1989). In Negativkontrollen wurden die Primär-Antiseren, der zweite Antikörper oder der ABC-Komplex durch Puffer ersetzt bzw. ausgelassen. Zusätzlich wurden besonders hohe Verdünnungen des Primär-Antikörpers in Verdünnungsreihen eingesetzt.

2.3 Elektronenmikroskopie – Immungold-Methode

Die Schnitte wurden auf Kupfernetzen aufgefangen und mit Natrium-ethylat (Stammlösung 20 % 1:3 verdünnt mit Ethanol 100 %) geätzt. Nach absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua bidest. erfolgte das Einstellen in Citratpuffer, pH 6,0, für 15 Minuten im Wasserbad (95 °C). Die Schnitte wurden bis auf Raumtemperatur abgekühlt, für 30 Minuten mit BSA 5 % blockiert und anschließend mit dem ersten Antikörper (Anti-CK-19, 1:50) in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (0,01 M Phosphatpuffer in 0,15 M NaCl-Lösung, pH 7,3) mit einem Zusatz von 0,3 % BSA für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Markierung erfolgte nach der „Immun-Gold“-Methode von De Mey (1983). Hierbei diente Gold-markiertes monoklonales Ziege-anti-Maus Gamma-Immunglobulin (1:20) als zweiter Antikörper. Die Größe der Goldpartikel betrug 15 nm, die Inkubationszeit 2 x 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Zum Spülen zwischen den Inkubationsschritten wurde eine Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung (0,01 M Phosphatpuffer in 0,15 M NaCl-Lösung, pH 7.3) mit einem Zusatz von 0,1 % BSA verwendet. Zum Schluss wurden die Schnitte in 2 % GA in Phosphat-gepuffertes Kochsalzlösung fixiert und in Phosphat-gepuffertes Kochsalzlösung (jeweils 0,01 M Phosphatpuffer in 0,15 M NaCl-Lösung, pH 7,3) gespült. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Netze für 5 Minuten mit einer gesättigten Uranylacetat- und für 1 Minute mit einer Bleicitrat-Lösung kontrastiert.

2.4 Mikroskopische Technik

Lichtmikroskopie:

Die Beobachtung und Dokumentation erfolgte an einem Olympus Bx 50 Photomikroskop, das mit einer Digitalkamera Olympus DP 50 und mit UPlanAPO 10-, 20- und 40-Objektiven (Olympus) ausgestattet ist. Die Bilder wurden mit Olympus DP Soft auf einem PC gespeichert.

Elektronenmikroskopie:

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Transmissions- Elektronenmikroskop Philips CM - 10 untersucht. Hierbei wurden Primärvergrößerungen zwischen 1200x und 28000x gewählt.

3 Befunde

3.1 Lichtmikroskopische Charakterisierung der Cardidrüsen des Schweinemagens

Das Oberflächenepithel des Magens wird von einer dicken Schleimschicht bedeckt. Im Bereich der Cardidrüsenzzone wird es von einem einschichtigen hochprismatischen Epithel gebildet, in dem alle Zellen Schleim produzieren. Dieses Epithel setzt sich in die weiten Mündungen (Foveolae) der Cardidrüsen fort (Abb. 3.1.1).



Abbildung 3.1.1 Übergang von der Pars oesophagea (Ö) mit mehrschichtigem unverhornten Plattenepithel zur Cardidrüsenzzone (HE-Färbung). In den Cardidrüsen können oberflächlich gelegene gestreckte muköse (M) und tiefer gelegene, geknäuelte seröse (S) Anteile unterschieden werden. Lymphfollikel (L). Balken≈500µm

Die Cardiadrüsen des Schweinemagens sind Schleimhautdrüsen und erstrecken sich in der Tiefe bis zur Lamina muscularis mucosae. Es handelt sich um mäßig verzweigte, tubulöse Drüsen, deren oberflächennaher unverzweigter Anteil gestreckt verläuft und Schleim-produzierende Zellen enthält, während die in tieferen Schleimhautbereichen gelegenen, verzweigten Drüsenendstücke aufgeknaeuelt sind und seröse Zellen enthalten.

Die Schleimgranula der mukösen Zellen sowie die der Schleimhaut aufliegenden Schleimschicht zeigen eine starke positive PAS-Reaktion und eine Anfärbung mit Alcian-Blau, während in den serösen Zellen nur eine sehr schwache PAS-Reaktion und keine Reaktion mit Alcian-Blau erkennbar ist (Abb. 3.1.2 a und b)

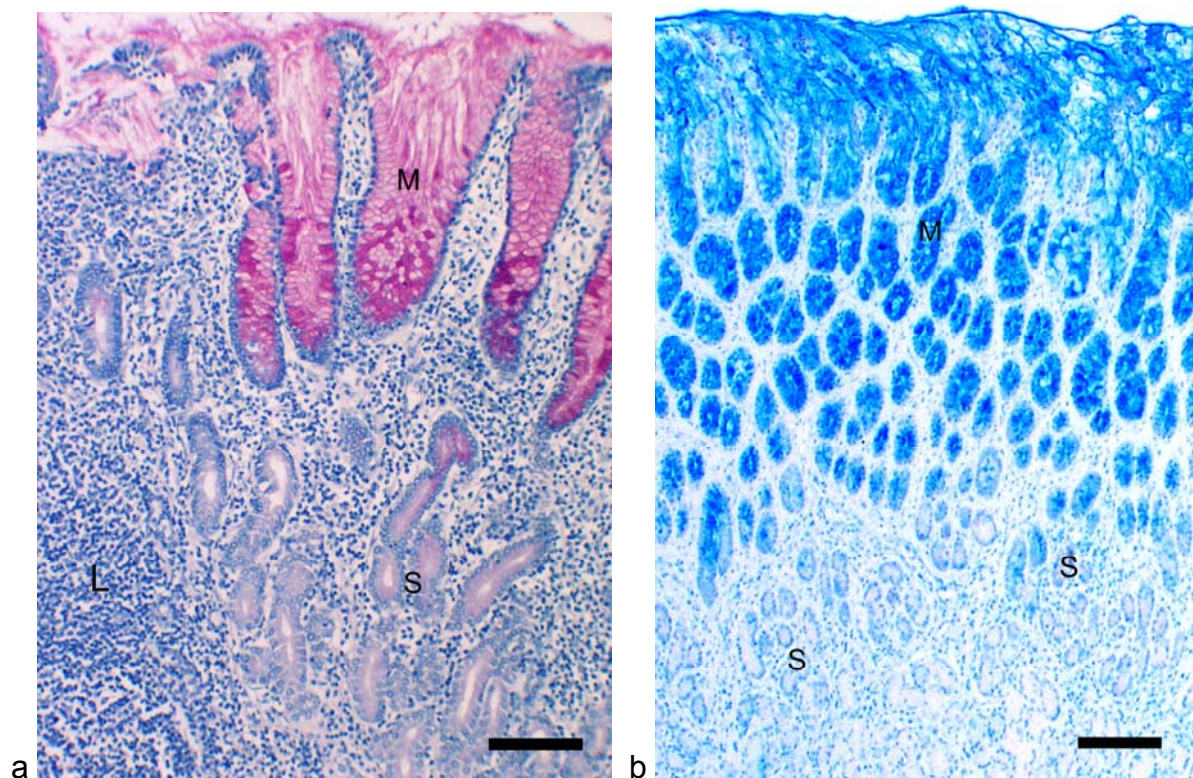


Abbildung 3.1.2 Starke PAS (a)- und Alcianblau, pH 2,5 (b)- Reaktion in den mukösen (M) Drüsenabschnitten und der oberflächlichen Schleimschicht, schwache PAS-Reaktion (a) und keine Anfärbung mit Alcianblau, pH 2,5 (b), in den serösen (S) Drüsenzellen. Lymphfollikel (L). Balken≈250µm

Im Gegensatz zu den mukösen Drüsenzellen und dem Oberflächenepithel zeigen die serösen Zellen im apikalen Zytoplasma eine positive Immunreaktion mit dem Anti-Lysozym-Antikörper (Abb.3.1.3).

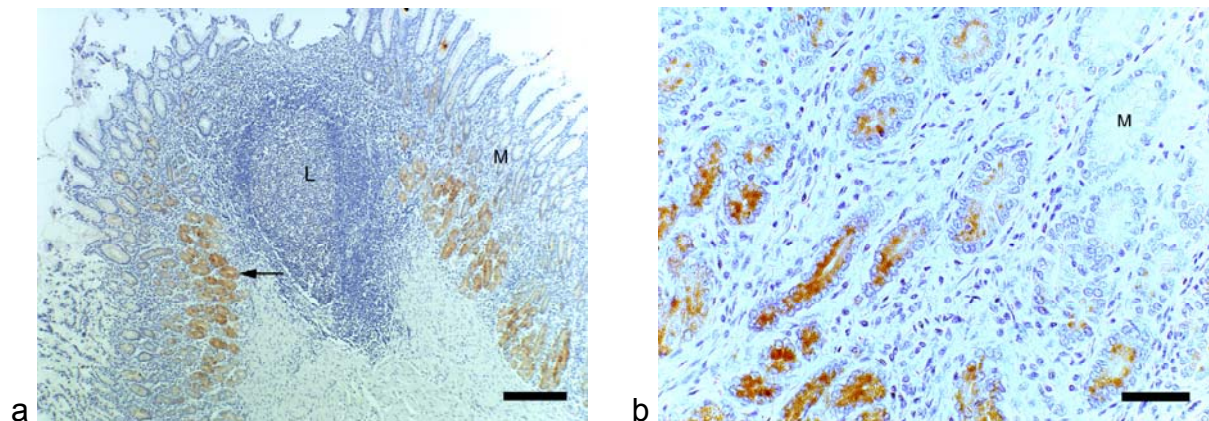


Abbildung 3.1.3 a) und b) Anti-Lysozym-Antikörper a) Der Pfeil zeigt auf Lysozym-positive seröse Cardiadrüsenzellen; die mukösen Cardiadrüsenzellen (M) sind negativ. (L) Lymphfollikel. Balken \approx 500 μ m. b) positive Anti-Lysozym-Immunreaktivität im apikalen Zytoplasma der serösen Zellen, während muköse Zellen (M) keine Immunreaktion zeigen. Balken \approx 50 μ m

Die Cardiadrüenschleimhaut enthält zusätzlich zahlreiche Lymphfollikel, insbesondere in der Grenzzone zur „kutanen“ Schleimhaut der Pars oesophagea des Magens (Abb. 3.1.4). Diese Follikel liegen vor allem in der Tiefe der Lamina propria zwischen den serösen Drüsenanteilen und haben oftmals eine enge Beziehung zum Drüsenepithel, so dass in diesem Bereich von einem Follikel-assoziierten-Epithel (FAE) gesprochen werden kann (Abb. 3.1.5). In diesen Abschnitten ist das Epithel regelmäßig von Lymphozyten infiltriert, wobei nicht selten Lymphozytencluster taschenartig von einer oder mehreren Epithelzellen umschlossen werden (Abb. 3.1.5). Das Zytoplasma dieser Epithelzellen ist im apikalen Bereich relativ dünn und zeigt eine ausgeprägte Eosinophilie (Abb. 3.1.5), so dass diese Zellen morphologisch

den M-Zellen im Follikel-assoziierten-Epithel der Peyer'schen Plaques ähneln. Sie werden daher im weiteren Text als M-Zellen bezeichnet.

