

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals naive Th-Zellen, die erst kürzlich aus dem Thymus emigriert sind und peripher expandierte naive Th-Zellen innerhalb der CD45RA⁺ Th-Zellpopulation im Menschen zu charakterisieren. Desweiteren sollten phänotypische, funktionelle und molekulare Eigenschaften der unterscheidbaren naiven Th-Subpopulationen analysiert werden.

4.1 Expression von CD31 auf T-Zellen

Humane CD4⁺ Th-Zellen können anhand der Expression von Isoformen des CD45-Antigens (CD45RA/CD45RO) in Subpopulationen unterteilt werden. Während Antigen-erfahrene Th-Zellen durch die CD45RO-Isoform charakterisiert sind, exprimieren naive, Antigen-unerfahrene Th-Zellen die CD45RA-Isoform (27). Es konnte gezeigt werden, dass CD45RA⁺CD45RO⁻ Th-Zellen nach antigener oder mitogener Stimulation die Expression der CD45RA-Isoform verlieren und gleichzeitig die CD45RO-Isoform ausprägen (28, 29).

Aufgrund folgender in der Literatur beschriebenen Charakteristika wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit der Fokus auf Expressionsanalysen des PECAM-1-Moleküls gerichtet:

1. CD31 wird präferentiell von einer Subpopulation der CD45RA⁺ Th Zellen exprimiert und häufig als Marker für naive Zellen innerhalb der CD45RA⁺ Th-Zellpopulation benutzt (36, 37, 81, 90).
2. Die Expression des CD31-Moleküls geht *in vitro* nach TCR-Aktivierung verloren (102). Da viele Arbeitsgruppen in Mausexperimenten zeigen konnten, dass die homöostatische Proliferation von naiven Th-Zellen u.a. durch eine schwache Interaktion des TCR mit Selbstpeptid-MHCII-Komplexen induziert wird (57-62), sollte ein potentielles Molekül nach TCR-Aktivierung auf Th-Zellen unterschiedlich exprimiert sein.

Im Gegensatz hierzu zeigen andere Moleküle, wie z.B. CD62L oder CD27, die häufig zur Charakterisierung von humanen, naiven Th-Zellen herangezogen werden, keine veränderte Expression nach einmaliger TCR-Aktivierung (CD27) und/oder werden

von der Mehrheit der CD45RA⁺ Th-Zellen exprimiert (CD62L und CD27). Diese Moleküle eigneten sich somit nicht zur weiteren Überprüfung als potentielle Marker, die RTEs und peripher expandierte naive Th-Zellen unterscheiden könnten.

Die durchflusszytometrische Analyse von peripheren CD4⁺ Th-Lymphozyten zeigte, dass sowohl innerhalb der CD45RA⁺ Th-Zellen als auch innerhalb der CD45RO⁺ Th-Zellen hinsichtlich der Expression von CD31 charakteristische und deutlich voneinander unterscheidbare Subpopulationen identifiziert werden können. Bezüglich der Frequenz der CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen im adulten peripheren Blut war eine starke Varianz zwischen den einzelnen Spendern (30-70%) auffällig. Dagegen prägen die CD45RO⁺ CD4⁺ Gedächtniszellen gesunder Spender in der Regel nur zu geringen Prozentanteilen (ca.1-5%) das CD31-Molekül aus (Abb.11 B+C). Dies bestätigt Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen und ist ein Hinweis dafür, dass die Mehrheit der CD4⁺ Th-Zellen die Expression des CD31-Moleküls während dem Übergang von naiven Lymphozyten zu Gedächtnis-Lymphozyten verliert (36, 81, 106, 108). Vereinzelt sind bei Spendern ab ca. 60 Jahren auch etwas höhere Frequenzen (ca. 5-15%) der CD31-koexprimierenden CD45RO⁺ Th-Zellen feststellbar (Abb.17D).

Die in Kapitel 3.1.3.6 dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der Regulation des CD31-Moleküls nach *in vitro* Aktivierung von naiven CD45RA⁺ Th-Zellen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Torimoto et al. Der Verlust des CD31-Moleküls erfolgt erst nach der Konversion vom naiven CD45RA-Phänotyp zum Antigen-erfahrenen CD45RO-Phänotyp (36). Innerhalb des hier untersuchten Zeitraums von neun Tagen exprimierten alle Zellen das CD45RO-Molekül, wohingegen die Expression von CD31 im gleichen Zeitraum nur sehr langsam von 83 auf 58% abgenommen hatte (Abb.16).

Zur Analyse und Charakterisierung von humanen naiven Th-Zellen werden häufig Nabelschnurblut-Zellen verwendet. Die phänotypische Analyse von humanen neonatalen CD4⁺ Th-Zellen bestätigte die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass 85-95% dieser Zellen durch eine starke Expression des CD45RA-Moleküls charakterisiert sind (103, 104) (Abb.12A). Die vorkommende Minderheit von CD45RA⁻ und CD45RA^{low} Th-Zellen wird widersprüchlich diskutiert. Einerseits werden diese Zellen als pränatal aktivierte Zellen angesehen. Andererseits

konnten Bofill et al. auch zeigen, dass $CD45RA^{low}/CD45RO^{low}$ Th-Zellen im Nabelschnurblut noch keine funktionelle Reife aufweisen und deshalb wahrscheinlich eher den RTEs zuzuordnen sind (109). Weiterhin konnte die hier durchgeführte durchflusszytometrische Analyse auch Ergebnisse von Delespesse reproduzieren. Ungefähr 90% der $CD45RA^{+}$ Nabelschnurblut-Th-Zellen sind durch die Koexpression des CD31-Moleküls gekennzeichnet (104) (Abb.12A+B).

Somit sind sowohl die prozentualen Anteile von $CD45RA^{+}$ Zellen innerhalb der $CD4^{+}$ T-Zellpopulation (25-50%), als auch die Frequenzen der CD31-koexprimierenden Zellen innerhalb der $CD45RA^{+}$ Th-Zellen (20-75%) im adulten peripheren Blut (Abb.11A+C) im Vergleich zu den entsprechenden hohen Frequenzen im Nabelschnurblut (Abb.12A+B) deutlich reduziert. Diese Reduktion ist trotz großer Varianz zwischen den erwachsenen Spendern offensichtlich. Gleichzeitig steigt dementsprechend der Anteil der Antigen-erfahrenen $CD45RO^{+}$ Th-Zellen und der Anteil der CD31-negativen Zellen innerhalb der $CD45RA^{+}$ Th-Zellen.

Verschiedene u.a. auch in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studien zur Immunrestitution bei Patienten nach autologer Stammzelltransplantation konnten zeigen, dass erst 6-12 Monate nach erfolgter Transplantation eine ansteigende Anzahl von peripheren naiven $CD45RA^{+}$ Th-Zellen zu beobachten ist (110). Die Expressionsanalyse des CD31-Moleküls auf $CD45RA^{+}$ Th-Zellen im peripherem Blut von Patienten nach autologer Stammzelltransplantation demonstrierte, dass eine sehr hohe Frequenz (ca. 92%) dieser vermutlich „neuen“ $CD45RA^{+}$ Th-Zellen durch eine gleichzeitige Expression des CD31-Moleküls charakterisiert ist (Abb.13). Interessanterweise sind somit die ermittelten Frequenzen von $CD31^{+}$ und $CD31^{-}$ $CD45RA^{+}$ Th-Zellen im Blut der Patienten nach Therapie analog zu den Frequenzen der entsprechenden Populationen im Nabelschnurblut (Abb.12B+13B). Folglich sind dann auch die prozentualen Anteile von $CD31^{+}$ $CD45RA^{+}$ $CD4^{+}$ T-Zellen im Blut der Patienten nach Transplantation eindeutig höher im Vergleich zu den Frequenzen im peripheren Blut gesunder Erwachsener (Abb.11C).

Zusammenfassend ließ sich in Bezug auf $CD4^{+}$ Th-Zellen feststellen, dass höhere Frequenzen von $CD31^{-}$ $CD45RA^{+}$ Th-Zellen ausschließlich im adulten peripheren Blut detektierbar sind. Im Nabelschnurblut und im peripheren Blut von Patienten nach Stammzelltransplantation gibt es nur einen geringen Anteil (<15%) von $CD45RA^{+}$ Th-Zellen, welche gleichzeitig CD31-negativ sind.

