

# **1 Einleitung**

## **1.1 Angeborene und erworbene Immunität**

Im Laufe der Evolution hat sich in höheren Wirbeltieren ein wirkungsvolles Immunsystem zum Schutz des Körpers gegen krankheitserregende Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze), Parasiten, Fremdstoffe und maligne Zellen entwickelt. Die Abwehr der unterschiedlichsten Erreger wird durch verschiedene spezialisierte Zellen und komplexe Abwehrmechanismen gewährleistet. Grundlegende Charakteristika des Immunsystems sind seine hochgradige Spezifität und die Fähigkeit zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden.

Die beiden funktionellen Einheiten des Immunsystems, die angeborene, unspezifische Immunität und die erworbene, spezifische Immunantwort, arbeiten synergistisch zusammen. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr, die in den Körper eingedrungene Erreger aufgrund von allgemeinen strukturellen Merkmalen erkennt und durch Phagozytose und Sekretion von zytotoxischen Substanzen eliminiert. An diesen Abwehrreaktionen sind u.a. Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie Zytokine und Faktoren des Komplementsystems beteiligt. Kann eine Infektion durch diese frühen Abwehrmaßnahmen nicht beseitigt werden, kommt es zu einer adaptiven, spezifischen Immunantwort. Diese zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, das gleiche Antigen bei erneuter Konfrontation wiederzuerkennen und dadurch schneller und effektiver bekämpfen zu können. Die Eigenschaften der erworbenen Immunität und seines immunologischen Gedächtnisses beruhen auf der Selektion und klonalen Expansion von B- und T-Lymphozyten, die eine Vielfalt hochspezifischer Antigenrezeptoren besitzen und durch diese die unterschiedlichsten Pathogene und ihre Toxine erkennen. Aus einem breiten Spektrum von Effektormechanismen werden dann dem Antigen angemessene Reaktionen induziert.

Jeder Lymphozyt trägt auf seiner Zelloberfläche Antigenrezeptoren nur einer einzigen Spezifität, die sich durch somatische Rekombinationen während der frühen Zelldifferenzierung herausbildet. Die genetische Information zur Bildung der Antigenrezeptoren ist auf mehrere Gensegmente verteilt und wird bei der somatischen Rekombination während der Zellreifung zufällig zusammengesetzt.

Durch dieses sogenannte „Genarrangement“ entstehen Lymphozyten, deren gesamtes Repertoire von Antigenrezeptoren eine sehr große Vielfalt aufweisen.

## 1.2 Humorale und zelluläre Immunität

Die verschiedenen Abwehrreaktionen der adaptiven Immunantwort lassen sich vereinfacht in zwei große Klassen von Immunreaktionen untergliedern: Die humorale Antikörper-vermittelte Antwort, für die die B-Lymphozyten (B-Zellen) verantwortlich sind und die zellvermittelte Immunantwort, die hauptsächlich mittels T-Lymphozyten (T-Zellen) erfolgt. Diese Einteilung basiert auf zwei unterschiedlichen Erkennungssystemen der Lymphozyten, die auf die Erfassung von extra- und intrazellulären Krankheitserregern spezialisiert sind.

Bei der humoralen Antwort werden die verschiedenen Abwehrreaktionen zur Eliminierung von extrazellulären Pathogenen, z.B. Komplementaktivierung, Phagozytose und Neutralisierung, größtenteils durch spezifische Immunglobuline (Antikörper) vermittelt, die von aktivierten B-Zellen sezerniert werden. Die Aktivierung der B-Zellen und nachfolgende Differenzierung zu verschiedenen Effektorzellen (langlebige Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen) erfolgt durch die spezifische Bindung des Antigens an den membrangebundenen B-Zellrezeptor und erfordert in vielen Fällen die Hilfe von spezifischen aktivierten T-Helferzellen (Th-Zellen).

Die zellvermittelte Immunantwort bekämpft intrazelluläre Erreger, z.B. Viren, einige Parasiten und Bakterien, die vor dem Angriff durch Antikörper geschützt sind. Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Zellen attackieren infizierte Körperzellen direkt und eliminieren sie durch Freisetzung von zytotoxischen Substanzen oder induzieren den programmierten Zelltod (Apoptose) der befallenen Zelle. Die Antigen-Rezeptoren der zytotoxischen T-Zellen erkennen Peptidfragmente intrazellulärer Pathogene, die innerhalb des Zytosols im Proteasom prozessiert und mit Hilfe der Haupthistokompatibilitäts (MHC)-Moleküle der Klasse I an der Oberfläche der infizierten Zellen präsentiert werden. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert.

Im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) erkennen Th-Zellen über ihren T-Zellrezeptor (TCR) antigene Peptide, die auf MHC-Molekülen der Klasse II von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) an der Oberfläche präsentiert werden. Hierfür werden die extrazellulären Pathogene zuerst von den APC durch Endozytose

oder, bei den B-Zellen, durch die Antigen-spezifischen B-Zellrezeptoren aufgenommen und anschließend in den lysosomalen Kompartimenten prozessiert. Danach werden die Peptidfragmente der Antigene mit MHC-II-Molekülen an die Oberfläche befördert. Als APC können dendritische Zellen (DC), aktivierte B-Zellen und Makrophagen fungieren. Th-Zellen, im nachfolgenden aufgrund der Expression des membranintegralen Oberflächenmoleküls CD4 auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen genannt, sind sowohl an der humoralen, als auch an der zellulären Immunantwort beteiligt. Sie beeinflussen die Immunantwort mit Hilfe der von ihnen sezernierten Zytokine und ihrer kostimulatorischen Signale.