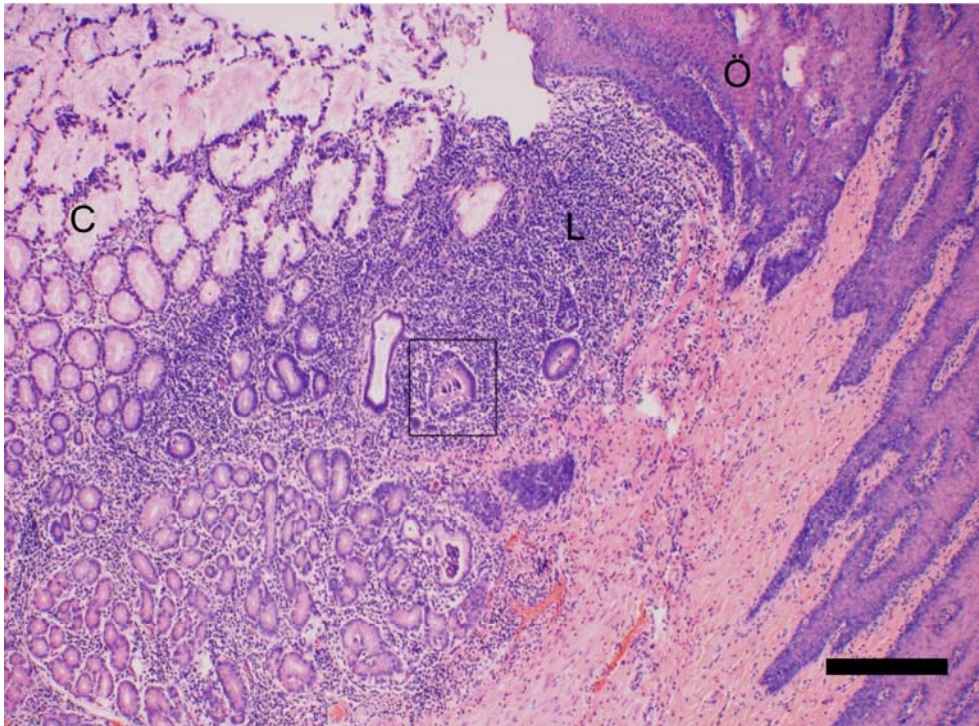


Abbildung 3.1.4 Lymphfollikel (L) an der Grenze Pars oesophagea - Pars cardiaca. (C) Cardiadrüsenepithel, (Ö) mehrschichtiges Plattenepithel der Pars oesophagea. Der markierte Bereich ist in **Abbildung 3.1.5** vergrößert. HE-Färbung. Balken≈500µm

Die Zellform der M-Zellen variierte deutlich, je nachdem, wie viele Lymphozyten von einer M-Zelle eingeschlossen waren (Abb. 3.1.5, 3.1.6). Die meisten M-Zellen wurden innerhalb der serösen Cardiadrüsen angetroffen. Gelegentlich fanden sich auch M-Zellen innerhalb der mukösen Cardiadrüsen oder des Oberflächenepithels, wenn der zugehörige Lymphfollikel oberflächennah lag oder bis zur Oberfläche reichte.

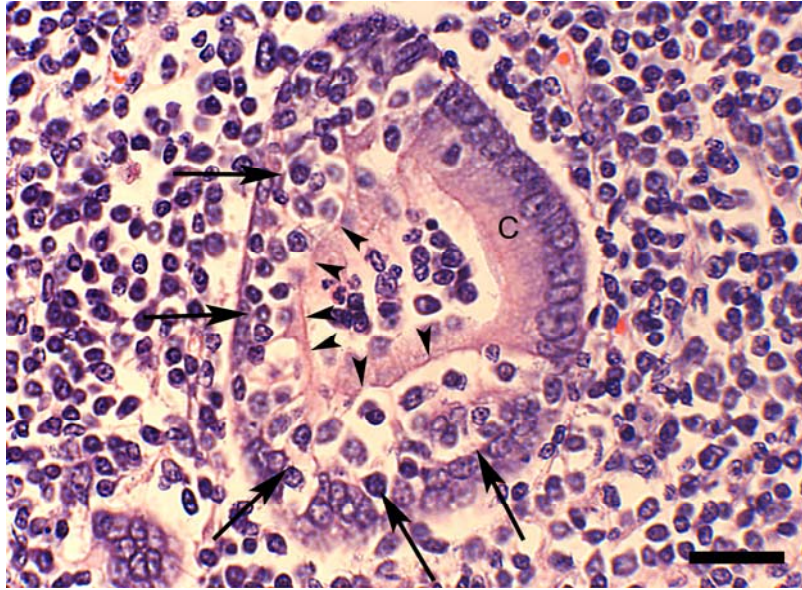


Abbildung 3.1.5 Vergrößerung des markierten Ausschnittes in **Abbildung 3.1.4**; Pfeile zeigen auf intraepitheliale Lymphozyten, umschlossen von M-Zellen. Die Pfeilspitzen deuten auf eosinophiles Material im apikalen Zytoplasma der M-Zellen. (C) Cardiadrüsenepithelzellen. Balken \approx 25 μ m.

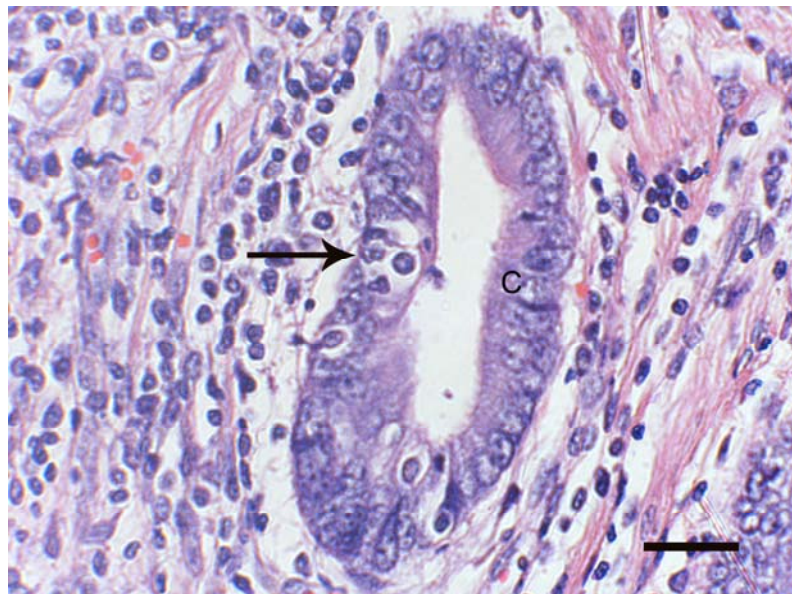


Abbildung 3.1.6 Cardiadrüse am Rande eines Lymphfollikels. Der Pfeil deutet auf ein Lymphozytencluster in einer M-Zelle, gegenüber sind Cardiadrüsenzellen (C) palisadenförmig aufgereiht. HE-Färbung. Balken \approx 25 μ m

3.2 Ultrastruktur der M-Zellen

Auch an Toluidinblau-gefärbten 0,5 μm dünnen Kunstharzschnitten, die angefertigt wurden, um geeignete Bezirke für elektronenmikroskopischen Untersuchungen auszuwählen, konnten intraepitheliale Lymphozytencluster vor allem in serösen Abschnitten der Cardiadrüsen angetroffen werden. Die Unterscheidung in seröse Zellen, die im apikalen Zytoplasma zahlreiche stark gefärbte Sekretgranula enthalten, und Zellen, die Lymphozytencluster einschließen und keine Sekretgranula enthalten, war in diesen Schnitten deutlicher als in den dicken Paraffinschnitten (Abb. 3.2.1).

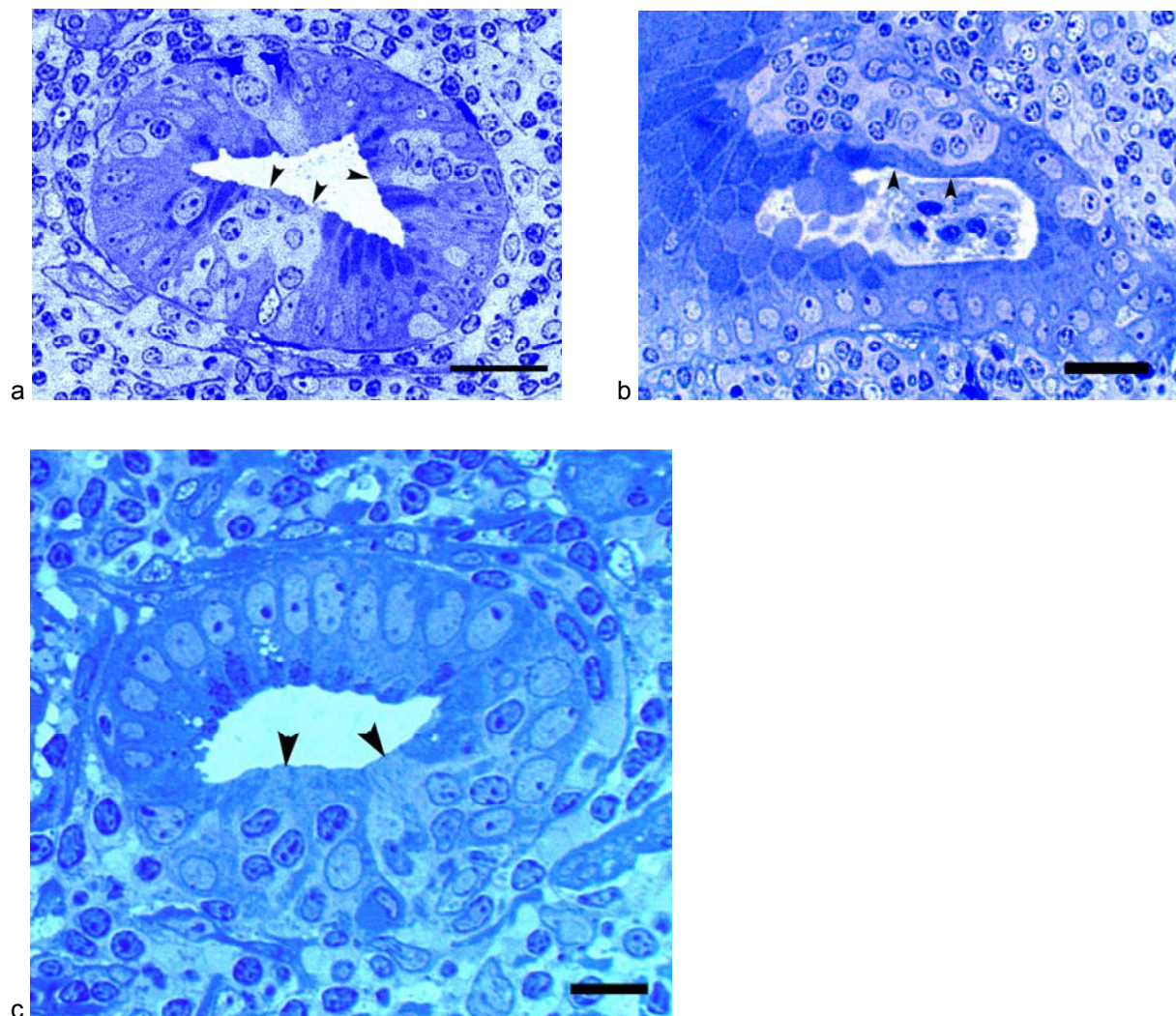


Abbildung 3.2.1 a-c Seröse Abschnitte der Cardiadrüsen; die Pfeilspitzen deuten auf M-Zellen, die unterschiedlich große Cluster intraepithelialer Lymphozyten einschließen. Semidünnschnitt, Toluidinblau. Balken $\approx 25\mu\text{m}$

Die lichtmikroskopisch als M-Zellen identifizierten Zellen lassen sich ultrastrukturell eindeutig von den serösen Zellen unterscheiden (Abb. 3.2.2). Die serösen Zellen sind durch ihre zahlreichen im apikalen Zytoplasma gelegenen Sekretgranula mit einem homogenen elektronendichten Inhalt charakterisiert. Darüberhinaus weisen sie einen runden, im basalen Drittel der Zelle gelegenen euchromatin-reichen Kern mit deutlichem Nucleolus, zahlreiche Zisternen des rauen endoplasmatischen Reticulums, einen Golgi-Apparat und Mitochondrien auf. Ihre Oberfläche ist weitestgehend glatt und nur durch vereinzelte, kurze Mikrovilli vergrößert. Die Grenze zur Lamina propria ist glatt. Eine Basalmembran ist durchgängig vorhanden (Abb. 3.2.2).



Abbildung 3.2.2 Ultradünnschnitt eines Cardiadrüsentubulus Seröse Cardiadrüsenzellen (Pfeile) mit zahlreichen elektronendichten Sekretgranula im apikalen Zytoplasma liegen gegenüber von M-Zellen (Pfeilspitzen), die Leukozyten (L) einschließen, jedoch keine Sekretgranula enthalten. Vergr. 1550fach.