Auch für CD8⁺ T-Zellen wurde früher angenommen, dass naive T-Zellen durch die Expression von CD45RA und Gedächtnis/Effektorzellen durch die Expression von CD45RO charakterisiert sind (111). Dieses Konzept wurde mittlerweile jedoch widerlegt. Durch phänotypische und funktionelle Analysen konnten CD27-Effektorzellen innerhalb des CD45RA⁺CD8⁺ Zellkompartments detektiert werden, die nach Aktivierung TNF- α und IFN- γ produzieren (105). Deshalb wird zur Unterscheidung und Analyse von naiven und Antigen-erfahrenen CD8⁺ T-Zellen das CD45RA-Molekül in Kombination mit dem CD27-Molekül herangezogen. Ähnlich wie bei CD4⁺ Th-Zellen variiert auch innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation der Anteil an naiven und Antigen-erfahrenen Gedächtnis- und Effektorzellen sehr stark zwischen den einzelnen Spendern (Abb.15).

Die Frequenzen der CD31-positiven und -negativen Subpopulationen in naiven und Antigen-erfahrenen zytotoxischen T-Zellen sind sehr unterschiedlich im Vergleich zum CD31-Expressionsmuster in naiven und Antigen-erfahrenen Th-Zellen. Die Mehrheit der naiven CD45RA⁺ CD27⁺ CD8⁺ T-Zellen (>80%) koexprimiert das CD31-Molekül. Antigen-erfahrene Gedächtnis- und Effektorzellen (CD45RA⁻CD27⁺ T-Zellen und CD45RA⁺CD27⁻ T-Zellen) weisen eine große Varianz bezüglich der CD31-Expression auf. Die analysierten CD31-Expressionsmuster stehen im Einklang mit Publikationen, die berichten, dass im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen nur ungefähr die Hälfte der CD8⁺ T-Zellen die Expression des CD31-Moleküls während dem Übergang von naiven zu Gedächtnis-Lymphozyten verliert (81, 106).

Da es sich nicht vermeiden lässt, dass die CD4⁺ Th-Zellpopulation, sowohl bei Analysen als auch bei Isolierungen, geringe Frequenzen (<1%) von „doppelt positiven“ CD4⁺CD8⁺ T-Zellen beinhaltet, wurden auch diese Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Nur bis zu 20% der CD4⁺CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender exprimieren die CD45RA-Isoform, der Anteil der CD45RA⁺ Th-Zellen, die zusätzlich CD31 exprimieren variiert zwischen den einzelnen Spendern (Abb.14). Hieraus ist ersichtlich, dass maximal 1% der CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen CD4⁺CD8⁺ T-Zellen darstellen können. Eine Kontamination der naiven CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen mit CD45RA⁺CD4⁺CD8⁺T-Zellen ist somit minimal und kann vernachlässigt werden.

4.2 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zell-Subpopulationen

Die Isolation von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺CD4⁺ Th-Zell-Subpopulationen mittels der magnetische Mehrparameter Zellsortierung und/oder mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung ermöglichte die Induktion und Analyse der Zytokinproduktion dieser Subpopulationen nach direkter polyklonaler Stimulation und nach α CD3/ α CD28-Stimulation und folgender polyklonaler Restimulation. Ohne Separation der CD45RA⁺ Th-Zellen von den Antigen-erfahrenen CD45RO⁺ Th-Zellen bzw. der CD31⁺ von den CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen wäre eine Unterscheidung von expandierten, differenzierten naiven Th-Zellen nach Primärstimulation und schon zuvor Antigen-erfahrenen Th-Zellen nicht mehr möglich. Zusätzlich ist die Trennung notwendig, um den potentiellen Einfluss von Antigen-erfahrenen Effektor- und Gedächtniszellen, die bereits auf ein bestimmtes Zytokinexpressionsmuster geprägt worden sind und der von ihnen exprimierten Zytokinen in solchen Kulturen auszuschließen. Weiterhin war die Isolation der Populationen Voraussetzung für die Durchführung der TREC-Analysen und Genexpressionsanalysen.

Sowohl die magnetische Mehrparameter-Zellsortierung, als auch die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung sind gut etablierte Methoden, die auch von anderen Arbeitsgruppen zur Isolierung von naiven und Antigen-erfahrenen CD4⁺ Th-Zellen genutzt werden. Die hier etablierte magnetische Isolierung von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen gewährleistet durch einen zusätzlich dritten Separationsschritt einen hohen Reinheitsgrad der separierten Th-Zellen (CD4⁺ Th-Zellen >99%, CD45RA⁺ Th-Zellen >98%, CD45RO⁺ Th-Zellen >95%, CD31⁺ Th-Zellen >97%, CD31⁻ Th-Zellen >95%) (Abb.20). Die durch eine Kombination von magnetischer und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung erzielten Reinheiten der CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen sind etwas höher als die erzielten Reinheiten der magnetischen Mehrparameter-Zellsortierung (Abb.25).

Prinzipiell sind somit beide Sortierungsmethoden geeignet um CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen aus dem peripheren adulten Blut zu isolieren. Der wesentliche Vorteil der Zelltrennung mittels FACS ist im Vergleich zur Verwendung der MACS-MultiSort-Technik ein geringerer Zeitaufwand. Allerdings sind die Zellen während des Sortierungsvorganges relativ hohen Drücken und Beschleunigungen ausgesetzt. Da dies die Vitalität der Zellen negativ beeinflussen kann, wurden die

Th-Zellpopulationen, die für weitere Untersuchungen, wie Zytokinproduktions-Analysen und Differenzierungs-Analysen, in Kultur genommen wurden, mittels der MACS-MultiSort-Technik isoliert.

4.3 Frequenzen von CD31⁺ Th-Zellen innerhalb der CD45RA⁺ Th-Zellen nehmen mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab

Die Gesamtgröße des peripheren T-Zellpools bleibt im Laufe des Lebens relativ konstant (8). Sowohl in CD4⁺ als auch in CD8⁺-T-Zellpopulationen steigt mit zunehmendem Alter der Anteil der Effektor- und Gedächtnis-Zellen und gleichzeitig nimmt der Anteil der naiven Zellen ab (50). Von über 90% im Nabelschnurblut sinkt der Anteil der CD45RA⁺ Th-Zellen auf ca. 30-45% im peripheren adulten Blut ab (103, 104). Somit verringert sich die Gesamtgröße der peripheren naiven Th-Zellpopulation im Laufe des Alterns um das zwei- bis dreifache.

Die hier durchgeführte Bestimmung der Frequenzen von naiven CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Subpopulationen in Abhängigkeit vom Alter der Spender zeigte eindeutig, dass eine starke negative Korrelation zwischen der Frequenz der CD31⁺ Zellen innerhalb der CD45RA⁺ Th-Zellen und dem Alter der Spender besteht (Korrelationskoeffizient $r=-0,875$). Der CD31⁺ Zellanteil innerhalb der CD45RA⁺ Th-Zellen nahm kontinuierlich und konstant von 90% im Nabelschnurblut auf ca. 50% im peripheren Blut von über 60-Jährigen ab (Abb.18). Dementsprechend nahm gleichzeitig die Frequenz der CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen mit zunehmendem Alter zu.

In den letzten Jahren konnten einige Arbeitsgruppen Hinweise finden, dass auch bei gesunden Spendern Antigen-erfahrene Th-Zellen existieren, die den CD45RA-Rezeptor reexprimieren (31, 112, 113) (siehe auch Einleitung Kap.1.5). Diese Veröffentlichungen stellen somit das früher gültige Konzept, nachdem CD45RA ein Marker für Antigen-unerfahrene Th-Zellen ist, der nach Aktivierung irreversibel verloren geht, in Frage. Ebenfalls diskutiert wurde dies von Hamann et al.: Die Konversion der CD45RA⁺ CD45RO⁻ Th-Zellen nach *in vitro* Aktivierung zu CD45RA⁻ CD45RO⁺ Th-Zellen geschieht *in vivo* vermutlich über ein CD45RA^{bright}/CD45RO^{bright} - Stadium. Neben dieser kleinen CD45RA^{bright}/CD45RO^{bright} -Subpopulation existiert eine weitere größere CD4⁺ Th-Zell-Subpopulation, die gleichzeitig die CD45RA- und CD45RO-Isoform exprimiert, jedoch durch eine schwache Expression der beiden Marker gekennzeichnet ist. Nach Sortierung und Kultivierung dieser

CD45RA^{low}/CD45RO^{low}-Subpopulation behält ca. die Hälfte dieser Zellen den CD45RA^{low}/CD45RO^{low}-Phänotyp bei, ein Teil der Zellen wechselt zum CD45RA⁺ CD45RO⁻ -Phänotyp und eine Minderheit wechselt zum CD45RO⁺ CD45RA⁻ -Phänotyp. Vermutlich beinhaltet die CD45RA^{low}/CD45RA^{low} Th-Subpopulation Antigen-erfahrene Zellen, die in Abwesenheit einer Antigen-Stimulation zum naiven CD45RA⁺-Phänotyp konvertieren können (34). Desweiteren wurde von Torimoto et al. die Vermutung aufgestellt, dass CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen eine spezielle Subpopulation Antigen-erfahrener Th-Zellen darstellen, da die Expression von CD31 auf CD45RA⁺ Th-Zellen nach deren Aktivierung zunächst erhalten bleibt und erst nach der Konversion dieser Zellen zu CD45RO⁺ Th-Zellen abnimmt (36).