Die Aktivierung der angemessenen Abwehrmechanismen erfordert nicht nur die spezifische Antigenerkennung über die MHC-Komplexe der beteiligten Zellen, sondern auch kostimulierende Wechselwirkungen mit anderen spezialisierten Zellen, an denen oberflächengebundene Moleküle, Cluster of Differentiations (CD-Antigene) und sezernierte Moleküle, wie zum Beispiel Zytokine beteiligt sind (1, 2). Die Zytokine bilden eine heterogene Gruppe von löslichen Proteinen, die von vielen unterschiedlichen Zellen gebildet und freigesetzt werden können, u.a. von B- und T-Zellen, Makrophagen oder Mastzellen. Die meisten Zytokine besitzen viele verschiedene biologische Effekte und beeinflussen Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Zielzellen, die spezifische Oberflächenrezeptoren tragen. Die Wirkung eines Zytokins ist abhängig vom Zielzell-Typ (u.a. B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Gewebezellen) und meist lokal begrenzt.

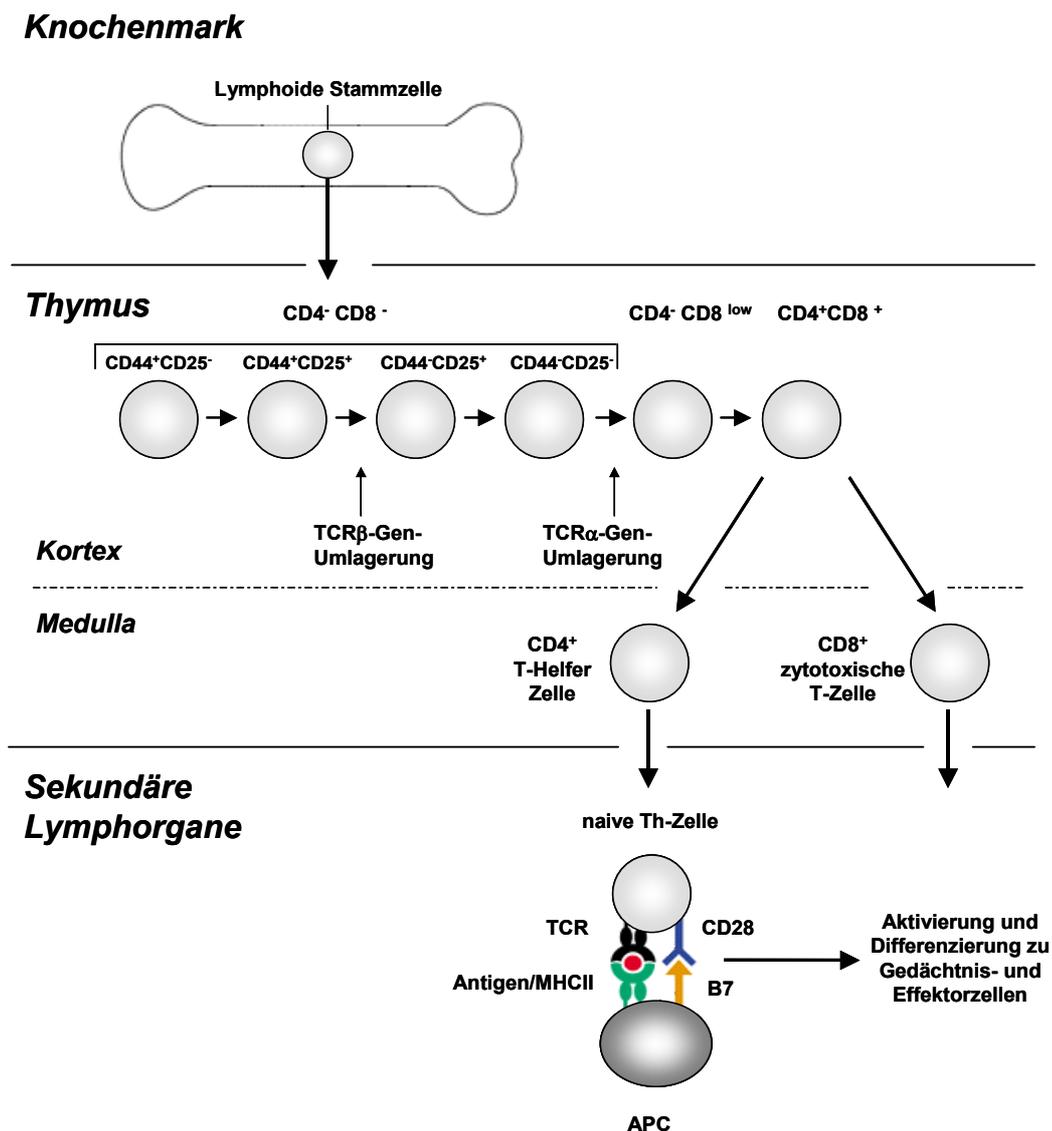
### **1.3 Der Thymus und die Entwicklung der T-Lymphozyten**