Den M-Zellen dagegen fehlen Sekretgranula im apikalen Zytoplasma (Abb.3.2.2 bis 3.2.5). In Dünnschnitten ist das apikale vom basalen Zytoplasma häufig durch Gruppen von intraepithelial gelegene Lymphozyten getrennt (Abb.3.2.3). Im apikalen Zytoplasma fallen zahlreiche kleine runde Vesikel und membranöse Tubuli auf, deren Inhalt optisch leer erscheint (Abb. 3.2.4, 3.2.5). Daneben kommen Mitochondrien und Bündel von Intermediärfilamenten vor. Der Zellkern liegt wie bei den serösen Zellen im basalen Teil der Zelle und weist gelegentlich eine tiefe Einkerbung auf (Abb. 3.2.3). Zellorganellen, die auf eine sekretorische Aktivität hinweisen, wie das raue endoplasmatische Reticulum und der Golgi-Apparat, sind im Gegensatz zu serösen Zellen nur rudimentär ausgebildet (Abb.3.2.3). Die Grenze zur Lamina propria ist im Bereich der FAE nur schwer zu identifizieren, die epitheliale Basalmembran über weite Strecken nicht vorhanden.

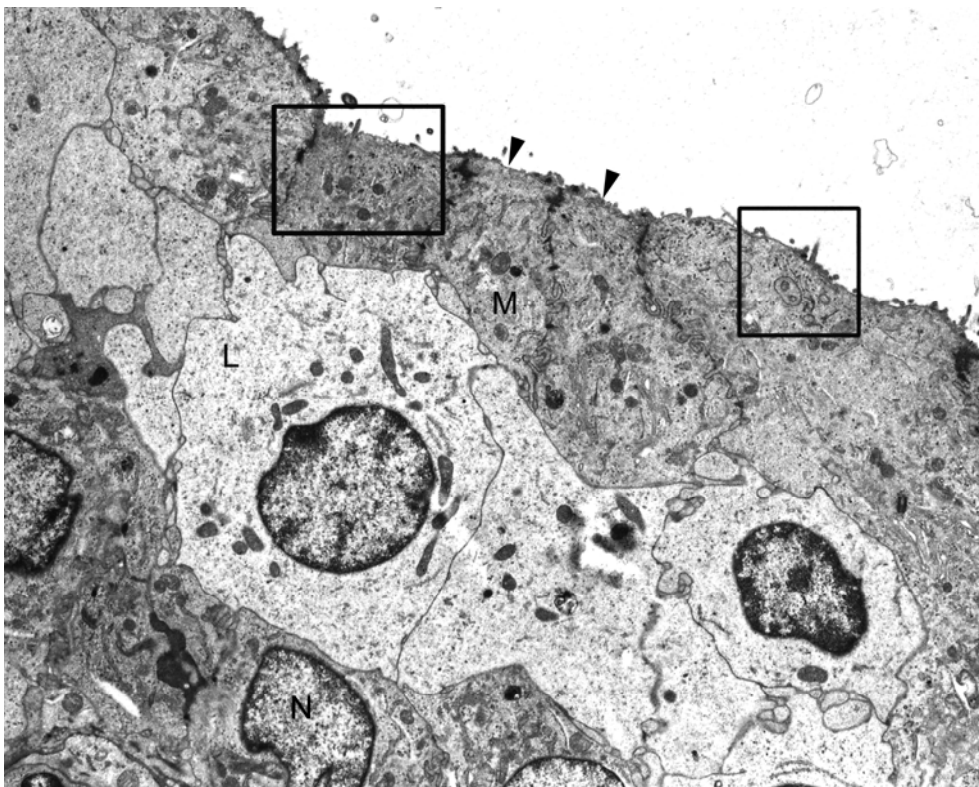


Abbildung 3.2.3 Vergrößerung aus Abbildung 3.2.2 Die Pfeilspitzen zeigen auf die apikale Membran der M-Zellen (M), deren Zellkerne (N) unterhalb der Lymphozyten (L) liegen. Die markierten Bereiche werden in den nächsten beiden Abbildungen vergrößert. Vergr. 3770fach

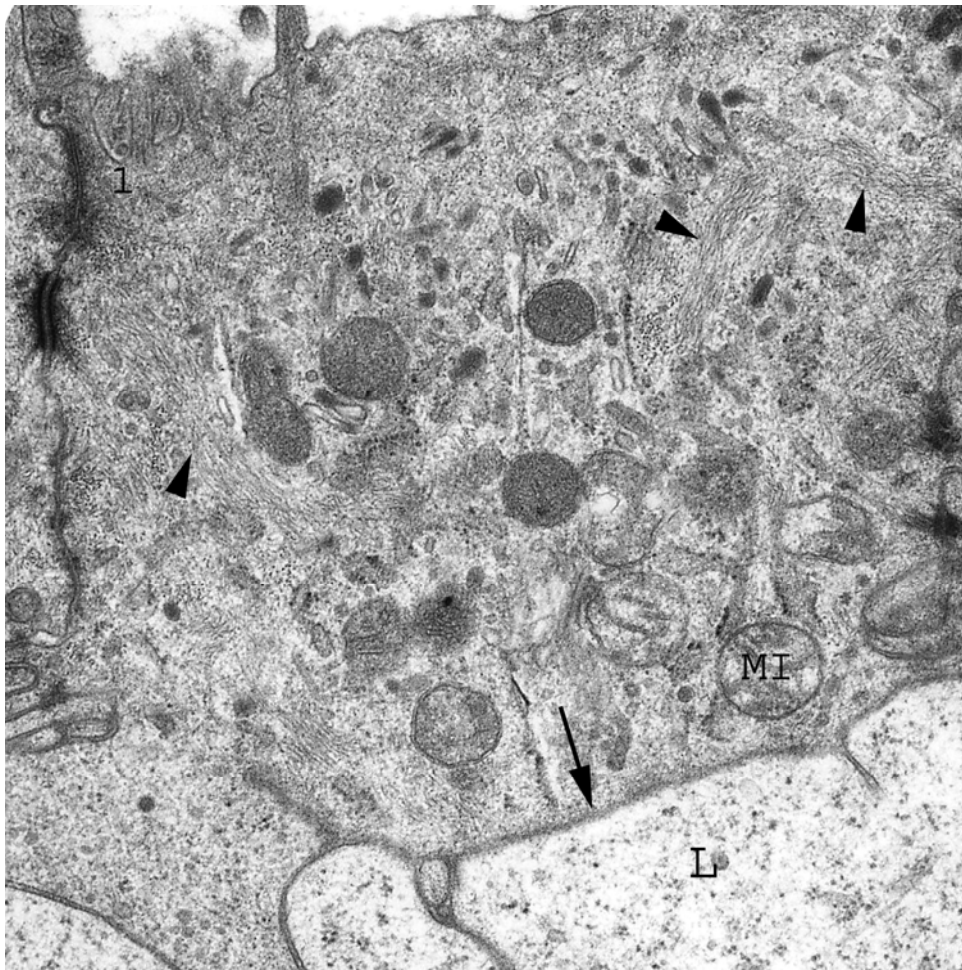


Abbildung 3.2.4 Vergrößerung des links markierten Bereichs in Abbildung 3.2.3 Epithelialer Schlussleistenkomplex zwischen zwei M-Zellen im Cardiadrüsenepithel des Schweinemagens (1). Die Pfeilspitzen zeigen auf Intermediärfilamentbündel. Der Pfeil zeigt auf die eingestülpte basolaterale Plasmamembran der M-Zelle, die eine mit Lymphozyten (L) gefüllte Tasche umgibt. MI: Mitochondrium im Zytoplasma der M-Zelle. Vergr. 20080fach

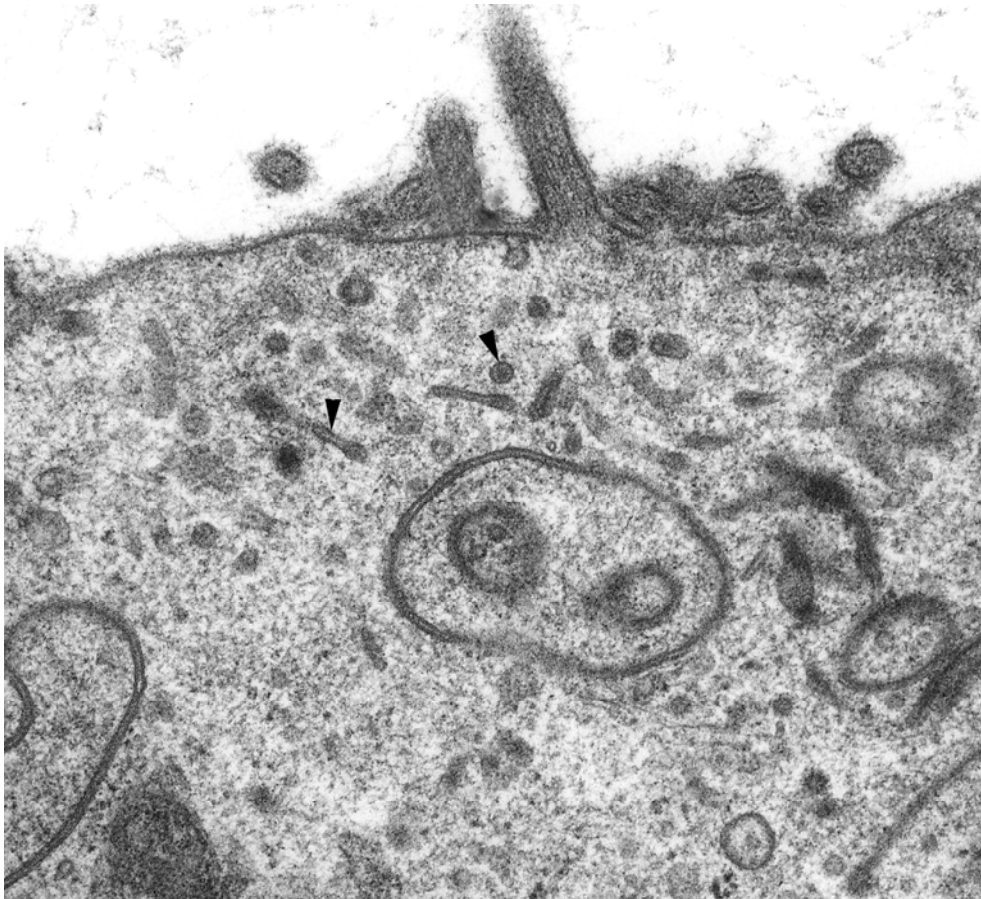


Abbildung 3.2.5 Vergrößerung des rechts markierten Bereichs in Abbildung 3.2.3 Kleine Vesikel und membranöse Tubuli im apikalen Zytoplasma einer M-Zelle (Pfeilspitzen). Auf der luminalen Oberfläche befinden sich vereinzelt längs und quer getroffene Mikrovilli. Vergr. 36900fach

3.3 Immunhistochemie

Von den zahlreichen Paraffinblöcken, die für die allgemeine Beschreibung der Cardiadrüsenschleimhaut herangezogen wurden, wurden nur solche für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendet, in denen alle Schleimhautkomponenten, insbesondere Lymphfollikel und Follikel-assoziiertes-Epithel mit M-Zellen, vorhanden waren.

Unabhängig von der Fixierung mit Formaldehyd oder Alkohol wurden identische

Immunreaktionen beobachtet. In allen Abbildungen wird die Immunreaktion in alkoholfixiertem Gewebe demonstriert. Alle Immunreaktionen wurden anhand von Material verschiedener Schweine reproduziert. Die Immunreaktion in formaldehydfixiertem Gewebe war jedoch nur nach Demaskierung der Antigene in der Mikrowelle reproduzierbar. Ein Einfluss der verwendeten Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung 0,01 M PS in 0,1 M NaCl-Lösung, pH 7,6, Citratpuffer 0,01 M, pH 6,0) auf die Immunreaktion wurde nicht festgestellt. Alle durchgeführten Kontrollen waren negativ.

Cytokeratin-Antikörper

Alle Cytokeratin-Antikörper reagierten ausschließlich mit Epithelzellen. Intraepitheliale Lymphozyten, Lymphfollikel, das Bindegewebe der Lamina propria und Tela submucosa sowie die glatte Muskulatur der Lamina muscularis mucosae und Tunica muscularis blieben unmarkiert. In Vorversuchen an den Peyer'schen Plaques des terminalen Ileums wurden die von Gebert et al. (1994) erhobenen Befunde bestätigt, dass M-Zellen selektiv einen Anti-Cytokeratin-18-Antikörper binden (Befunde nicht gezeigt).