Aufgrund der altersabhängigen Frequenzänderungen der beiden CD45RA-Th-Subpopulationen und dieser in der Literatur beschriebenen Beobachtungen war vorstellbar, dass die Expansion der peripheren CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen mit zunehmendem Alter eine Zunahme von Antigen-erfahrenen Gedächtnis- und Effektor-Th-Zellen widerspiegelt, welche zum naiven CD45RA-Phänotyp rekonvertiert sind. Durch mehrere phänotypische und funktionelle Untersuchungen von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ CD4⁺ Th-Zellen konnte diese Hypothese jedoch ausgeschlossen werden, da nur sehr geringe Frequenzen von peripheren CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen existieren (<1%), die revertierte Gedächtnis- und Effektor-Th-Zellen repräsentieren könnten:

4.4 Phänotypische und funktionelle Untersuchungen der CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen

4.4.1 CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen sind phänotypisch naive Th-Zellen

Naive und Antigen-erfahrene Th-Zellen lassen sich u.a. durch die charakteristische Expression von Oberflächenmolekülen unterscheiden. Die bei gesunden Spendern durchgeführte phänotypische Charakterisierung anhand von gebräuchlichen Oberflächenmarkern zeigte, dass CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen genauso wie CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen einen „naiven“ Differenzierungs- und Aktivierungszustand aufweisen (Abb.19). Beide Populationen zeigten keine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD44 und CD11a, die typischerweise von Antigen-erfahrenen Th-Zellen verstärkt exprimiert werden. Weiterhin waren auch keine Zellen innerhalb der CD31⁻ Th-Zellen detektierbar, die Aktivierungsmarker (HLA-DR) oder

Gedächtnis/Effektor-Th-Zellmarker (CD95, CD26) exprimierten. Beide Populationen waren durch die Expression der CD45RB-Isoform und des CD7-Moleküls charakterisiert. Diese Marker werden präferentiell auf naiven Th-Zellen exprimiert, infolge einer Aktivierung verliert ein Teil der Antigen-erfahrenen Th-Zellen die Expression dieser Moleküle. Besonders die Oberflächenmoleküle CD27 und CD62L werden häufig zusätzlich zu den CD45-Isoformen zur Unterscheidung von naiven und Antigen-erfahrenen Th-Zellen herangezogen und auch zur Detektion von Antigen-erfahrenen Th-Zellen, die zur naiven CD45RA-Isoform rekonvertiert sind, benutzt (35). Ruhende, naive Th-Zellen exprimieren CD62L, durch das sie in die Lymphknoten gelangen. Ungefähr die Hälfte der Antigen-erfahrenen T-Zellen verliert die L-Selektin an ihrer Zelloberfläche. Desweiteren sind alle naiven Th-Zellen im peripheren Blut durch die Expression des CD27-Moleküls charakterisiert. CD27⁻ Th-Zellen repräsentieren eine kleine Subpopulation der Antigen-erfahrenen CD45RO⁺ Zellen (114) und entstehen im Verlaufe chronischer Antigen-Stimulation *in vivo* (115). Aller Wahrscheinlichkeit nach sind die Moleküle CD27 und CD62L auf zum naiven Phänotyp rekonvertierten Gedächtnis- und Effektor-Th-Zellen nicht exprimiert und somit von den „wirklich naiven“ CD27⁺CD62L⁺CD45RA⁺ Th-Zellen durch einen CD27⁻CD62L⁻CD45RA⁺- Phänotyp unterscheidbar. Da nur weniger als <1% der CD31⁻CD45RA⁺ Th-Zellen durch einen „Antigen-erfahrenen“ CD27⁻CD62L⁻-Phänotyp gekennzeichnet waren, kann man davon ausgehen, dass in der Peripherie gesunder Personen nur eine sehr minimale Zellfraktion innerhalb der CD31⁻CD45RA⁺ Th-Zellen von potentiell rekonvertierten Gedächtnis- und Effektorzellen existiert.

4.4.2 Zytokinpotential von CD31⁺ und CD31⁻CD45RA⁺ Th-Zellen

Weiterhin wurde untersucht, ob ähnlich wie für CD8⁺ T-Zellen beschrieben, ein Kompartiment von CD4⁺ Th-Zellen existiert, in dem sich Zellen detektieren lassen, die die CD45RA-Isoform exprimieren und für die trotzdem Effektorfunktionen nachgewiesen werden können, wie z. B. Effektorzytokinproduktion nach kurzzeitiger polyklonaler *in vitro*-Stimulation. Es war denkbar, dass sich CD31⁻CD45RA⁺ Th-Zellen, die unter Umständen Antigen-erfahrene Zellen enthalten, hinsichtlich der Zytokinproduktion von den CD31⁺CD45RA⁺ Th-Zellen unterscheiden.

Die Untersuchungen des Zytokinpotentials der CD31⁺ und CD31⁻CD45RA⁺ Th-Zellpopulationen nach direkter polyklonaler Stimulation zeigten, dass beide

Populationen eine für naive Th-Zellen charakteristische Zytokinexpression aufweisen. Sowohl CD31⁺ als auch CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen produzierten nach polyklonaler Kurzzeitstimulation nur IL-2 und keine Effektorzytokine (IL-13) bzw. nur sehr geringe Frequenzen von Effektorzytokinen (IFN- γ < 1%, IL-4 < 0,4%) (Abb.21+ Tab.6). Obwohl die isolierten Zellpopulationen eine sehr hohe Reinheit aufwiesen, kann hierbei trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass auch sehr geringe Frequenzen (<1%) von Antigen-erfahrenen Th-Zellen innerhalb der CD45RA⁺ Th-Subpopulationen für die detektierte geringe Effektorzytokin-Produktion verantwortlich waren.

Bezüglich der IL-2-Produktion war die Tatsache interessant, dass die CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen von sechs der acht untersuchten Spender im Vergleich zu den CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen auf die gleichen Stimulationssignale mit höherer IL-2-Produktion reagierten (durchschnittlich um 11%, Varianz 2%-16%). Dies könnte ein Hinweis sein, dass CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen nach Aktivierung zwar grundsätzlich ein charakteristisches Zytokinprofil naiver Th-Zellen aufweisen, im Vergleich zu den CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen lassen sie sich jedoch leichter zur IL-2 Produktion aktivieren.

4.4.3 Th1-Polarisierungs-Kulturen von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen

Antigen-erfahrene Th-Zellen unterscheiden sich von den naiven Th-Zellen u.a. durch unterschiedliche Aktivierungs- und Differenzierungsvorraussetzungen. Um naive Th-Zellen zu Proliferation, klonaler Expansion und Zytokinproduktion zu veranlassen, ist eine Primärstimulation der naiven Zellen durch zwei zellvermittelte Signale erforderlich. In Abhängigkeit von zusätzlich einwirkenden Signalen differenzieren die stimulierten Th-Zellen zu verschiedenen Effektorzellen. In den in der Literatur beschriebenen Kultursystemen konnte gezeigt werden, dass IL-12 das Schlüsselzytokin für die Differenzierung von aus Nabelschnurblut isolierten naiven Th-Zellen zu proinflammatorischen Th-Zellen ist (116). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Polarisierung von isolierten CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen ein *in vitro* Stimulationssystem adaptiert, welches zur Polarisierung naiver CD45RA⁺ Th-Zellen in vorrausgegangen Experimenten etabliert wurde (Diplomarbeit von S. Kimmig und der Doktorarbeit von A. Hering).

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass sich beide CD45RA⁺ Th-Zellpopulationen sehr gut *in vitro* zu proinflammatorischen Th-Zellen polarisieren lassen. Eine Zunahme der IL-12-Konzentration führte in der Regel zu einer zunehmenden Differenzierung der CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen, einzelne Ausnahmen gab es nur in CD31⁻ Th-Zellen. Desweiteren existierten unter den CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen keine voraktivierten Zellen, die nach Zugabe von geringen IL-12-Konzentrationen im Vergleich zu naiven CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen höhere Frequenzen von IFN- γ -Produzenten aufweisen. Im Allgemeinen waren die Frequenzen der IFN- γ -Produzenten in den mit CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen initiierten Kulturen sogar geringer als die Frequenzen der IFN- γ -Produzenten in den mit CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen initiierten Kulturen des gleichen Spenders (Abb.23).