Die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu reifen Lymphozyten findet in den sog. zentralen oder primären lymphatischen Organen, dem Thymus (T-Zellen) und dem Knochenmark (= bone marrow; B-Zellen), statt. Hierfür wandern die T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durch das Blut in den Thymus und durchlaufen im Thymuskortex aufeinanderfolgende Stadien der T-Zell-Differenzierung (Thymopoese) (Abb.1). Das Markepithel enthält nur reife T-Zellen. Die verschiedenen Entwicklungsstadien der Thymozyten sind gekennzeichnet durch die differentielle Expression von Oberflächenmolekülen (CD3-TCR-Komplex, CD4, CD8 u.a.). Die früheste Zellpopulation im Thymus exprimiert weder CD4 noch CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) und beträgt ca. 1-5% der gesamten Thymozytenpopulation. Bei der Entwicklung der  $\alpha\beta$ T-

Zellen entsteht zuerst eine funktionelle TCR- $\beta$ -Kette. Signale über den TCR- $\beta$ -Ketten-Komplex führen zu Proliferation und Expansion der Thymozyten und induzieren die Umordnung der TCR- $\alpha$ -Ketten-Gene und die Expression der CD4 und CD8-Rezeptoren. Ca. 80-90% aller Thymozyten sind CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen. Die meisten dieser  $\alpha\beta$  Zellen sterben, nur ca.10% überleben durch positive Selektion. Hierbei reifen jene CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen, deren TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimer Peptid-Selbst-MHC-Komplexe erkennt, die von epithelialen Thymuszellen exprimiert werden und mit geringer Affinität binden (3-6). Zellen, die mit hoher Affinität die Selbstpeptid-MHC-Komplexe binden werden durch die Induktion von Apoptose negativ selektioniert (7). Auf diese Weise soll verhindert werden, dass autoreaktive T-Lymphozyten erzeugt werden (Zentrale Toleranz). Die selektionierten, reifen Thymozyten verlieren die Expression eines der beiden Korezeptormoleküle und werden somit entweder CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Thymozyten, die anschließend den Thymus verlassen und in die Peripherie auswandern. Dort zirkulieren die reifen naiven T-Zellen kontinuierlich über das Blut durch die sekundären Lymphorgane Milz, Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (8, 9).

#### **1.4 Aktivierung und Differenzierung naiver Th-Zellen**

Für eine Aktivierung und Expansion von naiven Th-Zellen sind mehrere Signale, welche die T-Zelle durch die professionellen APC erhalten muss, notwendig. Neben der Erkennung der antigenen Determinanten auf dem MHC-Molekül durch den TCR sind weitere kostimulatorische Signale erforderlich. Der TCR/MHCII-Kontakt und die stabilisierende Bindung zwischen dem CD4-Molekül und dem MHCII-Molekül führen zur verstärkten, vorübergehenden Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf der T-Zelle und der APC. Das wichtigste kostimulatorische Signal wird durch die Bindung der APC-exprimierten membrangebundenen Glykoproteine CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) mit dem CD28-Molekül, das sich auf der Oberfläche der Th-Zellen befindet, vermittelt (Abb.1).



**Abbildung 1: T-Zell-Entwicklung im Thymus und Aktivierung naiver Th-Zellen in den sekundären Lymphorganen.**

Aus dem Knochenmark eingewanderte Stammzellen entwickeln sich im Thymus zu reifen, naiven T-Zellen. Dargestellt sind die verschiedenen Entwicklungsstadien der Thymozyten anhand der charakteristischen Expression von Oberflächenmolekülen und die Expression der TCR-Gene. In der Peripherie sind zur Aktivierung der naiven Th-Zellen zwei durch APC-vermittelte Signale essentiell.

Nach Aktivierung differenzieren naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th-Effektorzellen. Aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine lassen sich Th-Zellen in Th1- und Th2-Subpopulationen einteilen. Diese Gliederung wurde erstmalig anhand der Analyse von Th-Zellklonen der Maus beschrieben, später wurden derartige Sekretionsmuster

auch bei humanen Th-Zellklonen gefunden (10-12). Sogenannte Th1-Zelllinien sezernieren nach Aktivierung IL-2, Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), während Th2-Zelllinien IL-4, IL-5 und IL-13 exprimieren. Daneben gibt es auch Th-Zelllinien des Menschen und der Maus, die durch ein gemischtes, sogenanntes Th0-Sekretionsmuster charakterisiert sind. Diese sezernieren sowohl Th1-Zytokine als auch Th-2-Zytokine (13). Bei der Th-Zellpolarisierung von naiven Zellen spielen v.a. Zytokine eine zentrale Rolle. Das von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produzierte Zytokin IL-12 induziert in naiven Th-Zellen die Sekretion von Th1-Zytokinen (14-17). Der wichtigste Differenzierungsfaktor zur Induktion der antiinflammatorischen Th2-Zytokine ist IL-4 selbst (18-20). Analysen auf Einzelzellebene zeigen, dass die Zytokinexpression in individuellen Th-Zellen variabler ist als angenommen und die beschriebenen Th1- und Th2-Zellen vielmehr extreme Polarisierungen von fließend übergehenden T-Zellpopulationen *in vitro* darstellen, die nur selten auch in dieser strikten Form *in vivo* auftreten (21-23).