Pan-Cytokeratin-Antikörper

Der Pan-Cytokeratin-Antikörper K8.13 (Abbildung 3.3.1) zeigte eine intensive Immunreaktion für alle Epithelzellen der Cardiadrüsen Schleimhaut, einschließlich aller Schichten des Epithels der Pars oesophagea. M-Zellen stellten sich oft etwas deutlicher dar als die Cardiadrüsenepithelzellen.

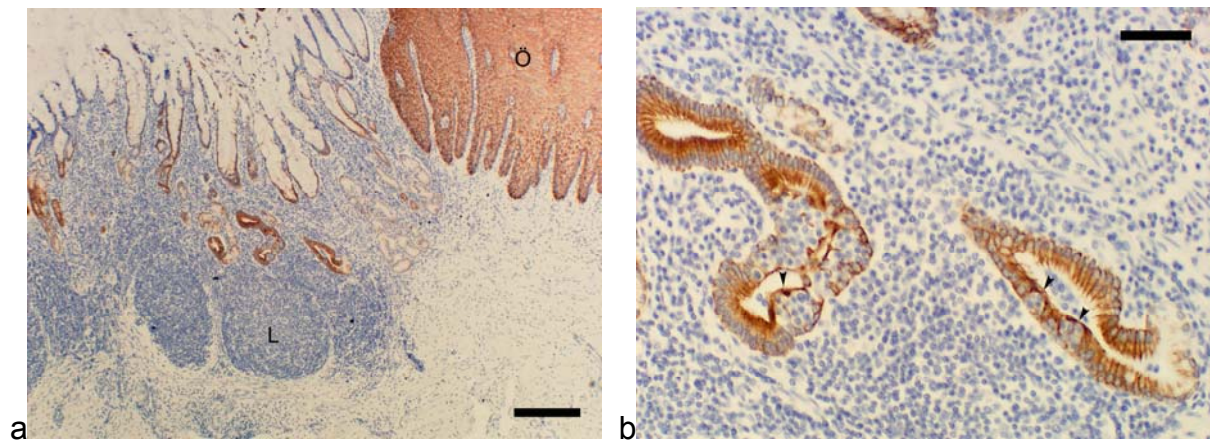


Abbildung 3.3.1 Pan-CK K8.13 a) Übergang von der Pars oesophagea (Ö) zur Cardiadrüsenzzone mit einem Lymphfollikel (L). Sowohl das Cardiadrüsenepithel als auch das Epithel der Pars oesophagea reagierten positiv. Balken $\approx 500\mu\text{m}$. b) Vergrößerung aus a), Pfeilspitzen zeigen auf die deutlich positive Immunreaktion im apikalen Zytoplasma von M-Zellen. Balken $\approx 50\mu\text{m}$

Anti-Cytokeratin-18- und -19-Antikörper (CK18 und 19)

Die Immunreaktion der Anti-Cytokeratin-18- und -19-Antikörper war weitgehend identisch. So zeigten sowohl das Oberflächenepithel als auch die Epithelzellen der mukösen und serösen Tubulusabschnitte eine positive Reaktion (Abb. 3.3.2). In den mukösen Cardiadrüsenzellen reagierten vor allem das basale und laterale Zytoplasma, d.h. die Bereiche der Zelle, in denen keine Schleimgranula vorkommen (Abb. 3.3.3). Die M-Zellen zeigten jeweils eine stärkere Reaktion als die Cardiadrüsenepithelzellen. In den M-Zellen konzentrierte sich die Reaktion

insbesondere auf den apikalen und etwas schwächer auf den lateralen Bereich (Abb. 3.3.2 b). Selbst bei sehr hohen Arbeitsverdünnungen konnte kein Unterschied in der Stärke der Immunreaktion zwischen Drüsenepithelzellen und M-Zellen beobachtet werden. Das Epithel der Pars oesophagea reagierte nicht mit den Antiseren. Es konnte kein Unterschied im Reaktionsverhalten der drei verwendeten Anti-Cytokeratin-18-Antiseren (siehe Tabelle 3.1) festgestellt werden, d.h. im Unterschied zu den M-Zellen in den Peyer'schen Plaques waren diese Zellen im Magen nicht selektiv mit einem Anti-Cytokeratin-18- oder -19-Antiserum anfärbbar (Abb. 3.3.2-3.3.4).

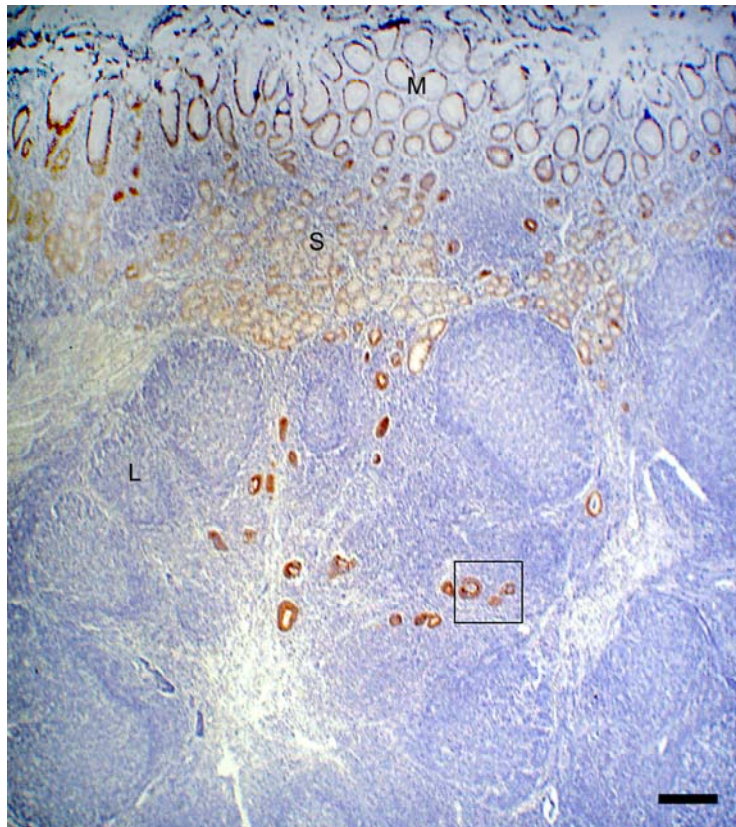


Abbildung 3.3.2 CK18 Positive Reaktion der Oberflächenepithelzellen sowie der mukösen (M) und serösen (S) Cardiadrüsenepithelzellen. In den in der Tiefe zwischen den Lymphfollikeln (L) liegenden Drüsentubuli ist die Reaktion stärker als in den oberflächlich gelegenen Drüsenanteilen. Der markierte Bereich ist in Abb.3.3.3 a vergrößert. Balken≈100µm

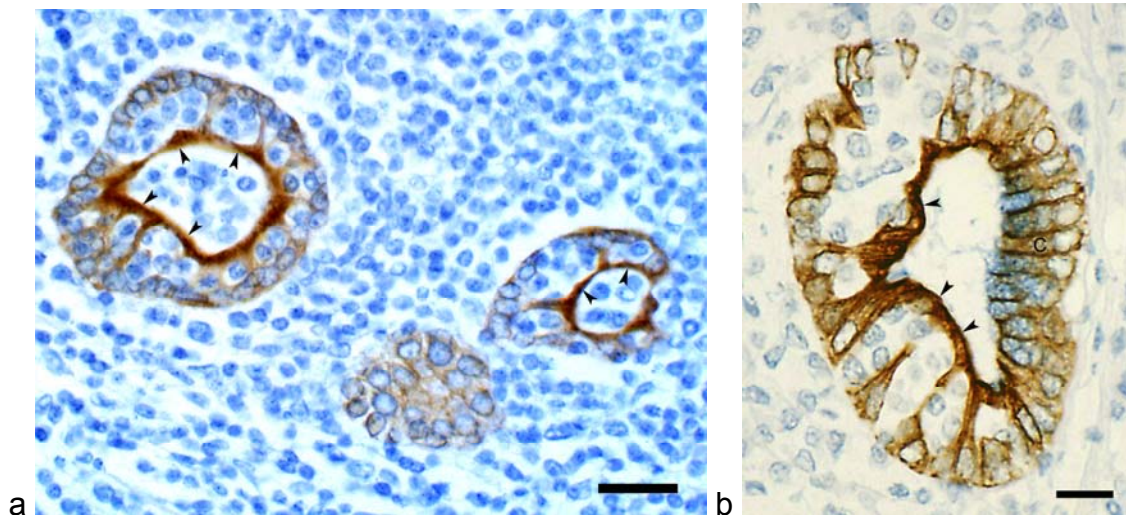


Abbildung 3.3.3 CK 18 a) Vergrößerung des Ausschnittes aus Abb. 3.3.2. Die Pfeilspitzen zeigen auf das CK18-positive apikale Zytoplasma der M-Zellen. Balken $\approx 25\mu\text{m}$. b) Muköser Drüsentubulus (C) am Rande eines Lymphfollikels; die Pfeilspitzen zeigen auf das CK18-positive apikale Zytoplasma der M-Zellen. Die Sekretgranula der mukösen Zellen sind mit Alcianblau gefärbt. Balken $\approx 50\mu\text{m}$

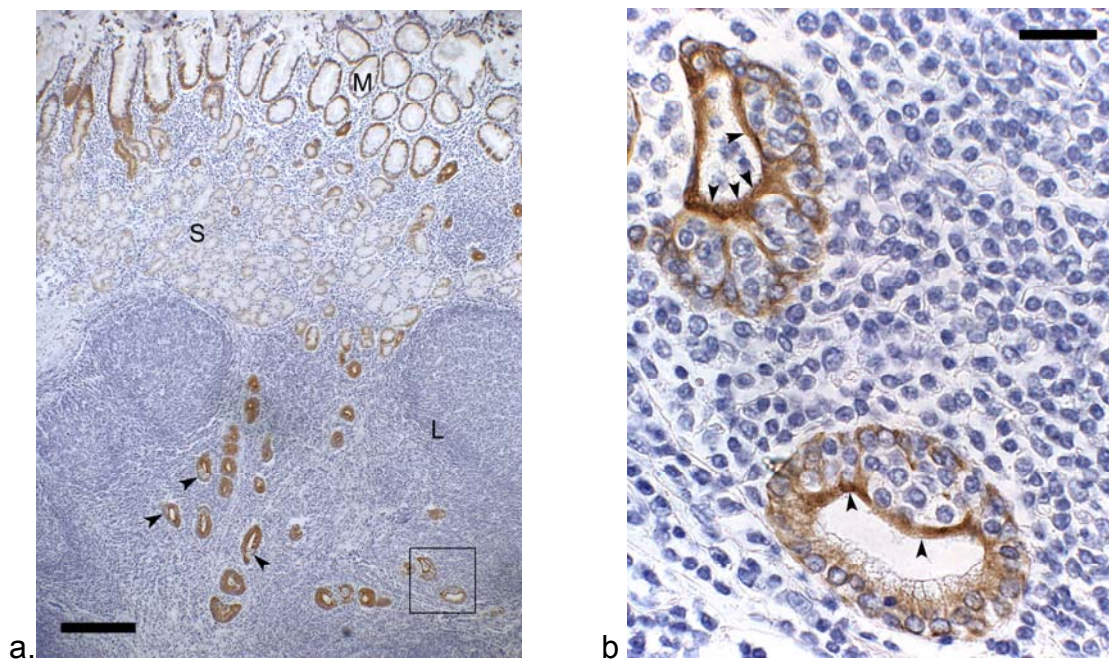


Abbildung 3.3.4 CK 19 a) Positive Reaktion der Oberflächenepithelzellen sowie der mukösen (M) und serösen (S) Cardiadrüsenepithelzellen. Balken $\approx 100\mu\text{m}$. b) Vergrößerung des Ausschnittes aus a). Die Pfeilspitzen zeigen auf das CK19-positive apikale Zytoplasma der M-Zellen. Balken $\approx 25\mu\text{m}$

Anti-Cytokeratin-7-Antikörper (CK7)

Der Anti-Cytokeratin-7-Antikörper markierte vornehmlich Epithelzellen in der Nähe von Lymphfollikeln, vor allem in der Tiefe der Cardidrüsen, wohingegen die restlichen Epithelzellen der Cardidrüsenschleimhaut sowohl des Oberflächenepithels als auch der mukösen Tubulusabschnitte und die Ösophagusschleimhaut weitestgehend unmarkiert blieben (Abb. 3.3.5). Innerhalb der selektiv gefärbten Epithelzellen fanden sich meist Gruppen intraepithelial gelegener Lymphozyten. Aufgrund dieser Tatsache wurden die selektiv markierten Epithelzellen als M-Zellen identifiziert. Die Anti-Zytokeratin-7-Immunreaktivität war jedoch nicht gleichmäßig über das Zytoplasma der M-Zelle verteilt: Eine deutliche Immunreaktion zeigte vor allem das apikale Zytoplasma, während die Immunreaktion der lateralen und basalen Zellbereiche in der Umgebung der Lymphozyten geringer ausgeprägt war (Abb. 3.3.5 b). Zudem fanden sich vereinzelt positive Epithelzellen in der Nähe der M-Zellen bzw. unmittelbar benachbart, die keine Lymphozyten einschlossen und Cardidrüsenzellen ähnelten.

