

Thymus **naive und** *Zentral* **naive humane**
Th-Lymphozyten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

eingereicht am
Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sonja Kimmig
aus Offenburg

Berlin, im März 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Radbruch

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juli 2003

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Angeborene und erworbene Immunität	1
1.2 Humorale und zelluläre Immunität	2
1.3 Der Thymus und die Entwicklung der T-Lymphozyten	3
1.4 Aktivierung und Differenzierung naiver Th-Zellen.....	4
1.5 Naive und Antigen-erfahrene Th-Zellen.....	6
1.6 Thymusinvolution und naive Th-Zell-Homöostase.....	8
1.7 Identifizierung von Thymusemigranten durch T cell receptor excision circles (TRECs).....	11
1.8 PECAM-1 (CD31).....	12
1.9 Ziele dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Puffer und Lösungen.....	15
2.2 Geräte	15
2.3 Zellkulturmedien und Kulturbedingungen	16
2.4 Antikörper und Microbeads	16
2.5 Präparation humaner mononukleärer Zellen	18
2.5.1 Blutspender	18
2.5.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)/ Isolierung mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC)	18
2.5.3 Bestimmung der Zellzahl	19
2.6 Polyklonale <i>in vitro</i> Th-Zell-Stimulation	19
2.7 Coaten von Zellkulturplatten mit immobilisierten α CD3 und α CD28- Antikörpern	20
2.8 <i>in vitro</i> - Polarisierung von naiven CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen in proinflammatorische Th-Zellen	20

	Seite
2.9	Quantitative Bestimmung der Zellproliferation.....20
2.10	Fixierung von Zellen.....21
2.11	Immunfluoreszenzfärbungen.....21
2.11.1	Färbung von Zelloberflächenmolekülen.....21
2.11.2	Intrazelluläre Färbung von Zytokinen22
2.12	Durchflusszytometrie22
2.13	Methoden der Zelltrennung24
2.13.1	Magnetische Zellsortierung (MACS).....24
2.13.1.1	Isolierung von CD4 ⁺ Th-Zellen.....25
2.13.1.2	Isolierung von naiven CD45RA ⁺ Th-Zellen und Antigen-erfahrenen CD45RO ⁺ Th-Zellen26
2.13.1.3	Separation von naiven CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen.....26
2.13.2	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung26
2.14	Quantifizierung von TRECs durch real time PCR28
2.15	cRNA-Präparation und DNA-Microarray29
2.15.1	cRNA-Präparation30
2.15.2	Hybridisierung und Analyse31
2.15.3	Auswertung der Messdaten32
2.16	Statistik.....34
3	<i>Ergebnisse</i> 36
3.1	Charakterisierung von Th-Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut von gesunden Spendern36
3.1.1	Expression des CD4-Antigens auf PBMC.....36
3.1.2	Expression von CD45RA und CD45RO auf CD4 ⁺ Th-Zellen36
3.1.3	Expression von CD31 auf T-Zellen.....38
3.1.3.1	Expression von CD31 auf naiven CD45RA ⁺ Th-Zellen und Antigen- erfahrenen CD45RO ⁺ Th-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern.....38