### 1.5 Naive und Antigen-erfahrene Th-Zellen

Th-Lymphozyten können aufgrund ihres Differenzierungsstadiums in naive, Antigen-unerfahrene Th-Zellen und Antigen-erfahrene Gedächtnis- und Effektorzellen unterteilt werden (18, 24). Man kann naive und Antigen-erfahrene Th-Zellen anhand der charakteristischen Expression von Zytokinen nach antigener oder mitogener *in vitro* Stimulation unterscheiden. Antigen-erfahrene Th-Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung neben IL-2 zusätzlich Effektorzytokine, wie z.B. IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , während naive Th-Zellen nach Stimulation zunächst nur IL-2 produzieren, aber keine Effektorzytokine exprimieren (25, 26). Weiterhin werden zur Unterscheidung, Isolierung und Analyse von humanen naiven und Antigen-erfahrenen Th-Lymphozyten auch verschiedene Oberflächenmarker verwendet, die auf diesen beiden Th-Subpopulationen unterschiedlich exprimiert werden, u.a. CD45-Isoformen, L-Selektin (CD62L), CD27, CD44, CD95, LFA-1 (CD11a/CD18), CD31, HLA-DR, CD7 und CD26 (Tab.1). Die Expression dieser Moleküle bewirkt Unterschiede zwischen naiven und Antigen-erfahrenen Th-Zellen hinsichtlich Zell-Zell-Interaktion, *in vivo*-Lokalisierung oder Aktivierungsbedingungen.

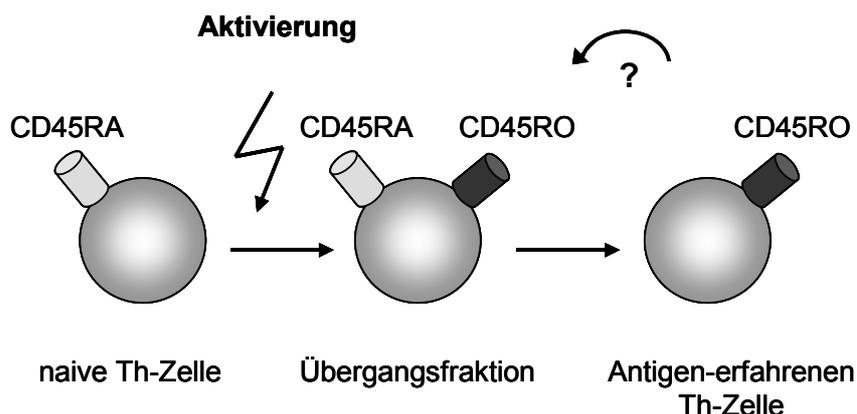
**Tabelle 1: Oberflächenmoleküle, die von naiven und Antigen-erfahrenen Th-Zellen unterschiedlich exprimiert werden.**

<i>naive Th-Zellen</i>	<i>Antigen-erfahrene Th-Zellen</i>
CD45RA	CD45RO
CD45RB	CD11a
CD62L	HLA-DR
CD27	CD95
CD44 <sup>low</sup>	CD44 <sup>high</sup>
CD31	CD26
CD7	

Sehr klassische, in der Literatur häufig beschriebene Oberflächenmoleküle, die naive und Antigen-erfahrene Th-Zellen im adulten peripheren Blut unterscheiden, sind die unterschiedlich exprimierten Isoformen des Transmembranmoleküls CD45. Das CD45-Molekül wird auf allen Lymphozyten exprimiert (leukocyte common antigen) und ist ein alternativ gespleißtes Protein. Naive Th-Zellen exprimieren die CD45RA-Isoform, während Antigen-erfahrene Th-Zellen durch die CD45RO-Isoform charakterisiert sind (27). Nach antigenener oder mitogener Stimulation der CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen findet eine Konversion vom naiven zum Antigen-erfahrenen Th-Zellstadium statt. CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen „verlieren“ die Expression der CD45RA-Isoform und beginnen gleichzeitig die CD45RO-Isoform auszuprägen (28, 29). Eine Übergangsfraction ist durch die gleichzeitige, jedoch schwächere Expression der beiden Isoformen charakterisiert (CD45RO<sup>low</sup>/CD45RA<sup>low</sup>) (29) (Abb.2).

Dieses früher gültige Konzept der irreversiblen phänotypischen Konversion von CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen nach deren Aktivierung zu CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen wurde durch mehrere Veröffentlichungen in Frage gestellt. Nach PMA/Ionomycin- Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen wurde eine „Re-Expression“ des CD45RA-Moleküls beobachtet (30). Die *in vivo*-Analysen von Bell und Sparshot deuten auf eine „bidirektionale“ Konversion der beiden Isoformen des CD45-Moleküls auf Th-Lymphozyten hin (31). Weiterhin wurde bei der Untersuchung der Lebensdauer der verschiedenen Isoformen des CD45-Moleküls eine phänotypische Konversion von humanen CD45RO<sup>+</sup> Zellen zu CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen in Betracht gezogen (32). Auch gibt es

Hinweise, dass Gedächtniszellen innerhalb der CD45RA-Population existieren, die durch „recall“-Antigene und zusätzliche CD28-Ligation aktiviert werden können (33). Allerdings konnte von Hamann et al. gezeigt werden, dass Antigen-erfahrene Th-Zellen, die zur naiven CD45RA-Isoform rekonvertiert sind, gleichzeitig durch eine geringfügige Expression des CD45RO-Moleküls charakterisiert sind (34).