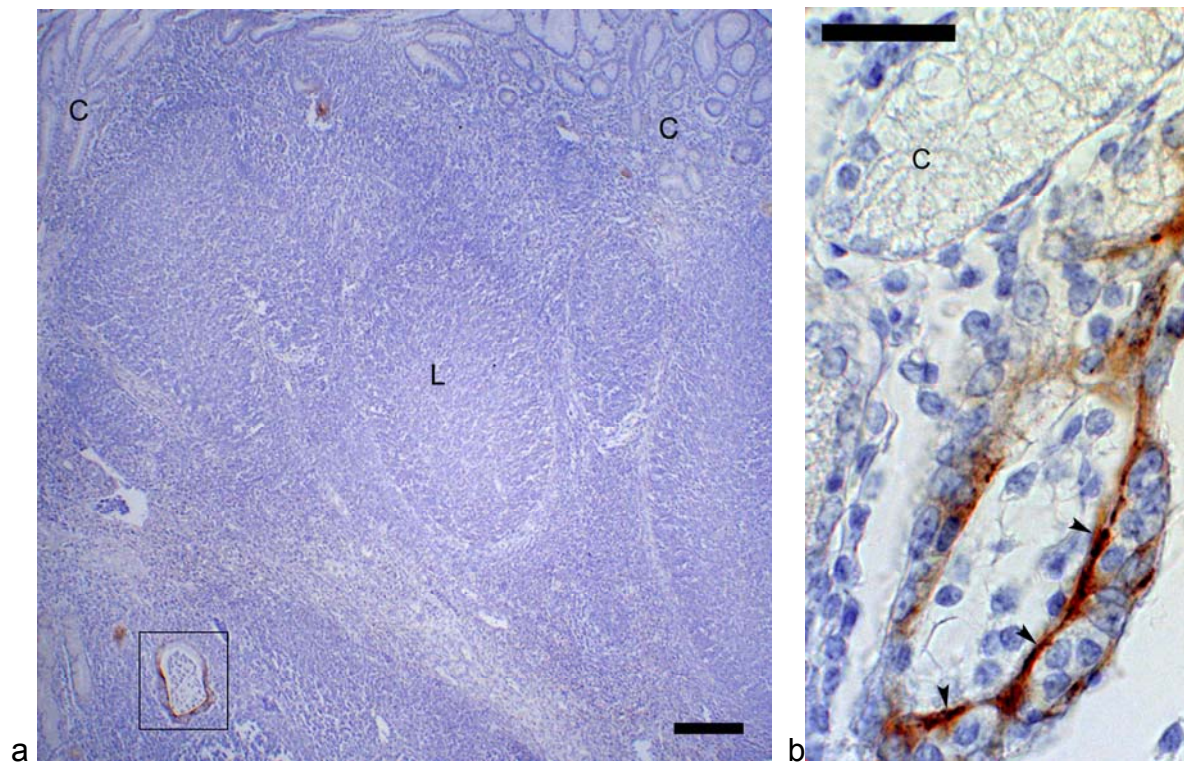


Abbildung 3.3.5 Anti-CK7 a) Übersicht: Die Anti-Cytokeratin-7-Immunreaktion ist weitestgehend auf das Follikel-assoziierte-Epithel (FAE) mit M-Zellen beschränkt. (L) Lymphfollikel, (C) Cardiadrüsen. Am Beispiel des FAE im eingerahmten Bereich unten links wird die Immunreaktion aller verwendeten Anti-Cytokeratinantiseren in einer konsekutiven Schnittserie verfolgt. Balken \approx 100 μ m. b) Parafollikulär gelegene Cardiadrüsensysteme mit CK7-negativen Drüsenzellen (C). Pfeilspitzen zeigen auf die CK7-positive apikale Oberfläche von M-Zellen. Balken \approx 25 μ m

Anti-Cytokeratin-8-Antikörper (CK8)

Die Anti-Cytokeratin-8-Antikörper reagierten vor allem mit serösen Cardiadrüsenepithelzellen und M-Zellen, wohingegen eine Reaktion mit den mukösen und oberflächlichen Epithelzellen der Cardiadrüsenzzone und dem Epithel der Pars oesophagea schwach ausfiel (Abbildung 3.3.).

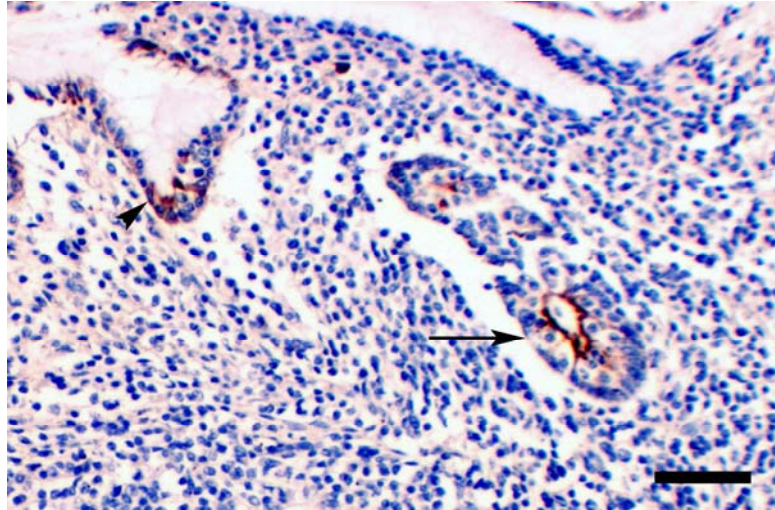


Abbildung 3.3.6 CK8 Die Pfeilspitze zeigt auf Oberflächenepithelzellen, die auf Anti-CK8-Antikörper positiv reagieren, der Pfeil zeigt auf CK8-positive M-Zellen. Balken≈100µm

Anti-Cytokeratin-4-, -5/6- und -14-Antikörper (CK4, CK5/6, CK14)

Antikörper gegen die Cytokeratine 4, 5/6 und 14 reagierten lediglich mit dem Ösophagusepithel, während alle Strukturen in der Cardiadrüsenzzone immunnegativ waren. Im Ösophagusepithel zeigten sich jedoch Unterschiede: Die Anti-Cytokeratin-4- und -5/6-Antiseren reagierten nur mit den Zellen des Stratum intermedium des mehrschichtigen, platten Ösophagusepithels, während der Anti-Cytokeratin-14-Antikörper nur mit den Basalzellen reagierte (Abbildung 3.3.).



Abbildung 3.3.7 CK14 Nur die Basalzellen des mehrschichtigen Plattenepithels der Pars oesophagea (Ö) reagieren positiv mit dem Anti-Cytokeratin-14-Antikörper. (C) Cardiadrüsen, (L) Lymphfollikel. Balken≈250µm

Konsequente Schnittserie mit den Anti-Cytokeratin-7-, -8-, -18- und -19-Antikörpern:

Zur Veranschaulichung und zum besseren Vergleich der einzelnen, an M-Zellen der Cardiadrüsenzzone des Schweinemagens positiv reagierenden Antikörper wurde von einem M-Zellen enthaltenden Cardiadrüsentubulus (Ausschnitt aus Abbildung 3.3.5) eine konsequente Schnittserie angefertigt, in der neben einer HE-Färbung die Anti-Cytokeratin-7-, -8-, -18- und -19-Antikörper zum Einsatz kamen (Abbildung 3.3.6).

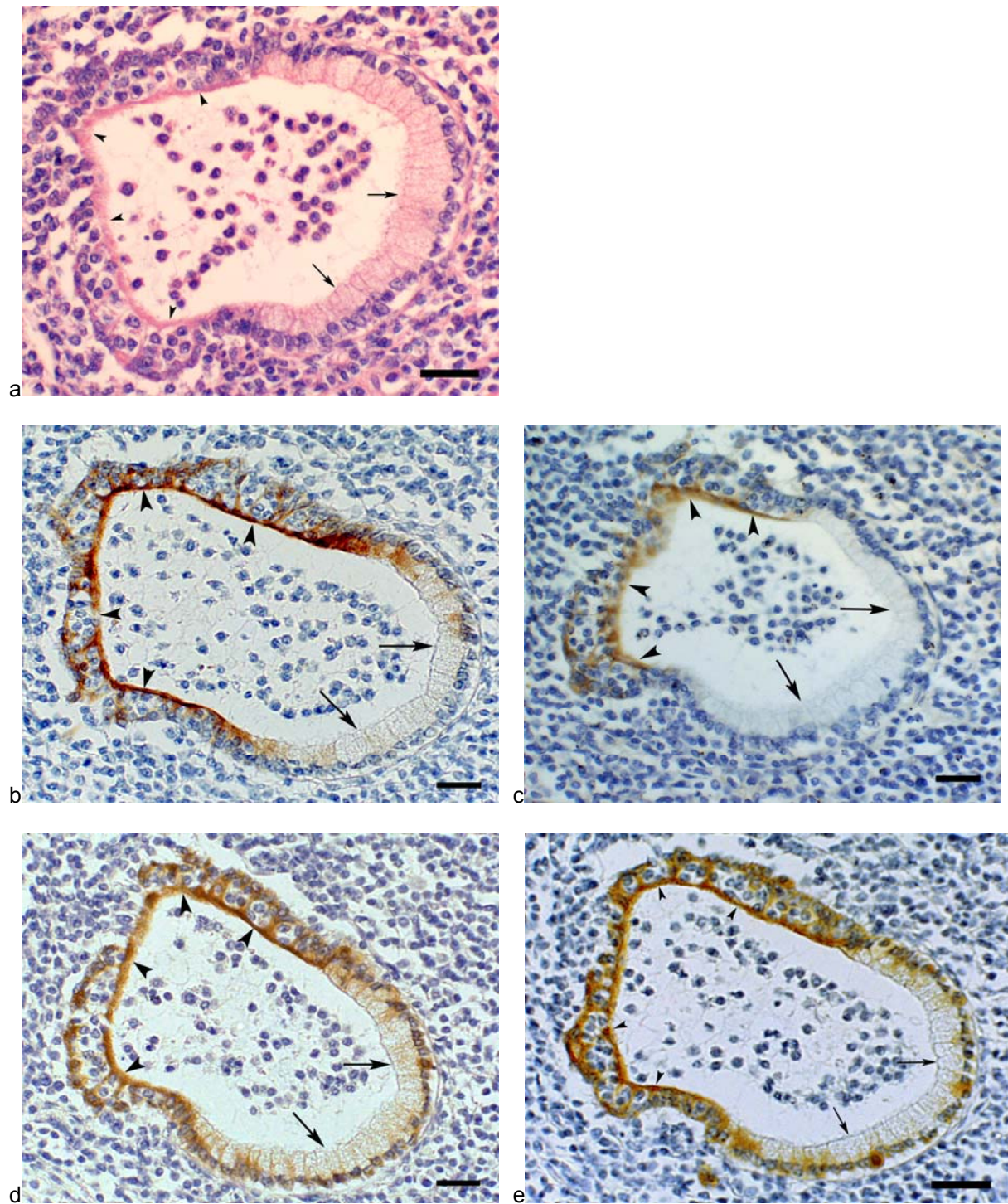


Abbildung 3.3.6 a-e Konsekutive Schnittserie des Ausschnittes aus Abbildung 3.3.5

a HE-Färbung, b Anti-Cytokeratin-7, c Anti-Cytokeratin-8, d Anti-Cytokeratin-18, e Anti-Cytokeratin-19. Die Pfeile zeigen auf Cardiadrüsenepithelzellen eines Drüsenschnitts, die Pfeilspitzen auf die apikale Oberfläche von M-Zellen. Balken $\approx 50\mu\text{m}$

Vimentin-Antikörper

Epithelzellen zeigten keine Vimentin-Immunreaktivität. Im subepithelialen Bindegewebe und im lymphatischen Gewebe waren die Fibroblasten und Retikulumzellen markiert (Befunde nicht gezeigt).