Interessanterweise zeigten die CD31⁻ Th-Zellen eine ausgeprägte interindividuelle Heterogenität in Bezug auf die Frequenz der IFN- γ -Produzenten, die Variabilität zwischen den Spendern in den Kulturen der CD31⁺ Th-Zellen war sehr viel geringer (Abb.23). Auch die intraindividuellen Unterschiede von CD31⁺ und CD31⁻ Th-Zellen waren erstaunlich groß (Abb.23+24).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die CD45RA⁺ Th-Zellen keine homogene Population naiver Th-Zellen darstellen. Nur die CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen verschiedener Spender weisen unter den gleichen Stimulations- und Kulturbedingungen ein einheitliches oder zumindest sehr ähnliches Zytokin-expressionsmuster auf. Im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass ca. 95% der CD45RA⁺ Th-Zellen aus humanem Nabelschnurblut phänotypisch durch die Expression des CD31-Moleküls charakterisiert sind, lässt sich vermuten, dass die CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen im peripheren adulten Blut naive Th-Zellen repräsentieren, die erst kürzlich aus dem Thymus emigriert sind.

Trotz der Hinweise, dass es sich bei CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen möglicherweise um spezielle Th-Zellen handelt, konnten keine bzw. nur sehr geringe Frequenzen (<1%) von CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen mit Effektorfunktionen detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen auch mit Veröffentlichungen überein, die zeigen konnten, dass CD45RA⁺ Th-Zellen keine „Recall“-Antigen-spezifischen Zellen enthalten, wohingegen CD45RO⁺ Th-Zellen durch Stimulation mit „Recall“-Antigenen, wie z.B.

Tetanustoxin, zu maximaler Expansion und Zytokinproduktion angeregt werden (117, 118).

4.5 CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen repräsentieren proliferierte naive Th-Zellen

Als weitere Möglichkeit für den altersabhängigen Frequenzanstieg der peripheren CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen war vorstellbar, dass diese Zellen naive Th-Zellen repräsentieren, die in der Peripherie expandiert sind, um einer zu starken Abnahme des naiven Th-Zellpools nach Thymusinvolution entgegenzusteuern. Diese Hypothese wurde mittels der Quantifizierung von TRECs in isolierten Th-Zellpopulationen untersucht. Hierbei konnten zum ersten Mal peripher expandierte Th-Zellen innerhalb der naiven CD45RA⁺ Th-Zellpopulation identifiziert werden.

Der TREC-Gehalt von CD31⁺ Th-Zellen war im Vergleich zu CD31⁻ Th-Zellen durchschnittlich um das 9-fache höher, die Varianz zwischen den Spendern lag bei 2 bis 32-facher Erhöhung (Abb.26). Da die TRECs mit Teilung der Zellen nicht repliziert werden, lässt die deutliche Reduktion des TREC-Gehalts von CD31⁻ Th-Zellen im Vergleich zum hohen TREC-Gehalt der CD31⁺ Th-Zellen erkennen, dass die CD31⁺ Zellpopulation viele RTEs enthält und diese in der CD31⁻ Th-Zellfraktion durch Proliferation der Zellen dezimiert wurden. Da mit jeder Zellteilung der Gehalt an TRECs halbiert wird, reflektiert der reduzierte TREC-Gehalt in CD31⁻ Th-Zellen im Durchschnitt drei bis vier durchlaufene Zellteilungen. Somit exprimieren RTEs das CD31-Molekül, wohingegen peripher proliferierte naive Th-Zellen die Expression des Moleküls verloren haben.

Der TREC-Gehalt von Th-Zellen im Nabelschnurblut ist im Vergleich zu Thymozyten um ca. das 5-fache reduziert, der TREC-Gehalt von CD31⁺ Th-Zellen im peripheren Blut erwachsener Spender ist im Vergleich zu Thymozyten durchschnittlich um das 20-fache reduziert. Diese Werte stimmen mit denen von TREC-Analysen überein, die Sodora et al. in isolierten Affenthymozyten und peripheren Th-Zellen detektieren konnten (119). Diese Reduktion kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Proliferationsvorgänge zustande, die während der Thymozytenreifung nach der TCR- α -Gen-Umlagerung stattfinden. Außerdem konnte auch festgestellt werden, dass ein Teil der reifen Thymozyten vor dem Auswandern in die Peripherie expandiert (120).

Der TREC-Gehalt von Nabelschnurblut-Th-Zellen, die mit großer Mehrheit das CD45RA-Molekül und das CD31-Molekül koexprimieren war im Vergleich zu

peripheren CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen erwachsener Spender im Durchschnitt um das 3,3-fache erhöht. Mononukleäre Zellen im Nabelschnurblut (CBMC) weisen im Vergleich zu PBMC von Erwachsenen mehrere funktionelle Unterschiede auf, u.a. konnte eine verminderte Proliferation von Nabelschnurblut-T-Zellen nach Antigen-Stimulation beobachtet werden (121). Dies könnte ein Hinweis sein, dass auch die periphere Proliferation von naiven Th-Zellen im Nabelschnurblut im Vergleich zu naiven Th-Zellen im peripheren Blut erwachsener Spender eingeschränkter ist.

Die hier detektierten geringen TREC-Werte in Antigen-erfahrenen CD45RO⁺ Th-Zellen bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (72, 122). Jedoch wurden alle bisher in der Literatur beschriebenen TREC-Analysen von naiven Th-Zellen an der Gesamt-CD45RA⁺ Th-Zellpopulation im Vergleich zu CD45RO⁺ Th-Zellen durchgeführt. Einige der hier untersuchten Spender (Abb.26, Spender 1, 3 und 6) weisen einen sehr geringen TREC-Gehalt in naiven CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen auf, der nahezu den Werten der CD45RO⁺ Th-Zellen entspricht. Somit erreicht die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen dieser naiven Th-Zellen fast das Ausmaß einer Expansion von aktivierten und differenzierten Th-Zellen nach einer Immunantwort.

Die Ergebnisse der TREC-Analysen unterstützen nochmals die Widerlegung der ersten Hypothese: die altersabhängige Expansion der CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen reflektiert nicht die Zunahme von Antigen-erfahrenen Th-Zellen, die zum naiven CD45RA-Phänotyp rekonvertiert sind. Würden die CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen, Antigen-erfahrene Th-Zellen repräsentieren, die zum naiven CD45RA-Phänotyp rekonvertiert sind, sollten sich diese Zellen durch die zusätzliche Differenzierung von CD45RO⁺ Th-Zellen zu CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen durch einen reduzierten TREC-Gehalt im Vergleich zu den CD45RO⁺ Th-Zellen ausweisen. Der TREC-Gehalt der CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen war jedoch durchschnittlich 9-fach höher. Bei drei Spendern entsprach die TREC-Anzahl der naiven CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen fast der geringen Anzahl der TREC⁺ Gedächtnis- und Effektor-Th-Zellen, sie war jedoch nie geringer.

4.6 Vergleich der TCR-Repertoires von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen

Durch die Thymopoese entstehen naive T-Zellen, deren gesamtes Repertoire von Antigenrezeptoren eine sehr große polyklonale Vielfalt aufweisen. Man schätzt das gesamte Repertoire auf mindestens 10^8 Spezifitäten (123, 124). Im Gegensatz hierzu kann die periphere Expansion von existierenden naiven Th-Zellen, sowohl die homöostatische Proliferation als auch die Proliferation nach Antigenstimulation, zu oligoklonalen Expansionen dieser Zellen und somit zu einer reduzierten TCR-Diversität führen. Da die RTEs in der CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellpopulation angereichert sind, muss diese Zellpopulation bei intakter Thymusaktivität ein mannigfaltiges polyklonales TCR-Repertoire aufweisen. Die TCR-Diversität der CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen ist im Falle einer durch Peptid-MHCII-Komplexe induzierten peripheren Expansion durch die TCR-Vielfalt der CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen limitiert und könnte im Vergleich zum TCR-Repertoire der CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen eingeschränkter sein.