**Abbildung 2: Phänotypische Konversion von naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen zu Antigen-erfahrenen CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen.**

Naive CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen verlieren nach Aktivierung ihren CD45RA-Rezeptor, gleichzeitig wird verstärkt die CD45RO-Isoform ausgeprägt. Eine Übergangsfraction dieser Umwandlung ist durch die schwache Expression beider Moleküle gekennzeichnet.

Zur Identifizierung von humanen naiven Th-Zellen wird häufig zusätzlich zum CD45RA-Molekül die gleichzeitige Expression des CD62L-Moleküls und/oder des CD27-Moleküls herangezogen (35). Weiterhin stellt auch das CD31-Molekül (PECAM-1, Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1) ein oft benutzter Marker für naive Th-Zellen dar (36, 37).

## 1.6 Thymusinvolution und naive Th-Zell-Homöostase

In der Kindheit und Jugend führt eine hohe Thymusaktivität zu hohen Frequenzen von naiven Th-Zellen in der Peripherie. Im Laufe des Lebens bildet sich der Thymus zurück. 1985 wurde von Steinmann et al. erstmals der biphasische Verlust des Thymusgewebes beschrieben. Bereits nach dem ersten Lebensjahr bis zum Alter von ca. 30-40 Jahren erfolgt eine schnelle Abnahme des Thymusepithels (ca. 3% pro Jahr), danach findet nur noch ein relativ langsamer Rückgang statt (ca. 1% pro Jahr) (38, 39). Die altersabhängige Atrophie des Thymus wird begleitet von

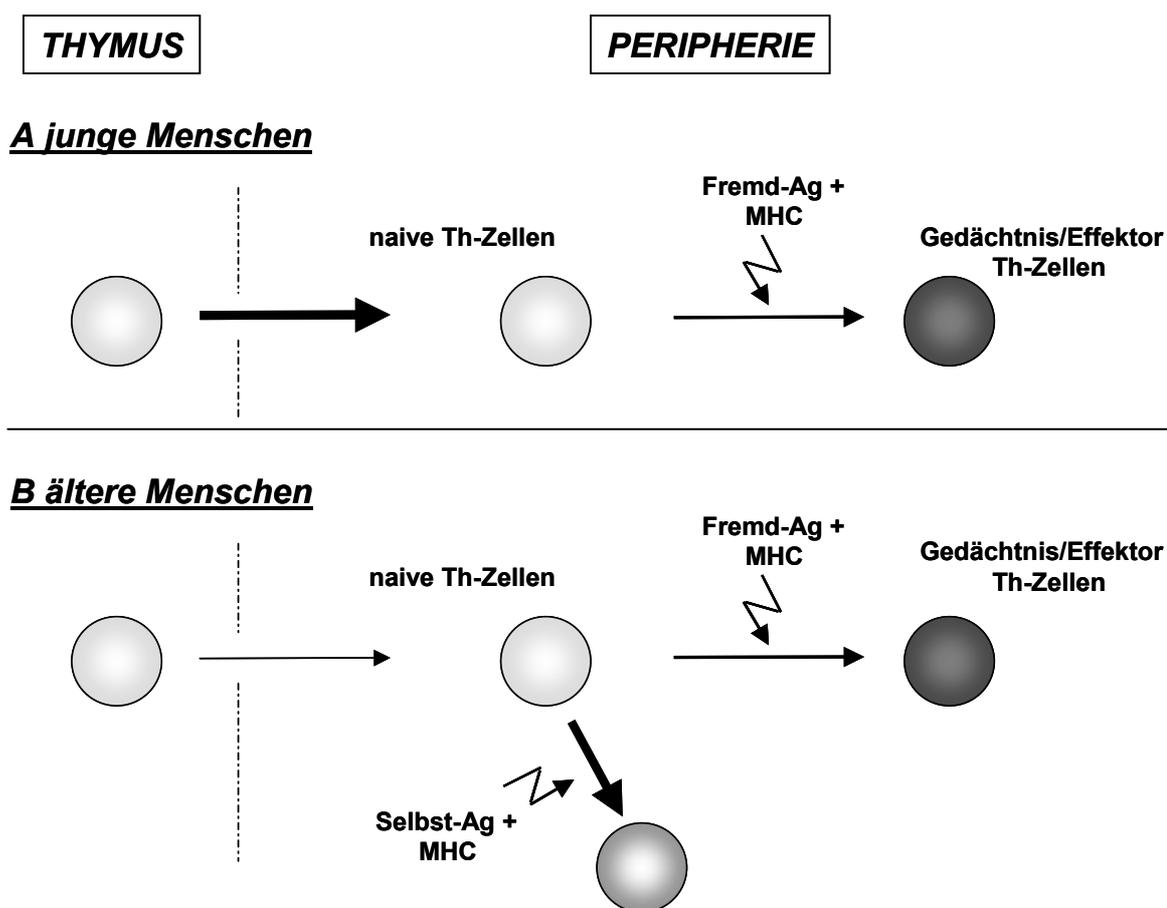
morphologischen Veränderungen und Fetteinlagerungen und führt folglich zu einer Reduktion seiner Organfunktion, der T-Lymphozyten-Entwicklung. Die Ursachen der altersabhängigen Thymusinvolution sind noch weitgehend ungeklärt, allerdings existieren hierzu mehrere Theorien über mögliche Gründe, u.a. die Reduktion der Anzahl oder Funktion der T-Zell-Vorläufer vom Knochenmark (40), das Fehlen oder Blockieren der TCR- $\beta$ -Ketten-Umordnung (41, 42), der Verlust von Selbstpeptiden auf thymischen epithelialen MHC-Molekülen (43), Veränderungen des Thymus-Mikromilieus, z.B. eine Verminderung des Thymusstroma und/oder die Abnahme von trophischen Zytokinen (44-46). Weiterhin werden auch Konzentrationsänderungen von Hormon- oder Wachstumsfaktoren als Ursache diskutiert (47-49).