Desmin-Antikörper

Der Desmin-Antikörper reagierte weder mit Epithelzellen der Cardiadrüsenzzone noch der Pars oesophagea. Muskelfasern der Lamina muscularis mucosae, der Tunica muscularis und der Blutgefäße zeigten eine intensive Immunreaktion (Befunde nicht gezeigt).

Tabelle 3.1 Reaktionsintensität einzelner Gewebe der Cardidrüsenszone mit den verschiedenen Antikörpern, die zytoplasmatische oder membranständige Moleküle erkennen („++“: starke Reaktion, „+“: schwache Reaktion, „-“: keine Reaktion)

<u>Antikörper</u> <u>(Klon)</u>	<u>M-Zellen</u>	<u>Epithelzellen im serösen</u> <u>Tubulusabschnitt</u>	<u>Epithelzellen im mukösen</u> <u>Tubulusabschnitt</u>	<u>Oberflächenepithel</u>	<u>Epithel der Pars</u> <u>oesophagea</u>
Pan-CK (K 8.13)	++	+	+	+	+
Anti-CK18 (DC-10)	++ (v.a. apikal)	+	+	+	-
Anti-CK18 (Cy 90)	++ (v.a. apikal)	+	+	+	-
Anti-CK18 (KS 18.04 biotinyliert)	++ (v.a. apikal)	+	+	+	-
Anti-CK19 (170.2.14)	++ (apikal deutlicher als lateral)	+	+	+	-
Anti-CK7 (OV-TL12/30)	++ (v.a. apikal)	+/- (vereinzelt in Follikelnähe)	-	-	-
Anti-CK8 (35βH11)	+	+	+/-	+/-	+
Anti-CK4 (6B10)	-	-	-	-	+ (nur Stratum intermedium)
Anti-CK5/6 (D5/16B4)	-	-	-	-	+ (nur Stratum intermedium)
Anti-CK14 (LL002)	-	-	-	-	+ (nur Basalzellen)
Anti-Vimentin (VIM-13.2)	-	-	-	-	-
Anti-Desmin (ZC18)	-	-	-	-	-

3.4 Immungold-Elektronenmikroskopie

Die lichtmikroskopischen immunhistochemischen Befunde wurden ultrastrukturell mit der Immungold-Methode für das Zytokeratin 19 verifiziert. Anti-Zytokeratin-19-Antikörper-konjugierte Goldpartikel waren vor allem an Intermediärfilamentbündeln im apikalen Zytoplasma von M-Zellen zu finden (Abb. 3.4.1). Diese Immunreaktion war spezifisch auf die Intermediärfilamente beschränkt.

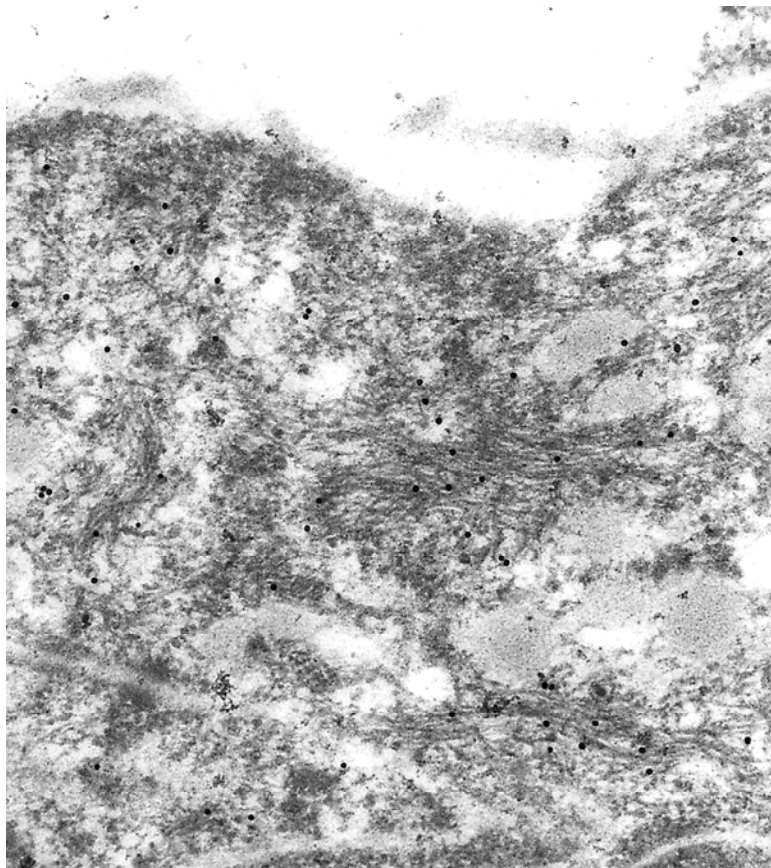


Abbildung 3.4.1 Ultrastrukturelle Lokalisation der Cytokeratin-19-Immunreaktivität in einer M-Zelle der Cardidrüsenszone des Schweinemagens. Die Immungoldkomplexe sind im Bereich der Intermediärfilamentbündel lokalisiert. Vergr. 36920fach

4 Diskussion

Da „bei dem vom Schweine geübten schnellen und gierigen Abschlingen der oft höchst stark verunreinigten Nahrung die vor dem Magen gelegenen zytoblastischen Abwehrapparate in Mundhöhle, Schlingrachen, Ösophagus den Kampf gegen pathogene Mikroorganismen und andere Schädlichkeiten nur unzulänglich aufnehmen können“, ist gerade der Eingang des Magens beim Schwein durch „schädliche Bestandteile“ in der Nahrung bedroht (Trautmann, 1925). Der Magen ist die erste Station, in der das aufgenommene Futter längere Zeit verweilt. Obwohl beim Schwein Tonsillen vorhanden sind (Gebert 2000), besteht im Magen offenbar erstmals die Gelegenheit, die Nahrungsbestandteile immunologisch zu überprüfen, so dass der auffallend große Reichtum an Lymphfollikeln im Diverticulum ventriculi und in der Cardidrüsenszone mit dem längeren Aufenthalt der aufgenommenen Futtermassen erklärt werden kann (Trautmann, 1925).

Die Ergebnisse der vorliegenden ultrastrukturellen und immunhistochemischen Arbeit bestätigen nicht nur die alten Beobachtungen von Ellenberger (1884) und Trautmann (1925), dass in der Cardidrüsenszone des Schweinemagens zahlreiche Lymphfollikel ausgebildet sind, sondern sie weisen auch erstmals Zellen mit den morphologischen Charakteristika von M-Zellen nach. Diese Zellen ähneln ultrastrukturell den M-Zellen in den Peyer'schen Plaques des Dünndarms und wie dort kommen sie auch in der Cardidrüsensregion des Schweins ausschließlich im Follikel-assoziierten-Epithel (FAE) vor. Ihre basolaterale Zellmembran ist tief eingestülpt, so dass ein großer intraepithelialer Hohlraum, in dem sich vor allem Lymphozyten, aber auch Makrophagen befinden, entsteht. Daraus resultiert, dass das apikale Zytoplasma, je nach Ausdehnung der basolateralen Invagination, zum Teil membranös dünn ausgezogen ist, so dass der Abstand zwischen potentiellen Antigenen auf der

luminalen und immunkompetenten Zellen auf der basalen Seite des Epithels auf ein Minimum reduziert ist. In dieser membranös dünnen, apikalen Zytoplasmabrücke kommen zahlreiche Vesikel vor. Aus zahlreichen Untersuchungen vor allem an den Peyer'schen Plaques ist bekannt, dass es sich hierbei um transzytotische Vesikel handelt, die luminalen Antigene zu den intraepithelialen Lymphozyten und Makrophagen transportieren (Gebert et al. 2000, Neutra et al. 1987, Neutra und Kraehenbuhl 1992, Owen et al. 1986).

Die Lage in einem FAE sowie die ultrastrukturellen Charakteristika lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass es sich bei diesen Zellen in der Cardidrüsenregion des Schweinemagens tatsächlich um M-Zellen handelt. Ellenberger beobachtete bereits 1911, dass das Epithel über den Lymphfollikeln an manchen Stellen so stark von Lymphozyten durchsetzt ist, dass man die Cardidrüsenepithelzellen kaum noch wahrnimmt. Es steht zu vermuten, dass er die M-Zellen als solche bereits wahrgenommen hat, ohne diese als morphologisch und funktionell determinierte Zellen zu kennen – sie wurden erstmals von Bockman (1973) in der Appendix und von Owen (1974) in den Peyer'schen Plaques beschrieben. Ein funktioneller Beweis, dass die M-Zellen in den Cardidrüsen des Schweins apostrophierten Zellen tatsächlich in der Lage sind, Antigene aus dem Drüsenlumen zu den immunkompetenten Zellen auf der basalen Epithelseite zu transportieren, steht allerdings aus.

Ein wichtiger Unterschied besteht jedoch zwischen den M-Zellen in der Cardidrüsenzone des Magens und denen in den Peyer'schen Plaques des Dünndarms. Während die M-Zellen im Dünndarm im oberflächlichen Epithel, allenfalls an der Seite, des sich ins Lumen vorwölbenden Dome-Areals liegen und somit in direkten Kontakt mit dem Darminhalt treten (Gebert et al. 1994), liegen diese in den Cardidrüsen fast ausschließlich in der Tiefe der Drüsentubuli, d.h. weit vom

Magenlumen entfernt. Diese Drüsen bestehen aus zwei Abschnitten, einem oberflächlichen, der wie das Deckepithel eine positive PAS-Reaktion zeigt, sich mit Alcianblau bei pH 2 färbt und Schleim sezerniert, und einen in der Tiefe gelegenen, deren Zellen alle Charakteristika seröser Drüsenzellen aufweisen und die u.a. Lysozym produzieren, wie in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Um von den M-Zellen aufgenommen zu werden, müssten Antigene also von der Schleimhaut-Oberfläche durch den Mucus und gegen den Fluss des serösen Sekrets zu den M-Zellen diffundieren bzw. aktiv vordringen. Es ist schwer vorstellbar, dass lösliche Antigene und kleine Partikel wie z.B. Viren die Schleimbarriere überwinden, andererseits jedoch nicht auszuschließen, dass Bakterien aktiv in die Drüsentubuli vordringen. Tatsächlich wurden auch in einigen der für diese Arbeit untersuchten Proben begeißelte Bakterien in der Tiefe der Drüsentubuli beobachtet.

Diese Lage der M-Zellen in der Tiefe der Cardidrüsen im Magen des Schweins ähnelt der Situation im Colon des Kalbs, wo ebenfalls Lymphfollikel in enger topografischer Beziehung zu einer Drüse, in diesem Fall einer schleimproduzierenden Krypte, vorkommen. Auch im Colon des Kalbs sind die M-Zellen in der Tiefe der Krypte lokalisiert (Liebler et al. 1988). Für diese Koexistenz wurde von Liebler und Mitarbeitern (1988) der Begriff „lymphoglandular complex“ gewählt, der auf die Cardidrüsen des Schweinemagens mit Recht anzuwenden ist.