	Seite	
3.1.3.2	Expression von CD31 auf CD45RA ⁺ Th-Zellen im Nabelschnurblut.....	39
3.1.3.3	Expression von CD31 auf CD45RA ⁺ Th-Zellen im peripheren Blut von Patienten nach autologer Stammzelltransplantation.....	40
3.1.3.4	Expression von CD31 auf peripheren CD4 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen.....	41
3.1.3.5	Expression von CD31 auf CD8 ⁺ T-Zellen	42
3.1.3.6	Expression des CD31-Moleküls während der Konversion von naiven CD45RA ⁺ Th-Zellen zu Antigen-erfahrenen CD45RO ⁺ Th-Zellen nach antigener oder mitogener <i>in vitro</i> Stimulation	43
3.1.4	Bestimmung der Frequenzen von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Spender	46
3.2	Phänotypische, funktionelle und molekulare Analysen von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern	48
3.2.1	Phänotypische Analyse von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen.....	48
3.2.2	Analyse der Zytokinproduktion von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen nach polyklonaler <i>in vitro</i> Stimulation	51
3.2.2.1	Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ und CD45RO ⁺ Th-Zell-Subpopulationen mittels der magnetischen Mehrparameter-Zellsortierung	51
3.2.2.2	Zytokinpotential von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen nach polyklonaler <i>in vitro</i> Stimulation	53
3.2.3	<i>In vitro</i> Polarisierung von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen zu proinflammatorischen Th-Zellen	56
3.2.4	Quantitative PCR-Analyse von TRECs in CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen	61
3.2.4.1	Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ und CD45RO ⁺ Th-Zell-Subpopulationen mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung	62
3.2.4.2	Bestimmung des TREC-Gehalts in CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen	64
3.2.5	Vergleich der TCR-Repertoires von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen	65
3.3	Genexpressionsstudien von CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen mit Hilfe der GeneChip®-Affymetrix Technologie	69

	Seite
3.3.1 Zellmaterial und Reanalyse der isolierten Th-Subpopulationen.....	69
3.3.2 Isolierung und Poolen der RNA	70
3.3.3 Qualität der Chips/ Kontrolle der Technologie	71
3.3.4 Differentiell exprimierte Gene in CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen - vorläufige Ergebnisse	73
4 Diskussion	77
4.1 Expression von CD31 auf T-Zellen.....	77
4.2 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zell-Subpopulationen	81
4.3 Frequenzen von CD31 ⁺ Th-Zellen innerhalb der CD45RA ⁺ Th-Zellen nehmen mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab.....	82
4.4 Phänotypische und funktionelle Untersuchungen der CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen	83
4.4.1 CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen sind phänotypisch naive Th-Zellen	83
4.4.2 Zytokinpotential von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen.....	84
4.4.3 Th1-Polarisierungs-Kulturen von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen..	85
4.5 CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen repräsentieren proliferierte naive Th-Zellen.....	87
4.6 Vergleich der TCR-Repertoires von CD31 ⁺ und CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th-Zellen.....	89
4.7 Modell zur Aufrechterhaltung der naiven Th-Zell-Homöostase während des Alterns	90
4.7.1 Zusammenspiel Thymus-unabhängiger Regulationsmechanismen	95
4.8 Differentielle Genexpression von ruhenden CD31 ⁻ CD45RA ⁺ Th- Zellen im Vergleich zu CD31 ⁺ CD45RA ⁺ Th-Zellen	97
4.9 Naive Th-Zell-Homöostase und klinische Relevanz	99
4.10 Ausblick.....	101
5 Zusammenfassung.....	103
6 Literaturverzeichnis	104

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BfA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CFDA-SE	(5,6) Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester
CFSE	(5,6) Carboxyfluoreszein-Succinimidylester
Csk	Tyrosin-Kinase
Cy5	Indopentamethincyanin
DIG	Digoxenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunosorbenttest
FA	Formaldehyd
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Floureszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Zentrifugalbeschleunigung: $9,81\text{m/sec}^2$
h	Stunde(n)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	Immunrezeptor-Tyrosin-basierendes-Inhibierungsmotiv
l	Liter
Lck	zur Src-Familie gehörende Protein-Kinase
MACS	magnetische Zellsortierung
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHCI/II	MHC-Molekül der Klasse I/II
MM	engl. mismatch
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBS-BSA	PBS mit Rinderserum-Albumin
PBS-BSA-Azid	PBS-BSA mit Natriumazid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1; CD31
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a
PerCPCy5.5	Peridiumchlorophyllprotein konjugiert mit Cy5.5
PJ	Propidiumjodid
PM	engl. perfect match
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RA	rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RTE	Recent thymic emigrant
SA	Streptavidin
SSC	Seitwärtsstreulicht
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TREC	T cell receptor excision circle
U	Unit (Einheit der Enzymmenge)