Trotz der drastischen Abnahme der Thymusfunktion und zusätzlich kontinuierlicher umweltbedingter Antigenstimulation bleibt die Gesamtgröße des peripheren T-Zell-pools im Laufe des Lebens relativ konstant (8) und die absolute Größe der naiven Th-Zellpopulation in der Peripherie nimmt nur auf ca. die Hälfte der ursprünglichen Anzahl ab (50, 51). Somit müssen zur Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools während des Alterns Regulationsmechanismen in der Peripherie existieren, die diese verminderte Thymusaktivität kompensieren. Erst dann wird ein angemessener Schutz gegen neue Fremdantigene gewährleistet. Die reduzierte Thymusaktivität könnte durch verlängerte Lebenszeiten von naiven Th-Zellen kompensiert werden (52-55). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die homöostatische Proliferation von naiven Th-Zellen einen starken Rückgang der naiven Th-Zellpopulation nach Thymusinvolution verhindert (54, 55) (Abb.3).

Die genauen Mechanismen der naiven Th-Zell-Homöostase im Menschen sind allerdings noch weitgehend ungeklärt. Aus zahlreichen Mausexperimenten kann gefolgert werden, dass MHCII-Moleküle, die endogene Selbstpeptide präsentieren eine wesentliche Rolle bei der Induktion der homöostatischen Proliferation von naiven Th-Zellen spielen (56-62). Es existieren vermehrt Hinweise, dass die homöostatische Expansion durch eine schwache Interaktion mit den gleichen Peptid-MHC-Komplexen induziert wird, welche auch für die positive Selektion im Thymus verantwortlich sind (56, 57). Im Gegensatz hierzu weisen Bender et al. darauf hin, dass andere Peptide, die nicht an der positiven Selektion im Thymus beteiligt sind, die homöostatische Expansion der naiven Th-Zellen auslösen (63). Zusätzlich sind Signale durch Zytokine wie z.B. IL-7 und IL-15 an Überleben und Expansion der

Zellen sowie an der Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools beteiligt (64-67). Veröffentlichungen neueren Datums zeigen auch, dass die homöostatische Proliferation von naiven Th-Zellen autolog reguliert wird und nur in den sekundären Lymphorganen stattfindet (68, 69).

Nach Initiierung des homöostatischen Proliferationsprozesses existieren dann wiederum Faktoren, die diesen Vorgang beenden bzw. regulieren um eine unkontrollierte Expansion der Zellen zu verhindern. Viele Veröffentlichungen berichten, dass der Zustand ruhender T-Zellen, genauso wie deren Aktivierung, ein aktiv regulierter Prozess ist. Zum Beispiel ist die Expression des Transkriptionsfaktors lung Kruppel-like factor (LKLF) essentiell für das Überleben von ruhenden, naiven T-Zellen (70).