Die Tatsache, dass M-Zellen lichtmikroskopisch in routinegefärbten (z.B. H.E) Paraffinschnitten nicht immer eindeutig identifiziert werden können, ihre Identifikation im Elektronenmikroskop aufwendig ist und eine Fixierung in Glutaraldehyd voraussetzt - zumindest, wenn minimale Ansprüche an die Qualität gestellt werden - erklärt das Bestreben, histochemische Marker zu etablieren, die M-Zellen auch an in Formaldehyd oder Alkohol fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

verlässlich, d.h. reproduzierbar, zur Darstellung bringen. Zwei Gruppen von Molekülen haben sich grundsätzlich als brauchbar erwiesen, um M-Zellen von den benachbarten Zellen zu unterscheiden und kommen daher als potentielle Marker in Betracht. Einerseits unterscheiden sich differenzierte Zellen häufig in den Glykosylierungsmustern ihrer Glykokalyx, die mit Hilfe von Lektinen histochemisch bestimmt werden können, andererseits können Unterschiede in der Expression der Intermediärfilamentproteine vorhanden sein, die immunhistochemisch nachweisbar sind. Intermediärfilamentproteine bilden eine Proteinfamilie, deren Mitglieder eine gewebetypische Expression zeigen (Moll et al. 1982). Während Bindegewebs-, Muskel-, Nerven- und Gliazellen relativ einheitlich entweder Vimentin, Desmin, Neurofilament oder das saure Gliafaserprotein (GFAP) exprimieren, weisen Epithelzellen ein sehr differenziertes Expressionsmuster der ca. 20 verschiedenen Zytokeratine auf (Franke et al. 1981, Moll et al. 1982).

Während M-Zellen beim Kaninchen, unabhängig von der Lokalisation im Darm, Tonsillen oder Bronchus, neben Zytokeratinen das für Zellen mesenchymaler Abstammung charakteristische Vimentin enthalten (Gebert et al. 1992, Gebert und Hach 1993, Jepson et al. 1992), haben Untersuchungen an den M-Zellen der Peyer'schen Plaques des Schweins gezeigt, dass diese Zellen sich durch die Expression von Zytokeratin 18 von den benachbarten Enterozyten unterscheiden (Gebert et al. 1994). Diese Ergebnisse an den Peyer'schen Plaques konnten in Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Gegensatz zur Situation in den Peyer'schen Plaques konnte jedoch in der Cardiadrüsenzzone des Schweinemagens mit keinem der drei eingesetzten Anti-Zytokeratin-18-Antikörper eine selektive Darstellung einzelner Zelltypen erreicht werden, sondern alle Epithelzellen, d.h. die Schleim-produzierenden Zellen des Oberflächenepithels, die mukösen und serösen Zellen der Drüsentubuli und die Zellen, die

Lymphozytencluster umschließen und somit als M-Zellen identifiziert wurden, zeigten eine positive Immunreaktion, wenn diese auch in den M-Zellen stärker ausfiel als in den anderen Epithelzellen. Die Zytokeratine 8 und 19 zeigten ein ähnliches Muster der Immunreaktion wie Zytokeratin 18. Diese Befunde stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass die Zytokeratine 8, 18 und 19 in der Regel paarweise auftreten (Franke et al. 1981, Moll et al. 1982). Allerdings war die Reaktion von Zytokeratin 8 insbesondere im Oberflächenepithel und in den mukösen Drüsenabschnitten schwächer als die der Zytokeratine 18 und 19, so dass in der Cardidrüsenregion des Schweinemagens eher die Zytokeratine 18 und 19 paarweise vorzukommen scheinen als 8 mit 18 oder 19 wie es charakteristischerweise im Darmepithel der Fall ist (Franke et al. 1981, Moll et al. 1982).

Im Unterschied zu den Immunreaktionen der Antikörper gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 zeigten allein M-Zellen bei hohen Arbeitsverdünnungen eine selektive Immunreaktion mit dem Anti-Zytokeratin-7-Antikörper. Die Tatsache, dass in der direkten Umgebung der M-Zellen einige wenige Zellen, die keine Lymphozytencluster umschlossen und daher nicht dem typischen M-Zell-Phänotyp entsprachen, ebenfalls mit dem Anti-Zytokeratin-7-Antikörper reagierten, steht nicht in Widerspruch zu dieser Aussage. Untersuchungen an den Peyer'schen Plaques des Kaninchens haben gezeigt, dass am Übergang von den Krypten zum Dome bzw. an dessen Basis Vimentin-immunreaktive Epithelzellen auftreten, die keine Lymphozytencluster umschließen und wahrscheinlich unreife oder Vorstufen von M-Zellen darstellen (Bye et al. 1984, Gebert et al. 1992). Die Frage, ob M-Zellen aus differenzierten Enterozyten entstehen, deren Bildung durch ins Epithel eingewanderte Lymphozyten induziert wird (Smith und Peacock 1982) oder einen eigenständigen Zelltyp darstellen, der sich direkt aus den epithelialen Stammzellen differenziert (Bye et al. 1984), ist insofern geklärt, als Gebert und Mitarbeiter (1999b) an den Peyer'schen

Plaques der Maus gezeigt haben, dass M-Zellen nur aus spezialisierten Krypten entstehen, so dass von einer Determination der M-Zellen ausgegangen werden muss. In Analogie zu diesen Befunden am Dünndarm der Maus muss davon ausgegangen werden, dass auch die M-Zellen in der Cardidrüsenregion des Schweinemagens einen distinkten Zelltyp darstellen, der sich über determinierte Vorläuferzellen aus Stammzellen entwickelt.

Obwohl die verschiedenen histologischen M-Zell-Marker offenbar nicht mit der Funktion dieser Zellen korrelieren, haben sie wesentlich dazu beigetragen, das Verständnis für deren Funktion und Entwicklung zu verbessern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Zytokeratin 7 ein brauchbarer zytochemischer Marker für M-Zellen in der Cardidrüsenregion des Schweinemagens und Zytokeratin 18 in der Selektivität überlegen ist. Damit unterscheiden sich die M-Zellen des Schweins in den verschiedenen Lokalisationen (Dünndarm und Magen) in ihrem Zytokeratinmuster, so dass ein einheitlicher Marker zumindest dieser Proteinfamilie, der die M-Zellen unabhängig von der Lokalisation gleichermaßen selektiv erkennt, zur Zeit nicht zur Verfügung steht. Gleichwohl kann Zytokeratin 7 in weiteren Untersuchungen zur Funktion und Abstammung der M-Zellen im Magen des Schweins nützlich sein, wie Untersuchungen am Kaninchen, die Vimentin als M-Zell-Marker verwendet haben, gezeigt haben.

Es stellt sich die Frage nach der Bedeutung der differenzierten Expression von Zytokeratinen in den Drüsenzellen und M-Zellen in der Cardidrüsenregion im Schweinemagen. Funktion der Zytokeratine wie der anderen Intermediärfilamente liegt in der Erhaltung der Form der Zelle und der Lage der Zellorganellen, z.B. des Nucleus, innerhalb der Zelle (Franke et al. 1979). Diese mechanische Funktion wird unterstrichen durch die Tatsache, dass Intermediärfilamente in mechanisch beanspruchten Geweben, wie z.B. mehrschichtige Plattenepithelien und Herzmuskel,

stark ausgeprägt sind und mit den Desmosomen zusammen ein funktionelles System bilden, das dazu dient, die auf das Gewebe einwirkenden Kräfte gleichmäßig in diesem zu verteilen. In den Drüsenzellen, insbesondere den mukösen Zellen und in den Schleim-produzierenden Zellen des Deckepithels, ist die Immunreaktion für die betreffenden Zytokeratine vor allem perinukleär an der Zellbasis und im Bereich der Theka, d.h. im peripheren Zytoplasma außerhalb der dicht gepackten Schleimgranula. Dagegen ist die Immunreaktion in M-Zellen für alle Zytokeratine besonders ausgeprägt im membranös dünnen apikalen Zytoplasma. Dass es sich hierbei tatsächlich um die Immuno-Lokalisation von Zytokeratinproteinen bzw. -filamenten handelt, konnte auf ultrastruktureller Ebene exemplarisch durch die Immunogold-Lokalisation von Anti-Zytokeratin-19-Antikörpern belegt werden. Dieser Bereich der Zelle ist auf Grund des „membranös“ dünnen Zytoplasmas einem besonderen mechanischen Stress ausgesetzt, was die Akkumulation von Zytokeratinfilamenten erklärt. Andererseits ist es der Bereich, den die Antigen-beladenen transzytotischen Vesikel auf dem Weg von der apikalen zur invaginierten basalen Zellmembran durchqueren. Die Anordnung der Zytokeratinfilamente muss zwei Funktionen erfüllen: einerseits die Stabilität dieser fragilen Struktur garantieren, andererseits die Passage der Vesikel ermöglichen. Unbeantwortet bleibt die Frage, warum die M-Zellen zusätzlich zu den Zytokeratinen 8, 18 und 19 das Zytokeratin 7 exprimieren und was die spezifische Funktion dieses Proteins in diesen Zellen ist.

5 Zusammenfassung

Es ist seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt, dass die Schleimhaut der Cardidrüsenregion des Schweinemagens sehr reich an Lymphfollikeln ist. Sie ist damit als Teil des organisierten Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebes zu betrachten, das im Verdauungstrakt, neben den Tonsillen, in der Regel im Ileum in Form der Peyer'schen Plaques am stärksten ausgeprägt ist. Oberhalb der in der Mucosa gelegenen Follikel unterscheidet sich das Epithel (Follikel-assoziiertes-Epithel oder Dome-Epithel) von dem umgebenden Epithel, in dem es für die Antigenaufnahme spezialisierte M-Zellen enthält. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, M-Zellen in der Cardidrüsenregion des Schweinemagens ultrastrukturell zu identifizieren und einen zytochemischen Marker zu etablieren, der die lichtmikroskopische Identifikation dieser Zellen erlaubt.

Die Cardidrüsen des Schweins bestehen aus einem oberflächlich gestreckten Tubulus, dessen Schleim-bildende Zellen eine positive PAS-Reaktion und Anfärbbarkeit mit Alcian-Blau zeigen, und einem tiefen geknäuelten Anteil, in dem seröse Zellen vorherrschen, die Lysozym bilden. Zwischen den Drüsen kommen Lymphfollikel vor, häufig in engem Kontakt zum Drüsenepithel. Insbesondere in den serösen Drüsenabschnitten wurden im Follikel-assoziierten-Epithel Zellen beobachtet, die die morphologischen Kriterien von M-Zellen aufwiesen: eine tief invaginierte basale Zellmembran, die Cluster von intraepithelial gelegenen Lymphozyten und Makrophagen umschließt, und oberhalb dieser taschenförmigen Einstülpung eine dünne Zytoplasmabrücke, in der zahlreiche Vesikel vorkommen, die dem Transport von Antigenen aus dem Drüsenlumen zu den intraepithelial gelegenen immunkompetenten Zellen dienen können.

Da Intermediärfilamentproteine sich verschiedentlich als brauchbare histochemische Marker für M-Zellen erwiesen haben, wurden die Zellen der Cardiadrüsen auf das Vorkommen der Cytokeratine 4, 5/6, 7, 8, 14, 18 und 19 sowie der Intermediärfilamentproteine Vimentin und Desmin immunhistochemisch untersucht. Während die Deckepithelzellen, die mukösen und serösen Drüsenzellen und die M-Zellen eine positive Immunreaktion für die Anti-Zytokeratin-8-, -18- und -19-Antikörper zeigten, stellte der Anti-Cytokeratin-7-Antikörper selektiv die M-Zellen dar. Die Anti-Cytokeratine 4, 5/6 und 14 zeigten eine positive Immunreaktion der basalen (Anti-CK 14) und intermediären (Anti-CK 4 und Anti-CK 5/6) Zellschichten des mehrschichtigen unverhornten Epithels der benachbarten Ösophagusschleimhaut, während weder mit dem Vimentin- noch dem Desminantikörper eine positive Immunreaktion des Epithels erzielt wurde. Auf Grund der immunhistochemischen Befunde kann Cytokeratin 7 als verlässlicher Marker für die M-Zellen in der Cardiadrüsenregion des Schweinemagens gelten.