Obwohl der stark reduzierte TREC-Gehalt in CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen eindeutige Hinweise lieferte, dass CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen naive Th-Zellen repräsentieren, die in der Peripherie proliferiert sind, konnten bei zwei gesunden Spendern keine expandierten TCR-V β -Familien innerhalb der CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zell-Subpopulation detektiert werden (Abb.27A+28A). Auch parallel durchgeführte Vergleiche der TCR-V β -Familien-Expression von CD45RA⁺ Th-Zellen und CD45RO⁺ Th-Zellen konnten keine eindeutig expandierten V β -Familien innerhalb der Antigen-erfahrenen, durch periphere Expansion entstandenen, CD45RO⁺ Th-Zellen aufdecken (Abb.27B+28B). Mehrere Gründe sind hierfür möglich. Da es sich hier um anonyme Spender der Blutbank handelt, ist das Alter der Spender unbekannt. Möglicherweise handelt es sich hier um zwei relativ junge Spender und die Folgen der peripheren Thymus-unabhängigen Expansionsmechanismen sind wahrscheinlich erst nach vielen Jahren sichtbar, da sowohl homöostatische Expansionen als auch die Aktivierung durch Fremdantigene mit dem Alter zunehmen und akkumulieren. Sowohl in murinen als auch in humanen Studien konnten sehr deutliche Veränderungen des TCR-Repertoires mit zunehmendem Alter überwiegend im CD8-Kompartiment beobachtet werden (125, 126). Bis zu 30% der zytotoxischen T-Zellpopulation in älteren

Individuen besteht aus oligo- oder monoklonalen Zellen, die die gleichen TCR-V β -Familien exprimieren (125). V β -Expansionen im CD4-Kompartiment sind im gesunden Menschen gar nicht oder nur selten feststellbar (127).

Neben dem Alter der Spender besteht auch die Möglichkeit, dass die hier verwendete Methode, die TCR-V β -Frequenzanalyse mittels Immunfluoreszenz-Markierung nicht sensitiv genug ist. Durch sensitivere Methoden, z.B. CDR3 Spectratyping können T-Zellpopulationen genauer auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Bei dieser Methode wird die Länge der hypervariablen CDR3 Region der TCR-V β -Kette durch PCR-Analysen bestimmt (128). Allerdings konnten auch Wack et al. durch Spectratyping-Analysen von sortierten CD45RA⁺ Th-Zellen und CD45RO⁺ Th-Zellen zeigen, dass V β -Expansionen nur spärlich in CD45RO⁺ Th-Zellen zu finden sind und ausschließlich in außergewöhnlich alten Menschen (129). Mittels Spectratyping analysierte CD8⁺ Zellen weisen dagegen schon bei jungen Erwachsenen klonale Expansionen auf und sind in 70-Jährigen sehr häufig zu beobachten. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass unterschiedliche Mechanismen in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen die klonale Expansion regulieren. Hierfür spricht auch die Beobachtung von Maini et al., dass durch Viren induzierte oligoklonale Expansionen noch Jahre nach der akuten Infektion in CD8⁺ Zellen und nicht in CD4⁺ Zellen detektiert werden können (130).

4.7 Modell zur Aufrechterhaltung der naiven Th-Zell-Homöostase während des Alterns

Werden die vorgestellten Ergebnisse in Bezug auf:

1. das Vorkommen von höheren Frequenzen von CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen im adulten peripheren Blut
2. die altersabhängigen Frequenzänderungen der beiden CD45RA-Th-Subpopulationen
3. die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der CD45RA-Th-Subpopulationen
4. der durchschnittlich 10-fach reduzierte TREC-Gehalt von CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen im Vergleich zu CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen

im Zusammenhang betrachtet, lässt sich ein Modell der peripheren naiven Th-Zell-Homöostase entwerfen (Abb.31).

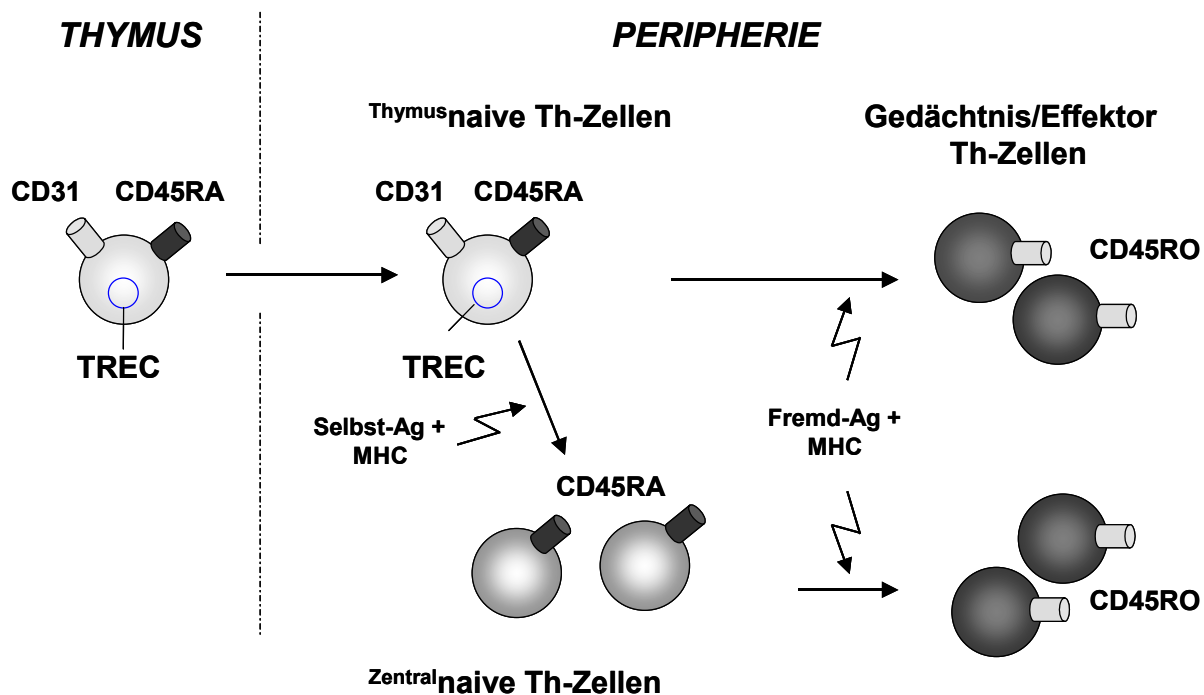


Abbildung 31: Modell zur Aufrechterhaltung der naiven Th-Zell-Homöostase.

In jungen Individuen führt eine hohe Thymusaktivität zu hohen Frequenzen von $CD31^+ CD45RA^+$ Th-Zellen in der Peripherie. Diese Zellen sind charakterisiert durch einen hohen Gehalt an TRECs und werden ^{Thymus} naive Th-Zellen genannt. Im Laufe des Alterns sinken Anzahl und Frequenz dieser $CD31^+ CD45RA^+$ Th-Zellen aufgrund der Thymusinvolution ab. Zur Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools und zur Kompensation der reduzierten Thymusaktivität durchlaufen die $CD31^+ CD45RA^+$ Th-Zellen eine Art zweite positive Selektion in der Peripherie, proliferieren und differenzieren zu $CD31^- CD45RA^+$ Th-Zellen (^{Zentral} naive Th-Zellen). Diese Zellpopulation ist gekennzeichnet durch den Verlust des CD31-Moleküls und durch eine verminderte Anzahl an TRECs. Beide $CD45RA^+$ Th-Subpopulationen weisen gleichermaßen phänotypische und funktionelle Eigenschaften von naiven Th-Zellen auf und können nach angemessener Aktivierung mit dem entsprechenden Fremdantigen zu Gedächtnis- und Effektorzellen differenzieren.

In vielen Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass die homöostatische Proliferation von naiven Th-Zellen eine schwache Interaktion mit MHCII-Molekülen erfordert, die endogene Selbstpeptide präsentieren (56-58). In diesem Zusammen-

hang werden sowohl die gleichen Peptide, die auch für die Selektion im Thymus verantwortlich sind, als auch andere Peptide, die nicht an der Thymusselektion beteiligt sind, von verschiedenen Arbeitsgruppen diskutiert (56-58, 63). Auch Tanchot & Rocha beschreiben das Überleben von naiven Th-Zellen als Imitation der positiven Selektion im Thymus, da die MHC-Erkennung anscheinend einen größeren Einfluss hat als die Peptid-Erkennung (131). Ein weiterer Hinweis auf ein aktives TCR-Signal ist die Feststellung, dass die Proliferation muriner naiver Th-Zellen von der Tyrosinkinase Ick abhängig ist (132). Die Ick-Kinase spielt eine unmittelbare Rolle bei Phosphorylierungen nach TCR-Aktivierung. Ob Signale über den TCR auch an Überleben und Expansion von humanen naiven Th-Zellen beteiligt sind, ist jedoch noch nicht geklärt. Ein Hinweis, der das Modell unterstützt, ist die Beobachtung von Demeure et al.: Die Ligation des TCR bewirkt *in vitro*, dass das CD31-Molekül verloren geht (102). Der Verlust des CD31-Moleküls könnte somit eine Folge der TCR-Kreuzvernetzung mit endogenen Selbstpeptid-MHC-Komplexen darstellen. Desweiteren spielen Zytokine wie IL-7 und IL-15 eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools (64-67). Anscheinend wird die Populationsgröße auch durch die Zelldichte, wie z.B. direkte Zell-Zell-Interaktionen reguliert (133).