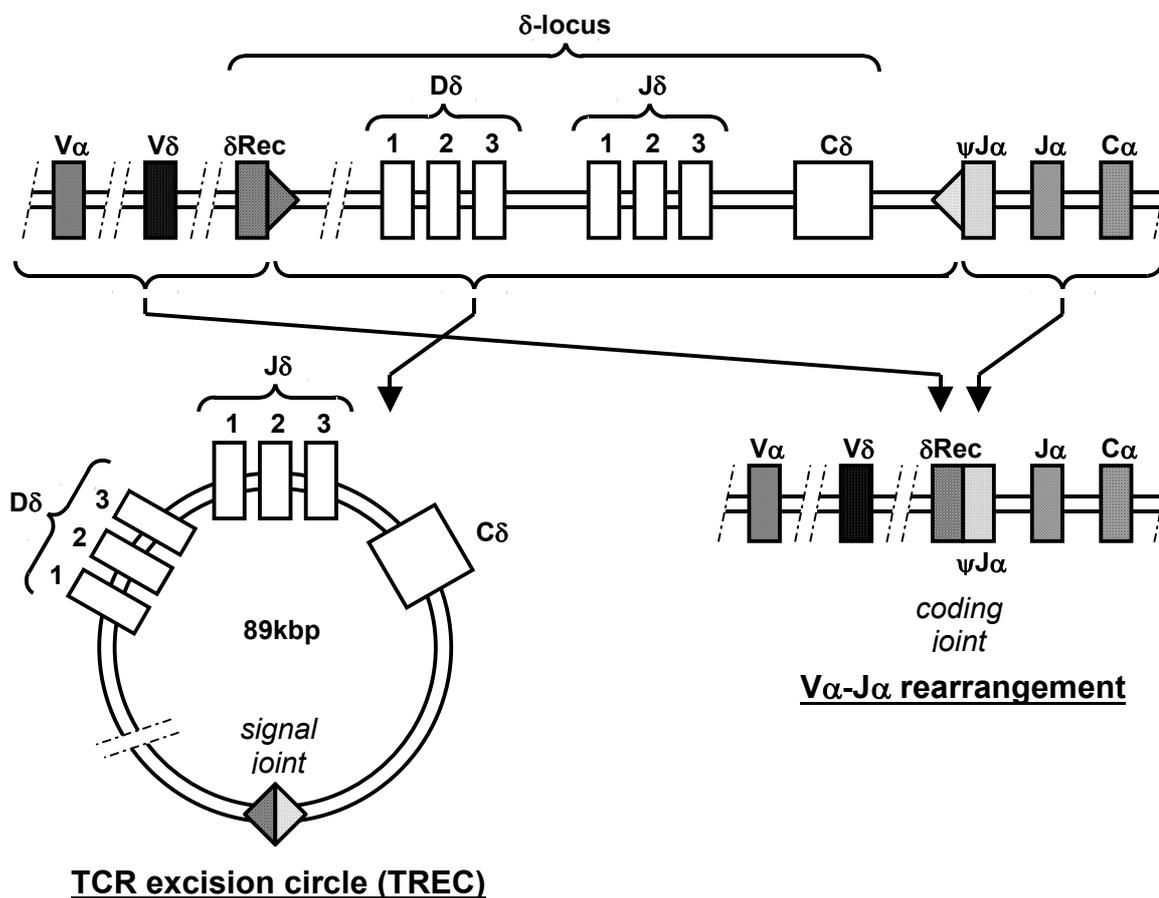


**Abbildung 3: Naive Th-Zell-Homöostase in jungen Individuen und während des Alterns.**

(A) In jungen Individuen führt eine hohe Thymusaktivität zu hohen Frequenzen von naiven Th-Zellen in der Peripherie. (B) Aufgrund der Thymusinvolutions nimmt die Produktion von neuen T-Zellen im Laufe des Lebens ab. Zur Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools proliferieren naive Th-Zellen in der Peripherie.

### 1.7 Identifizierung von Thymusemigranten durch T cell receptor excision circles (TRECs)

Im Unterschied zu Tiermodellen existiert bis jetzt im Menschen kein brauchbarer spezifischer phänotypischer Marker, der sich zur Identifikation von RTEs (recent thymic emigrants = kürzlich aus dem Thymus emigrierte T-Zellen) eignet. Aus diesem Grunde war es bis vor wenigen Jahren kaum möglich die Thymusaktivität und -funktion im Menschen *in vivo* zu untersuchen. Durch eine 1998 von Kong et al. und Douek et al. veröffentlichte neue Technik ist es nun möglich humane Thymusemigranten aufgrund eines molekularen Markers zu identifizieren (71, 72).



**Abbildung 4: Entstehung eines signal joint TREC während der TCR $\alpha$ -Gen-Umlagerung im Thymus.**

Die Figur zeigt eine vereinfachte Darstellung des TCR $\delta$  locus und den seitlich angrenzenden Teilen des TCR $\alpha$  locus einer Vorläufer-T-Zelle. Während der TCR $\alpha$ -Gen-Umlagerung entstehen zwei zirkuläre TCR $\delta$ -DNA-Fragmente durch die Deletion bestimmter  $\delta$ -Sequenzen. Bei der ersten der beiden TCR $\delta$ -Ketten-Deletionen werden die zwei deletierenden Elemente des  $\alpha$ -locus,  $\delta Rec$  und  $\psi J\alpha$ , umgelagert und es entsteht ein extrachromosomaler sog. signal joint TREC von 89kbp.

Während der Umlagerung von T-Zellrezeptor- Gensegmenten im Thymus entstehen extrachromosomale zirkuläre DNA-Fragmente. Im Laufe der späteren TCR $\alpha$ -Gen-Umlagerung werden in ca. 70 % der neuen  $\alpha\beta$ T-Zellen zwei zirkuläre TCR $\delta$ -DNA-Fragmente generiert (71, 73-75). Diese episomalen Fragmente werden T cell receptor excision circles (TRECs) genannt. Die Entstehung eines signal-joint TREC ist in Abb.4 schematisch dargestellt. Die TRECs sind stabil und werden durch Zellteilung verdünnt, da sie bei der Mitose nicht repliziert werden (73, 76). Die Detektion der TRECs mittels quantitativer PCR-Analyse ermöglicht somit die Unterscheidung zwischen naiven Th-Zellen, die erst kürzlich aus dem Thymus emigriert sind und naiven Th-Zellen, die in der Peripherie proliferiert sind. Folglich eignet sich diese Methode zur Messung der Thymusaktivität. Neben der Thymusaktivität beeinflussen auch Proliferation durch homöostatische Stimuli oder Antigenstimuli, Apoptose, sowie Degradation den TREC-Gehalt von Th-Zellen in der Peripherie (77, 78). Diese zusätzlichen Faktoren können jedoch im gesunden Menschen vernachlässigt werden (77).