6 Literaturverzeichnis

- Allan CH, Mendrick DL, Trier JS (1993) Rat intestinal M cells contain acidic endosomal lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* 104 (3):698-708
- Atkins AM, Schofield GC (1972) Lymphoglandular complexes in the large intestine of the dog. *J Anat* 113:169-178
- Beezhold DH, Sachs HG, Van Alten PJ (1983) The development of transport ability by embryonic follicle-associated epithelium. *J Reticuloendothel Soc* 34:143-152
- Bienenstock J, McDermott M, Befus D, O'Neill M (1978) A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel. *Adv Exp Med Biol* 107:53-59
- Bienenstock J, McDermott MR, Befus AD (1982) The significance of bronchus associated lymphoid tissue. *Bull Europ Physiopath Resp* 18:153-177
- Biewenga J, Rees EP, Sminia T (1993) Induction and regulation of IgA responses in the microenvironment of the gut. *Clin Immunol Immunopathol* 67:1-7
- Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D (1995) Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108:1566-1581
- Bockman DE (1983) Functional histology of appendix. *Arch Histol Jap* 46:271-292
- Bockman DE, Cooper MD (1973) Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat* 136:455-478

-
- Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johanson FE, Nilsen EM, Yamanaka T (1999a) Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* 20:141-151
- Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G (1999b) Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today* 20:267-277
- Brown RW, Chirala R (1995) Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* Jun 8(5):515-20
- v.d. Brugge-Gamelkoorn GJ (1986) Structure and function of bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in the rat. Amsterdam, Med. Fak., Diss.
- Bye WA, Allan CH, Trier JS (1984) Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 86:789-801
- Chandler JW, Axelrod AJ (1980) Conjunctiva-associated lymphoid tissue: a probable component of the mucosa-associated lymphoid system. In: O'Connor G.R. ed. *Immunologic diseases of mucous membranes*. Masson, New York, 63-70.
- Chu RM, Glock RD, Ross RF (1979) Gut-associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine. *Am J Vet Res* 40:1720-1728
- Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH (1994) Differential surface characteristics of M-cells from mouse intestinal Peyer's patches and caecal patches. *Histochem J* 26:271-280
- Davenport WD, Allen ER (1995) Dome epithelium and follicle-associated basal lamina pores in the avian bursa of Fabricius. *Anat Rec* 241:155-162
- De Mey J (1983) Colloidal gold probes in immunocytochemistry. In: Polak JM, Van Noorden S (eds.) *Immunocytochemistry, practical applications in pathology and biology*, Wright-PSG, Bristol London Boston, pp 55-88

-
- Ellenberger, Handbuch der vergleichenden Histologie und Physiologie der Haussäugetiere. 1.Bd. Histologie. Berlin 1884
- Ellenberger, Handbuch der vergleichenden Histologie und Physiologie der Haustiere. 3.Bd. Berlin 1911
- Franke WW, Appelhans B, Schmid E, Freudenstein C (1979) The organization of cytokeratin filaments in the intestinal epithelium. *Eur J Cell Biol* 19:255-268
- Franke WW, Winter S, Grund C, Schmid E, Schiller DL, Jarasch ED (1981) Isolation and characterization of desmosome-associated tonofilaments from rat intestinal brush border. *J Cell Biol* 90:1116-127
- Fröhlich, Untersuchungen über die Übergangszone und einige Eigentümlichkeiten des feineren Baues der Magenschleimhaut der Haussäugetiere. Inaug.-Diss., Leipzig 1907
- Gebert A (1995) Identification of M-cells in the rabbit tonsil by vimentin immunohistochemistry and in vivo protein transport. *Histochem Cell Biol* 104:211-220
- Gebert A (1996) M-cells in the rabbit tonsil exhibit distinctive glycoconjugates in their apical membrane. *J Histochem Cytochem* 44:1033-1042
- Gebert A, Hach G (1993) Differential binding of lectins to M-cells and enterocytes in the rabbit cecum. *Gastroenterology* 105:1350-1361
- Gebert A, Bartels H (1995) Ultrastructure und protein transport of M cells in the rabbit cecal patch. *Anat Rec* 241:487-495
- Gebert A., Pabst R. (1999) M cells at locations outside the gut. *Immunology* Vol.11:165-170
- Gebert A, Hach G, Bartels H (1992) Co-localization of vimentin and cytokeratins in M-cells of rabbit gut-associated lymphoid tissue (GALT). *Cell Tissue Res* 269:331-340

-
- Gebert A, Rothkötter HJ, Pabst R (1994) Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res* 276:213-221
- Gebert A, Rothkötter HJ, Pabst R(1996) M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 167:91-159
- Gebert A, Fassbender S, Weißferdt A, Preiss G (1999a) Detection of glycoconjugates by lectin-gold labelling, silver enhancement, and scanning electron microscopy. *J Electron Microsc* 48:85-87
- Gebert A, Fassbender S, Werner K, Weißferdt A (1999b) The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am J Pathol*; 154:1573-1582
- Gebert A, Göke M, Rothkötter HJ, Dietrich CF (2000) Mechanismen der Antigenaufnahme im Dünn- und Dickdarm: die Rolle der M-Zellen für die Initiierung von Immunantworten. *Gastroenterol* 38:855-872
- Grube D, Kusomoto Y (1986) Serial semithin sections in immunohistochemistry: techniques and applications. *Arch Histol Jpn* 49:391-410
- Grube D, Yoshie S (1989) Immunohistochemistry of chromogranin A and B, and secretogranin II in the canine endocrine pancreas. *Acta Histol Cytol* 52:287-98
- Hanger JJ, Heath TJ (1994) The arrangement of gut-associated lymphoid tissue and lymph pathways in the koala (*Phascolarctos cinereus*). *J Anat* 185:129-134
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of a avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in Immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody PAP procedures. *J Histochem Cytochem* 27:577-80
- Inman LR, Cantey JR (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

-
- Jarry A, Robaszekiewicz M, Brousse N, Potet F (1989) Immune cells associated with M cells in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches in the rat. An electron- and immuno-electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 255:293-298
- Jepson MA, Mason CM, Bennett MK, Simmons NL, Hirst BH (1992) Coexpression of vimentin and cytokeratins in M cells of rabbit intestinal lymphoid follicle-associated epithelium. *Histochem J* 24:33-39
- Kato A, Hashimoto Y, Kon Y, Sugimura M (1992) Are there M cells in the cecal tonsil of chickens? *J Vet Med Sci* 54:999-1006
- König und Liebich (2003) *Anatomie der Haussäugetiere*. 3.Auflage. Schattauer; Stuttgart, New York, 326-331
- Knop N, Knop E (2000) Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1270-1279
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR (1992) Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 72:853-879
- Liebler EM, Pohlenz JF, Cheville NF (1988) Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. II. Electron microscopy. *Vet Pathol* 25:509-515
- Mönig, Zur Histologie der Cardiadrüsen von *Sus scrofa*. Inaug.-Diss. Zürich 1909
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24
- Mowat AM, Viney JL (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156:145-166
- Mowat AM, Donachie AM, Parker LA, Robson NC, Beacock-Sharp H, McIntyre LJ, Millington O, Chirido F. (2003) The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance. *Novartis Found Symp* 252:291-302

-
- Naukkarinen A, Arstilla AU, Sorvari TE (1978) Morphological and functional differentiation of the surface epithelium of the bursa Fabricii in chicken. *Anat Rec* 191:415-432
- Neutra MR, Kraehenbuhl JP (1992) Transepithelial transport and mucosal defence I: the role of M cells. *Trends Cell Biol* 2:134-138
- Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP (1996) Epithelial M cells: gateway for mucosal infection and immunization. *Cell* 86:345-348
- Neutra MR, Phillips TL, Mayer EL, Fishkind DJ (1987) Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res* 247:537-546
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Band II. 7.Auflage. Paul Parey; Berlin, Hamburg
- Owen RL, Jones AL (1974) Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66:189-203
- Owen RL (1977) Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* 72:440-451
- Owen RL, Nemanic P (1978) Antigen processing structures of the mammalian tract: an SEM study of lymphoepithelial organs. *Scanning Electron Microsc* 11:367-378
- Owen RL, Pierce NF, Apple RT, Cray WC (1986) M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis* 153:1108-1118

-
- Pabst R (1987) The anatomical basis of the immune function of the gut. *Anat. Embryol* 176:135-144
- Plenk H. V/2 Verdauungsapparat In: Möllendorf W. ed. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Springer, Berlin 1932, 182-184
- Racz P, Tenner-Racz K, Myrvik QN, Fainter LK (1977) Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. *J Reticuloendothel Soc* 22(1):59-83
- Reynolds J (1963) *J Cell Bio* 17:208
- Reynolds GM, Young FI, Young JA, Williams A, Rowlands DC (1994) Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens. *Cytopathology Dec* 5(6):345-58
- Rosen L, Podjaski B, Bettmann I, Otto HF (1981) Observations on the ultrastructure and function of the so-called "microfold" or membraneous cells (M cells) by means of peroxidase as a tracer. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 390:289-312
- Schmedtje JF (1980) Lymphocyte positions in the dome epithelium of the rabbit appendix. *J Morphol* 166:179-195
- Scicchitano R, Stanicz A, Ernst P, Bienenstock J (1986) A common mucosal immune system revisited. In: *Migration and homing of lymphoid cells*. Husband AJ (Hrsgb.) CRC Press, Orlando, Vol.II, S.1-34
- Smith MW, Peacock MA (1982) Lymphocyte induced formation of antigen transporting 'M'-cells from fully differentiated mouse enterocytes. In: Robinson JW, Dowling RH, Riecken EO (eds) *Mechanisms of intestinal adaptation*. MTP, Lancaster, pp 573-583
- Sternberger LA (1986) *Immunocytochemistry*. Wiley, New York
- Streilein JW (1983) Skin-associated lymphoid tissue (SALT): Origins and functions. *J Invest Dermatol.*, 80 Suppl: 12s-16s

-
- Torres-Medina A (1981) Morphologic characteristics of the epithelial surface of aggregated lymphoid follicles (Peyer's patches) in the small intestine of newborn gnotobiotic calves and pigs. *Am J Vet Res* 42:232-236
- Trautmann A. (1925) Die embryonale und postembryonale Entwicklung der Kardiadrüsenzzone im Magen von *Sus scrofa* sowie die Ausbildung und physiologische Bedeutung des lymphatischen (zytoblastischen) Gewebes in derselben. *Anatomischer Anzeiger* Bd.60, No.14/15
- Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Kraehenbuhl JP, Neutra MR (1989) Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol* 108:1673-1685
- Wolf JL, Rubin DH, Finberg R, Kauffman RS, Sharpe AH, Trier JS; Fields BN (1981) Intestinal M-cells: a pathway for entry of reovirus into the host. *Science* 212:471-472

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. U. Welsch (Vorstand des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München) danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Bartels. Die stets gern gewährte Hilfe bei der Beurteilung der Präparate sowie die von ihm eingebrachten konstruktiven Vorschläge und Anregungen hatten maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Frau Ursula Fazekas gebührt mein großer Dank für die unermüdliche Hilfestellung während der Phasen der Laborarbeit, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiter danke ich den technischen Assistentinnen des Lehrstuhls II, Frau Astrid Sulz, Frau Sabine Tost und Frau Sabine Herzmann herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Unterstützung im Labor.

Frau PD Dr. Mechthild Stöckelhuber danke ich sowohl für die großzügige Bereitstellung ihres Mikroskops zur Digitalisierung der mikroskopischen Präparate als auch für die Hilfe bei fachlichen Fragen.

Meinem Freund und Mann Stefan danke ich für die moralische Unterstützung und ein stets offenes Ohr bei Fragestellungen jeglicher Art.

Ein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meiner Mutter, die mir eine sorgenfreie Studien- und Promotionszeit ermöglichte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Uta Gesell, geb. Schulze
Anschrift: Asgardstr. 16
81925 München
Geburtsdatum: 15. April 1976
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt j. Chemnitz
Familienstand: verheiratet mit Dr. Stefan Gesell, Fachtierarzt für Pferde,
eine Tochter
Eltern: Dipl.-Ing. Hartmut Schulze, Ingenieur, verst. 1993
Dipl.-med. Witta Schulze, Zahnärztin

Schulausbildung

1982-1983 Grundschule Lichtenstein
1983-1984 Wilhelm-Raabe-Schule Eschershausen
1984-1986 Klosterschule Dachau
1986-1996 Josef-Effner-Gymnasium Dachau
1992-1993 High-School Blairsville, Georgia, USA
Abschluss: High-School-Diploma
1996 *Abschluss:* Abitur

Berufsausbildung

1996-2000 Ludwig-Maximilians-Universität München
Studium der Tiermedizin
September 1999 1. Staatsexamen
2000-2004 Ludwig-Maximilians-Universität München
Studium der Zahnmedizin
Juni 2004 *Abschluss:* Staatsexamen
3. Juni 2004 Erteilung der Approbation als Zahnärztin
Seit März 2005 Postgraduelles Studium an der Donau-Universität Krems zum
Master of Science Kieferorthopädie

Berufliche Tätigkeit als Zahnärztin

Seit 1. Juli 2004 Vorbereitungsassistentin
Zahnarztpraxis Dipl.-med. W. Schulze, 85221 Dachau