Ein weiteres Indiz für das oben vorgestellte Modell ist die schon seit langer Zeit bekannte, zentrale Rolle des CD31-Moleküls in der Leukozyten-Endothel-Adhäsion und transendothelialen Migration von Lymphozyten (91-93). Eine Möglichkeit wäre, dass ^{Thymus} naive Th-Zellen das CD31-Molekül für die transendotheliale Migration in die sekundären Lymphorgane nutzen. Untersuchungen von Mäusen ohne sekundäre Lymphorgane konnten zeigen, dass die naiven Th-Zellen dieser Tiere verkürzte Lebenszeiten aufweisen und keine homöostatische Proliferation von naiven Th-Zellen stattfindet (68, 69). Die Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools erfordert somit genauso wie deren Aktivierung das spezielle Mikromilieu der sekundären Lymphorgane. Vermutlich wird die homöostatische Proliferation nach Migration der naiven Th-Zellen durch die Interaktion mit Peptid-Selbst-MHC in diesen Organen induziert (69).

Neuere kontroverse Veröffentlichungen stellen die Notwendigkeit der TCR-MHCII-Interaktion für die naive Th-Zell Homöostase in Frage. Bei Transferexperimenten von

naiven $CD4^+$ Th-Zellen in MHCII-defiziente Wirte konnte nur eine geringe Beeinträchtigung bezüglich Überleben und homöostatischer Proliferation der naiven Th-Zellen festgestellt werden (134, 135). Analysen von Dorfmann et al. berichten, dass eine TCR-Ligand-abhängige Phosphorylierung der TCR ζ -Kette von naiven Th-Zellen zwar ein Hinweis auf ein aktives TCR-Signal ist, dieses geht jedoch ein Tag nach Transfer in MHC-defiziente Wirte verloren. Deshalb ist es auch möglich, dass naive $CD4^+$ Th-Zellen in den sekundären Lymphorganen MHC-unabhängige Überlebens- und Proliferationssignale erhalten (135). Der Verlust des CD31-Moleküls könnte somit auch eine Folge von unbekanntem MHC-unabhängigen Überlebens- und Proliferationssignalen darstellen.

Möglicherweise übermittelt das CD31-Molekül negative Signale während der peripheren homöostatischen Proliferation und kontrolliert dadurch die T-Zell-Aktivierung nach Interaktion mit Selbstpeptid-MHC-Komplexen. Erst vor wenigen Jahren wurde festgestellt, dass das Pecam-1-Molekül auch eine inhibierende Funktion besitzt. Die Ligation des CD31-Moleküls induziert eine Tyrosinphosphorylierung des zytoplasmatischen ITIMs und resultiert in einer Inhibierung der T-Zell-Aktivierung (98). Auch Untersuchungen von A. Anderson in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass durch die Zugabe eines immobilisierten α CD31-Antikörpers bei einer *in vitro* T-Zell-Stimulation mittels α CD3- und α CD28-Antikörper die Zellproliferation naiver Th-Zellen dosisabhängig inhibiert wird. Da die Koligation des CD31-Moleküls nur die frühen und nicht die späten TCR-induzierten Calcium-Signale reduzieren kann, stellten Newton-Nash die Hypothese auf, dass die PECAM-1/TCR-Koligation nicht vollständig inhibiert, sondern eher zu einer Verzögerung der T-Zell-Antwort führt (98).

Wie schon oben erwähnt scheinen Th-Zellen in der Lage zu sein die Populationsdichte „wahrnehmen“ zu können. Weiterhin wird auch angenommen, dass sie zwischen naiven und Antigen-erfahrenen „Nachbar-T-Zellen“ unterscheiden können. Ob diese Fähigkeit direkte Zell-Zell-Interaktionen widerspiegelt oder eine Zunahme/ eine Abnahme von löslichen Faktoren oder Wachstumsfaktoren oder eine Kombination von allem, ist noch unbekannt (133). Ein Ligand des CD31-Moleküls ist CD31 selbst (84). Eine mögliche Theorie wäre, dass die Dichte der ^{Thymus}naiven

CD31⁺ Th-Zellen in der Peripherie die homöostatische Expansion reguliert. Sind viele CD31⁺ Th-Zellen in der Peripherie nimmt die Anzahl homophiler Bindungen zu. Im Zusammenspiel mit einer TCR-Ligation inhibieren sich die naiven CD31⁺ Th Zellen gegenseitig und proliferieren schwächer oder teilen sich nicht mehr. Ist die Anzahl der CD31⁺ Th-Zellen in der Peripherie reduziert, werden weniger negative CD31-Signale übermittelt, so dass die naiven Th-Zellen in Folge einer leichten TCR-Aktivierung homöostatisch proliferieren und den freien „Platz“ auffüllen können. Da auch unreife DCs und naive B-Zellen das CD31-Molekül exprimieren (79, 80), könnten die APCs neben der Aktivierung durch schwache MHC-II-TCR Interaktionen auch gleichzeitig die homöostatische Expansion der naiven Th-Zellen über CD31-CD31-Bindungen kontrollieren. Es müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um zu klären, ob das PECAM-1 Molekül eine direkte Funktion bei den homöostatischen Proliferationsvorgängen von naiven Th-Zellen besitzt.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden noch keine Studien von CD31-knock-out-Mäusen bezüglich der naiven Th-Zellhomöostase und inhibierenden Funktion des CD31-Moleküls durchgeführt. Allerdings zeigen CD31-knock-out Mäuse einen normalen Phänotyp und weisen keine offensichtlichen immunologischen Defekte hinsichtlich T-Zell-Reifung und T-Zell-Homing auf (136). Alle bisherigen Studien von CD31-defiziente Mäusen beschränken sich ausschließlich auf Analysen bezüglich der Migrations- und Adhäsionsfunktionen des CD31-Moleküls. Zwar konnte von Duncan et al. ein Defekt in der transendothelialen Migration der Leukozyten beobachtet werden, die normale Anzahl der Leukozyten in den sekundären Lymphorganen lässt jedoch auf eine Kompensation durch andere Adhäsionsmoleküle schließen. Weiterhin beobachteten Thompson et al. eine verzögerte Leukozytenmigration in CD31-defizienten Mäusen (137).

Auch bezüglich des „Schicksals“ der proliferierten T-Zellen existieren kontroverse Publikationen. Die homöostatische Proliferation von murinen naiven Th-Zellen erfolgt sehr langsam und steht im Zusammenhang mit der Expression von verschiedenen Aktivierungs- und Gedächtnismarkern wie z.B. CD44. Hierbei ist jedoch unklar, ob diese phänotypischen Veränderungen von Dauer sind, oder ob eine anschließende Re-Konversion zum naiven Phänotyp stattfindet (138-140). Anhand der hier durchgeführten phänotypischen und funktionellen Analysen konnten nur sehr geringe

Frequenzen (<1%) von peripheren CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen beobachtet werden, die revertierte Gedächtnis- und Effektor-Th-Zellen repräsentieren könnten. Wahrscheinlich treten solche phänotypischen Veränderungen während der homöostatischen Proliferation von humanen naiven Th-Zellen nur vorübergehend auf, oder humane Th-Zellen zeigen im Gegensatz zu murinen Th-Zellen keine phänotypischen Veränderungen.

Das oben vorgestellte Modell und die zuvor diskutierten Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen sich gegenseitig: Die Gesamtpopulation der CD45RA⁺ Th-Zellen stellt keine homogene Population naiver Th-Zellen dar. Da die RTEs in den CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen angereichert sind, könnte dies die Tatsache erklären, dass die CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen verschiedener Spender unter den gleichen Stimulations- und Kulturbedingungen ein einheitliches Zytokinexpressionsmuster aufwiesen (Abb.23). Die CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen repräsentieren peripher proliferierte Th-Zellen, deren Frequenz im Verlaufe des Alterns zunimmt. CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen sind deshalb vermutlich eher durch die unterschiedlichen „immunologischen Erfahrungen“ der verschiedenen Spender beeinflusst. Zusammen mit unterschiedlichen genetischen Voraussetzungen könnte dies zu einer größeren Varianz im Hinblick auf die Zytokinproduktion nach Stimulation zwischen den Spendern führen (siehe auch Kap.4.4.3).