Durch Bestimmung des TREC-Gehalts in peripheren CD4<sup>+</sup> Th-Zellen konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der TRECs innerhalb der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im Laufe des Lebens von der Geburt bis zum Alter von 80 Jahren um ca. das 50 bis 100-fache abnimmt. (72). Mittlerweile dient die Bestimmung des TREC-Gehalts in vielen klinischen Studien der Untersuchung der Thymusfunktion bei der Entstehung und im Verlauf von verschiedenen Erkrankungen (Autoimmunerkrankungen, HIV-Infektionen, Transplantationen).

## 1.8 PECAM-1 (CD31)

Da in der vorliegenden Arbeit viele Expressionsanalysen des CD31-Moleküls durchgeführt wurden, folgt eine ausführliche Beschreibung bezüglich Vorkommen, Struktur, Liganden und Funktionen des CD31-Moleküls.

**Vorkommen:** CD31 findet sich konzentriert auf Endothelzellen, aber auch auf zirkulierenden Blutplättchen (Thrombozyten), Monozyten, Neutrophilen, naiven B-Zellen und T-Zellsubpopulationen (79, 80). Auf Th-Zellen wird CD31 präferentiell von einer Subpopulation der CD45RA<sup>+</sup> Zellen exprimiert (81).

**Struktur:** Das humane CD31-Molekül ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 130 kDa und gehört zur C2-Immunglobulinsuperfamilie der Zelladhäsionsmoleküle. Das Gesamtmolekül (711 AS) besteht aus einer 574 AS-langen, in sechs C2-Typ Immunglobulindomänen unterteilten extrazellulären Region, einem kurzen 19 AS-langen transmembranen Teil und einer zytoplasmatischen Domäne von 118 AS (82, 83).

**Liganden:** Die Bindungen des CD31-Moleküls sind sowohl homophiler (CD31-CD31) als auch heterophiler Art (CD31-X). Homophile Interaktionen werden hauptsächlich durch die aminoterminalen Domänen 1 und 2 vermittelt (84, 85). Mehrere *in vitro*-Studien schlagen folgende heterophile Liganden vor: Glukosaminoglukanseitenketten (85), Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (86, 87), TCD31L (T-Zell-CD31-Ligand) (88) und das CD38-Molekül (ADP-Ribosylzyklase) (89).

**Funktionen:** In vielen Untersuchungen konnte eine zentrale Rolle des CD31-Moleküls in endothelialer Zell-Zell-Adhäsion (90), Leukozyten-Endothel-Adhäsion (91) und Transmigration (92, 93) gezeigt werden. Weiterhin werden auch Signaltransduktionsaufgaben und die Modulation von Zellaktivierungsprozessen zu den Funktionen des PECAM-1 gezählt (94-96).

Die zytoplasmatische Region des CD31-Moleküls enthält ein funktionelles Immunrezeptor-Tyrosin-basierendes-Inhibierungsmotiv (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif = ITIM) (97, 98). Dieses Motiv kann durch die Tyrosin-Kinasen Src oder Csk phosphoryliert werden und kreiert dadurch eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne (Src-Homologie 2) der Tyrosinphosphatasen SHP-2 und SHP-1 (94, 99, 100). Infolge einer TCR-vermittelten Aktivierung wird eine leichte Tyrosinphosphorylierung bewirkt (100), bei einer Vernetzung von Antikörpern gegen CD31 alleine oder im Zusammenspiel mit einer TCR-Ligation wird eine stärkere Tyrosinphosphorylierung des ITIM induziert (96, 98). Die anschließende Protein-Tyrosin-Kinase-vermittelte Transduktionskaskade wirkt der TCR-Aktivierung entgegen und resultiert in einer Inhibierung der T-Zell-Aktivierung.

## 1.9 Ziele dieser Arbeit

Die große Vielfalt des TCR-Repertoires der peripheren naiven T-Zellen gewährleistet eine angemessene Immunantwort gegenüber unbekanntem, neuen Pathogenen. Postnatale Thymopoese und Thymus-unabhängige periphere Mechanismen regulieren die naive Th-Zell-Homöostase. Die genauen Mechanismen im Laufe des Altern sind jedoch weitgehend unbekannt.

Mit zunehmendem Alter nimmt die Produktion von naiven  $\alpha\beta$  T-Zellen durch den Thymus drastisch um das 50 bis 100-fache ab. Erstaunlicherweise vermindert sich die absolute Größe der naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellpopulation in der Peripherie im gleichen Zeitraum nur um das 2 bis 3-fache. Somit muss die Aufrechterhaltung der naiven Th-Zellpopulation teilweise in der Peripherie durch die Proliferation von naiven Th-Zellen reguliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten erstmals naive Th-Zellen, die erst kürzlich aus dem Thymus emigriert sind und peripher expandierte naive Th-Zellen innerhalb der CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellpopulation charakterisiert werden. Desweiteren sollten phänotypische, funktionelle und molekulare Eigenschaften der unterscheidbaren naiven Th-Subpopulationen analysiert werden.