4.7.1 Zusammenspiel Thymus-unabhängiger Regulationsmechanismen

Neben der homöostatischen Proliferation existieren weitere Thymus-unabhängige Regulationsmechanismen, die der reduzierten Thymusaktivität entgegensteuern. Sowohl lange Lebenszeiten der naiven T-Zellen, als auch die extrathymische T-Zell-Entwicklung beeinflussen ebenfalls den naiven Th-Zellpool.

Nach einer Hypothese von Ernst et al. führt die schwache Interaktion des TCR mit MHC-II-Peptiden zu unterschiedlichen Reaktionen der naiven Th-Zellen in Abhängigkeit von der Gesamtgröße des naiven Th-Zellpools. Unter „normalen“ Bedingungen, wenn ausreichend naive Th-Zellen in der Peripherie vorhanden sind, verbleiben naive Th-Zellen in der Interphase. Vermutlich unterstützen die TCR-Signale das Überleben der ruhenden naiven Th-Zellen. Ist die Gesamtanzahl der naiven CD4⁺ Th-Zellen in der Peripherie reduziert, induzieren die TCR-Signale die

homöostatische Proliferation (56). Nach Schätzungen von McLean und Michie teilen sich naive CD45RA⁺ Th-Zellen durchschnittlich nur alle 3,5 Jahre, wohingegen Antigen-erfahrene Th-Zellen ca. alle 22 Tage eine Teilung durchlaufen (141). Diese errechneten Proliferationsraten basieren auf Untersuchungen von Chromosomen-schäden und stimmen mit den relativen Lebenszeiten von murinen T-Zell-Populationen überein. Dagegen vermuten Boursalian et al., dass nur eine Subpopulation der naiven Th-Zellen, die aus dem Thymus auswandern, das Potential für eine lange Lebenszeit besitzt (142).

Auch die Kompensation der reduzierten Thymusaktivität durch eine extrathymische T-Zell-Entwicklung wird von vielen Arbeitsgruppen diskutiert. In mehreren Mausmodellen konnte eine extrathymische T-Zell-Entwicklung in verschiedenen Organen wie dem Knochenmark (143, 144), der Darm-Mukosa (145) und der Leber (146, 147) festgestellt werden. Sind in der Peripherie ausreichend naive Th-Zellen vorhanden, ist die Rolle dieser Organe bezüglich T-Zell-Differenzierung und Aufrechterhaltung des peripheren T-Zell-Kompartiments im Vergleich zum Thymus jedoch sehr gering (148). Die *in vitro* Entstehung von funktionellen, reifen T-Zellen mit verschiedenen TCR- $\nu\beta$ -Familien aus humanen Stammzellen, in Abwesenheit des Thymus-Mikromilieus, deutet auch auf das Vorkommen einer extrathymischen T-Zell-Entwicklung im Menschen hin (149).

In isolierten peripheren CD4⁺ Th-Zellen von Patienten mit DiGeorge-Syndrom und einer assoziierten Thymus-Aplasie konnten keine TRECs detektiert werden (72). Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass die hier beschriebene Detektion von TRECs in naiven Th-Zellpopulationen und die Detektion von TREC⁺ Zellen im Allgemeinen auch die extrathymische T-Zell-Produktion reflektieren. Unterstützt wird dies zusätzlich durch quantitative Daten des Thymusgewebes. Die altersabhängige Reduktion des Thymusgewebes korreliert eindeutig mit der 50 bis 100-fachen Abnahme der TRECs im peripheren Blut (72). Da extrathymische murine Th-Zellen, bzw. Subpopulationen dieser Zellen dem Phänotyp von aktivierten Th-Zellen und Gedächtnis-Th-Zellen ähneln, ein limitiertes TCR-Repertoire aufweisen und/oder funktionelle Eigenschaften von zytotoxischen T-Zellen besitzen (150) ist es sehr unwahrscheinlich, dass der altersabhängige Anstieg von naiven TREC⁻ CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen auch eine Zunahme von Th-Zellen extrathymischen Ursprungs repräsentiert.

4.8 Differentielle Genexpression von ruhenden CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen im Vergleich zu CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen - vorläufige Affymetrix - Ergebnisse

Anhand der TREC-Analysen konnte gezeigt werden, dass CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen humane naive Th-Zellen darstellen, die in der Peripherie durch homöostatische Proliferation entstanden sind. Somit müssen neben Faktoren, die diese post-thymischen Proliferationsprozesse initiieren (siehe Kap.4.7) auch Faktoren existieren, die die Zellteilungsvorgänge beenden bzw. regulieren. Die Auswirkungen dieser Faktoren sollten dann auf der Ebene der Zielzellen durch an- bzw. abgeschaltete regulatorische Gene erkennbar sein. Es gibt deutliche Hinweise, dass der Zustand ruhender T-Zellen, genauso wie deren Aktivierung, ein aktiv regulierter Prozess ist. In diesem Zusammenhang konnte z.B. die essentielle Rolle vieler Transkriptionsfaktoren, wie z.B. LKLF oder Ets an der Regulation der T-Zellentwicklung, T-Zellhomöostase und T-Zellaktivierung aufgedeckt werden (157). Um unterschiedlich exprimierte Gene in ruhenden naiven CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Subpopulationen zu identifizieren, die an der Regulation/Suppression der peripheren homöostatischen Proliferation von naiven Th-Zellen beteiligt sind, wurden Genexpressionsprofile der Th-Zellpopulationen erstellt und verglichen. Die DNA-Chip-Technologie ermöglicht eine qualitative als auch quantitative Beurteilung der Genexpression. Voraussetzung für die Analyse der Genexpression ist eine hohe Reinheit der untersuchten Populationen. Wie in Kap. 3.3.1 beschrieben, wurden ausschließlich isolierte Th-Zell-Subpopulationen verwendet, deren Reinheit mindestens 95% (CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Subpopulationen) bzw. 93% (CD45RO⁺ Th-Zellen) betrug.

Durch die Expressionsanalyse von „Markergenen“, deren Expression in den untersuchten Zellpopulationen bekannt ist, wurde zunächst ein Eindruck über Qualität und Verlässlichkeit der Chips bzw. der Technologie erstellt. Die Überprüfung zeigte, dass vier Gene von spezifischen Antigenen, die exprimiert sein sollten, auf je einem Chip nicht detektiert wurden (Tab.7): das CD31-Antigen auf CD31⁺ Th-Zellen (Chip 1), das CD4-Antigen auf CD31⁺ Th-Zellen (Chip1) und auf CD45RO⁺ Th-Zellen (Chip 5 / Chip 6). Außerdem wurden acht Gene von spezifischen Antigenen detektiert, die nicht exprimiert sein sollten: das B-Zell-Antigen CD19 auf CD31⁺ Th-Zellen (Chip 1 / Chip 2), CD31⁻ Th-Zellen (Chip 3 / Chip 4) und CD45RO⁺ Th-Zellen (Chip 5) und das CD8-Antigen von zytotoxischen T-Zellen auf CD31⁺ Th-Zellen (Chip

1), CD45RO⁺ Th-Zellen (Chip 5 / Chip 6). Weiterhin wurden drei Gene als *Marginal* bewertet, d.h. sie wurden nicht eindeutig als *Present* oder *Absent* bewertet, sollten jedoch exprimiert sein (das CD4-Antigen auf CD31⁺ Th-Zellen, Chip 2), bzw. nicht exprimiert sein (das CD19-Antigen auf CD45RO⁺ Th-Zellen, Chip 6, und das DC-Antigen CD83 auf CD31⁺ Th-Zellen, Chip 2). Diese Beobachtungen können mehrere Gründe haben. Zum einen kann die Expression von spezifischen Genen anderer Zelltypen, wie z.B. B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen durch geringe „Kontaminationen“ der isolierten Th-Zellpopulationen mit diesen Zelltypen zustande kommen. Die Reinheit der angereicherten CD4⁺ Th-Zellen mittels MACS betrug in allen Proben $\geq 99\%$. Dies würde bedeuten, dass schon 1% „Verunreinigung“ mit anderen Zelltypen einen Einfluss auf das Gesamtbild haben kann. Vermutlich liegen die mRNAs dieser Antigene in großen Mengen in den Zellen vor. Manche Gene sind mehrmals durch Sondenpaar-Sets auf dem Chip vertreten. Sowohl für das CD19-Antigen als auch das CD8-Antigen sind jeweils zwei Sets auf dem verwendeten Chip. Die mRNA des entsprechenden Gens konnte nur durch ein Set detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass die Detektion dieser Gene nicht eindeutig ist. Das Gleiche, nur umgekehrt, gilt auch für die nicht detektierten Gene des CD4-Antigens. Bei einem zweiten Sondenpaar-Set wurde das Antigen wie erwartet als *Present* bewertet. Im Falle des nicht detektierten Gens des CD31-Antigens auf CD31⁺ Th-Zellen (Chip 2), die nach diesem Oberflächenmolekül sortiert wurden, wird bei Betrachtung des p-Wertes (0,067) erkennbar, dass es sich hier um einen p-Wert handelt, der nahe an der Ausschlussgrenze für *Absent* (0,06) liegt. Die Bewertung des Expressionssignals ist somit eher unzuverlässig. Das Gleiche gilt auch für die als *Marginal* eingestuftene Gene.

Insgesamt stimmten 15 Gene bzw. 8,9 % der überprüften „Markergene“ nicht mit den erwarteten Ergebnissen überein. Dies liegt im Rahmen der von Affymetrix angegebenen Fehlerquote und deutet somit auf eine gute Qualität der hier verwendeten Chips und eine hohe Zuverlässigkeit der GeneChip®-Technologie hin. Durch die Gegenüberstellung von jeweils zwei Expressionsprofilen wurden differentiell exprimierte Gene identifiziert. Die im Ergebnisteil aufgeführten zusätzlichen Kriterien erhöhten die Verlässlichkeit für eine Expressionsänderung von Genen zwischen zwei Populationen. Allgemein ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene in den hier untersuchten Populationen sehr gering, da es sich um ruhende, nicht-aktivierte Zellen handelt. Zwischen naiven CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen und

CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen waren nur wenige Gene (48 Gene und 2 ESTs) unterschiedlich exprimiert. Von diesen Genkandidaten zeigten alle bis auf 5 eine Expressionszunahme in den CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen im Vergleich zu den CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass der Ruhezustand von T-Zellen nach homöostatischer Proliferation aktiv reguliert wird und steht in Einklang mit der oben erwähnten Publikation. Zwischen CD45RO⁺ Th-Zellen und CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen konnten 73 Gene und zwischen CD45RO⁺ Th-Zellen und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen 138 differentiell exprimierte Gene detektiert werden. Auch dies bestätigt die Ähnlichkeit der beiden naiven CD45RA⁺ Th-Zellpopulationen. Prinzipiell ist bei den unterschiedlich exprimierten Genen zu beachten, dass der hier detektierte *Fold Change* der Expressionsunterschiede keine quantitative Aussage über die Menge des Genproduktes, bzw. deren Verhältnis zwischen verschiedenen Zellpopulationen zulässt. Translation, Transkription und Prozessierung eines Gens bzw. dessen Produkts müssen nicht zwangsläufig linear zueinander und/oder zur mRNA-Menge stehen.

4.9 Naive Th-Zell-Homöostase und klinische Relevanz

Obwohl angenommen wird, dass der Thymus auch im Alter in der Lage ist funktionelle Th-Zellen zu produzieren, ist die Produktion von „neuen“ T-Zellen im Thymus in Individuen ab ca. 40 Jahren stark reduziert. Somit ist der Einfluss des Thymus auf den peripheren naiven Th-Zellpool in Individuen ab 40 Jahren nur noch gering (72). Diese Einschränkung hat neben den altersbedingten immunologischen Veränderungen unter Umständen auch eine klinische Bedeutung.

So liegt das Manifestationsalter vieler Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (RA), des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) oder auch der Systemischen Sklerodermie (SSc) präferentiell erst ab dem 30. Lebensjahr. Ein Faktor, der hierfür ausschlaggebend sein kann, ist die „natürliche“ Anhäufung von Infektionen im Verlaufe des Alterns und die sogenannte „molekulare Mimikry“. Hierbei wird angenommen, dass verschiedene Pathogene Ähnlichkeiten mit Antigen determinanten bestimmter Gewebestrukturen oder bestimmter HLA-Moleküle besitzen und folglich Effektorzellen auch auf wirtseigene Strukturen reagieren können (151-153). Erst in letzter Zeit wurde eine weitere Theorie vorgeschlagen. Auch die mit zunehmendem Alter drastisch verstärkte periphere homöostatische

Proliferation von naiven Th-Zellen, bedingt durch die reduzierte Thymusaktivität, könnte eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen. Verschiedene Untersuchungen unterstützen diese Hypothese zumindest bei der RA. Wagner et al konnten zeigen, dass RA-Patienten ein verändertes naives TCR-Repertoire und eine veränderte naive Th-Zell-Homöostase aufweisen (123). Außerdem ist der TREC-Gehalt der naiven Th-Zellen dieser Patienten stark reduziert. Dies indiziert eine reduzierte Thymusaktivität und/oder eine verstärkte Proliferation der peripheren naiven Th-Zellen (154, 155). In diesem Zusammenhang wäre denkbar, dass die zunehmende Proliferation von naiven Th-Zellen in der Peripherie auch zu einem Frequenzanstieg von autoreaktiven Th-Zellen führen könnte und hierdurch das Risiko einer Autoimmunantwort erhöht wird.

4.10 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass der humane periphere naive CD45RA⁺ Th-Zellpool im Blut von gesunden Spendern aus zwei Populationen besteht. Die CD31⁺ CD45RA⁺ Zellpopulation enthält RTEs, CD31⁻CD45RA⁺ Th-Zellen repräsentieren naive Th-Zellen, die in der Peripherie expandiert sind, um einer zu starken Abnahme des naiven Th-Zellpools nach Thymusinvolution entgegenzusteuern. Die Unterscheidung zwischen naiven Th-Zellen, die erst kürzlich aus dem Thymus emigriert sind und peripher expandierten naiven Th-Zellen anhand eines phänotypischen Markers ermöglicht weitere funktionelle und molekulare Analysen der beiden Populationen. Weiterhin gestattet sie die Identifizierung und Charakterisierung von Faktoren (Zelltypen, Peptide, Interleukine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle etc.), die in den Homöostaseprozess involviert sind und kann Aufschluss geben über deren Zusammenwirken und deren intrazellulären Signale.

Methoden, die eine qualitative Beurteilung der Th-Zell-Rekonstitution nach Virusinfektionen (z.B. HIV-Infektion) Stammzelltransplantationen, Bestrahlung und Chemotherapie zulassen, sind von großer klinischer Bedeutung, da eine fortdauernde Th-Zell-Defizienz zu nachteiligen Komplikationen führen kann. Studien zur Immunrekonstitution bei Patienten nach autologer und auch allogener Stammzelltransplantation konnten bereits zeigen, dass die naive Th-Zell-Rekonstitution sehr langsam erfolgt und von der „Reaktivierung“ des Thymus abhängt. Eine Evaluation im Hinblick auf Effizienz und Stabilität einer solchen „Reaktivierung“ des Thymus war bis vor wenigen Jahren nicht möglich, obgleich dieser eine enorme prognostische Relevanz in den verschiedensten klinischen Situationen zukommt. Mittlerweile wird zur indirekten Messung der Thymusaktivität häufig die Detektion und Quantifizierung von TRECs herangezogen.

Erste Daten unseres Labors zeigen, dass die durchflusszytometrische Bestimmung der Frequenzen von naiven peripheren CD31⁺ Th-Zellen als Methode zur Messung der Thymusaktivität und/oder Bewertung der Regeneration des peripheren naiven Th-Zellpools herangezogen werden kann. Die spezifische Färbung von Zellen mittels Immunfluoreszenz-Markierung bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl von Zellen

schnell, einfach und gleichzeitig nach mehreren Parametern durchflusszytometrisch zu analysieren, sowie für weitere Untersuchungen zu isolieren.

Die im letzten Abschnitt dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen liefern erste Hinweise auf Gene, die für die Homöostase von naiven Th-Zellen relevant sein könnten, und sollen im nächsten Schritt in weiteren Untersuchungen mittels quantitativer PCR-Analyse, wie z.B. LightCycler-PCR geprüft werden. Im Falle einer Bestätigung der Affymetrix-Ergebnisse durch quantitative PCR-Analysen können Hinweise auf die essentielle Bedeutung einzelner Gene bei der naiven Th-Zell-Homöostase dann wiederum auf Proteinebene bestätigt werden. Weiterhin werden auch im Falle einer Bestätigung Vergleiche mit der Literatur zeigen, ob ein Gen bzw. dessen Funktion bereits in entsprechende Zusammenhänge einzuordnen ist. Geeignete Methoden zur Überprüfung der quantitativen PCR-Ergebnisse auf Proteinebene sind FACS-Analyse, ELISA-Verfahren und Western-Blot. Außerdem kann durch die neue RNA-interference-Technologie die Funktion der betrachteten Gene, bezüglich der Regulation der homöostatischen Proliferation von naiven Th-Zellen durch das gezielte Ausschalten dieser Gene in *in vitro* Experimenten untersucht werden.