

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Charakterisierung von Th-Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut von gesunden Spendern**

##### **3.1.1 Expression des CD4-Antigens auf PBMC**

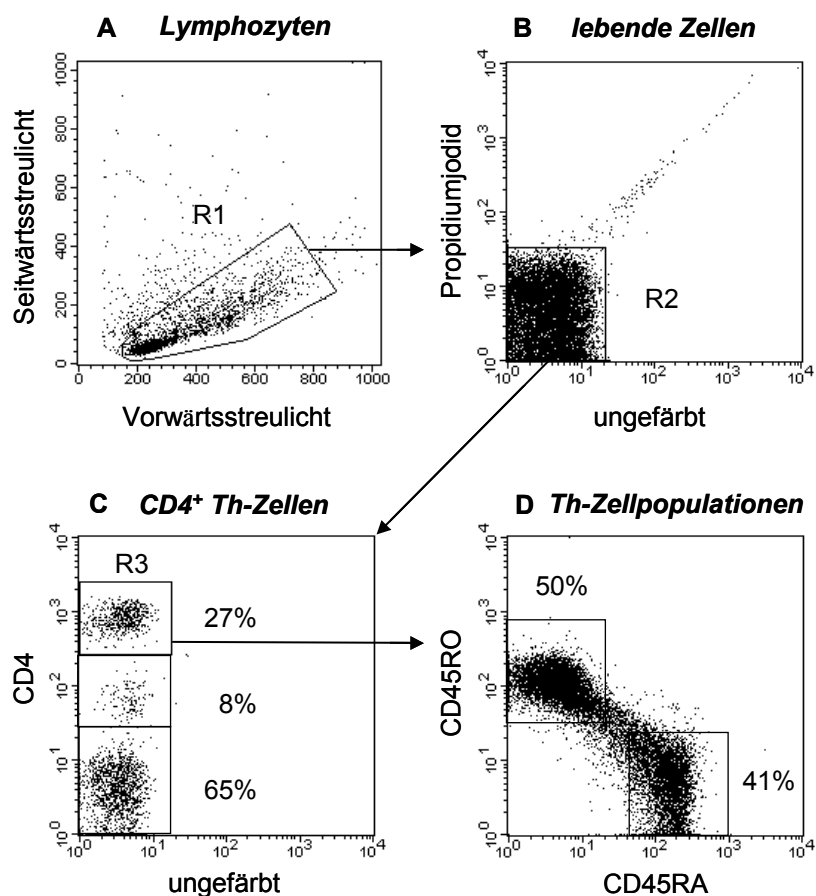
Aufgrund der Expression des charakteristischen CD4-Moleküls lassen sich humane Th-Zellen von zytotoxischen T-Zellen unterscheiden. Im Menschen prägen auch Monozyten dieses Oberflächenmolekül aus, wenn auch mit geringerer Intensität.

20-40% der PBMC exprimieren das CD4-Molekül mit starker Intensität, die Frequenz der Monozyten variiert zwischen 5-10% (n=50) (Abb.10).

##### **3.1.2 Expression von CD45RA und CD45RO auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen**

Die Expression der in der Einleitung beschriebenen charakteristischen Marker für naive Th-Lymphozyten und Antigen-erfahrene Effektor- und Gedächtniszellen, die alternativ gespleißten CD45-Isoformen CD45RA und CD45RO, wurden durchflusszytometrisch gemessen. Hierbei wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierte PBMC normaler Spender mit fluoreszierenden Antikörpern, die spezifisch an CD45RA, CD45RO und CD4 binden, markiert und durchflusszytometrisch analysiert (n=30).

25-50% der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen des peripheren Blutes exprimieren ausschließlich CD45RA (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen) und 50-75% prägen ausschließlich den CD45RO-Rezeptor (CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Th-Zellen) aus. Ungefähr 20-30% der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen bilden eine Übergangspopulation und sind durch eine gleichzeitige, jedoch schwächere Expression beider CD45-Isoformen auf ihrer Oberfläche charakterisiert (CD45RO<sup>low</sup>/CD45RA<sup>low</sup>) (Abb.10D).



**Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD4, CD45RA und CD45RO auf adulten PBMC.**

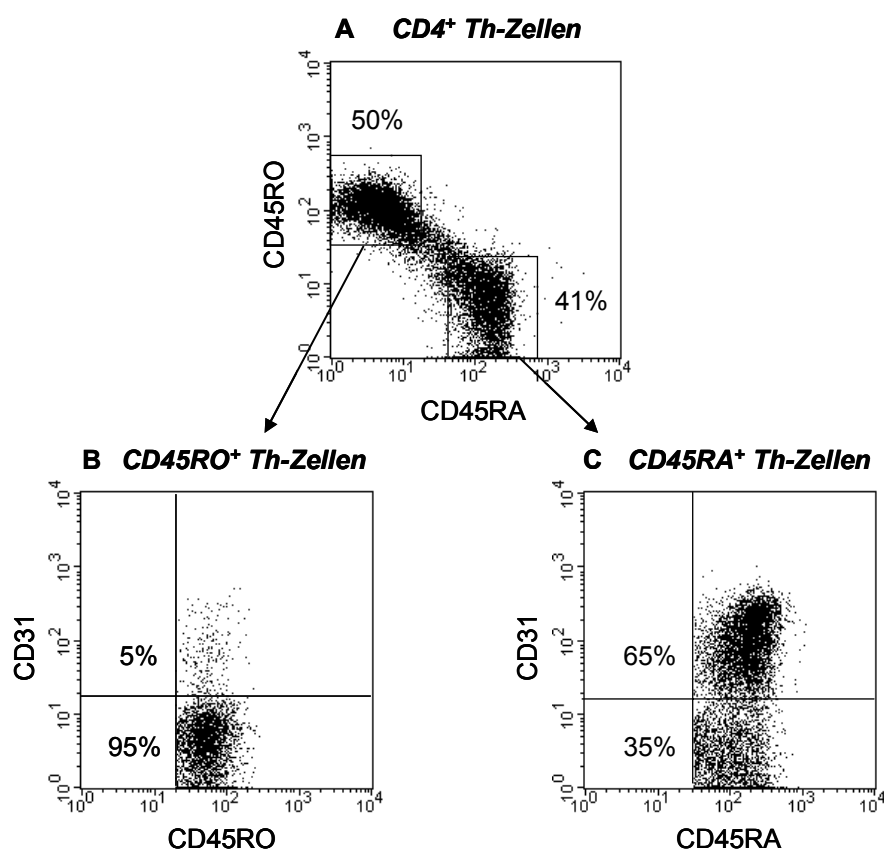
Aus dem Blut eines gesunden Spenders wurden PBMC isoliert, mit konjugierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4, CD45R und CD45RO markiert, durchflusszytometrisch analysiert und in zweidimensionalen Punktdiagrammen dargestellt.

In (A) und (B) sind die Zellen nach ihren Streulichteigenschaften und Propidiumjodidfluoreszenz dargestellt, (R1) + (R2) zeigen die Lage der verwendeten Analysefenster. Durch die beiden Analysefenster wird die Expressionsanalyse auf die ruhenden, lebenden Lymphozyten beschränkt. (C) Expression des CD4-Antigens auf PBMC. (D) Koexpression von CD45RA und CD45RO auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Beschränkung auf lebende CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird durch die Kombination der Analysefenster R1, R2 und R3 erreicht. In den jeweiligen Punktdiagrammen sind die Frequenzen der Subpopulationen angegeben.

### 3.1.3 Expression von CD31 auf T-Zellen

#### 3.1.3.1 Expression von CD31 auf naiven $CD45RA^+$ Th-Zellen und Antigen-erfahrenen $CD45RO^+$ Th-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern

Sowohl innerhalb der naiven als auch der Antigen-erfahrenen Th-Zell-Subpopulation im peripheren Blut von gesunden Spendern gibt es Zellen, die das Oberflächenmolekül CD31 exprimieren. Die Expression des CD31-Moleküls geht *in vitro* nach TCR-Aktivierung verloren (102).



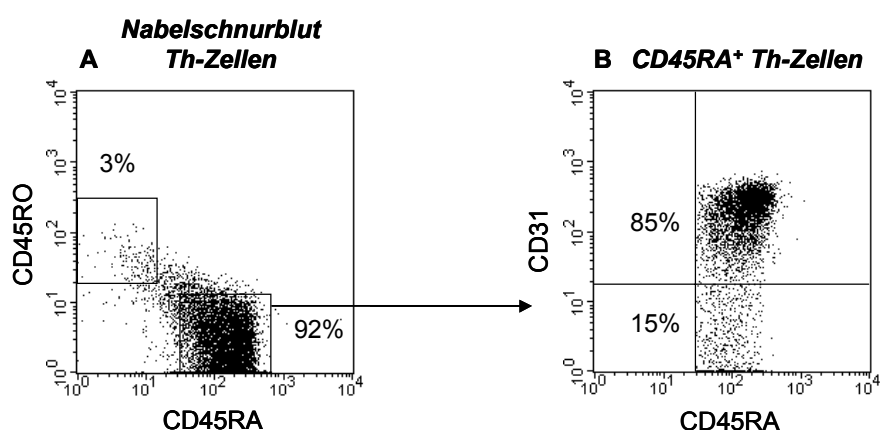
**Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD31 innerhalb der  $CD45RA^+$   $CD45RO^-$  und  $CD45RO^+$   $CD45RA^-$  Th-Subpopulationen im adulten peripheren Blut.**

MACS-isolierte  $CD4^+$  Th-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO und CD31 markiert (A). Durch das Setzen von Analysefenstern wurden die  $CD45RA^-$   $CD45RO^+$  (B) und die  $CD45RA^+$   $CD45RO^-$  Th-Subpopulationen (C) auf die Expression von CD31 untersucht. Die angegebenen Frequenzen beziehen sich in (A) auf die Frequenz der CD45RA und CD45RO unterschiedlich exprimierenden Subpopulationen innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellpopulation, in (B) auf die Frequenz der CD31 unterschiedlich exprimierenden Subpopulationen innerhalb der  $CD45RO^+$  Th-Zellpopulation und in (C) auf die Frequenz der CD31 unterschiedlich exprimierenden Subpopulationen innerhalb der  $CD45RA^+$  Th-Zellpopulation.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Expression des CD31-Moleküls auf naiven  $CD45RA^+$  und Antigen-erfahrenen  $CD45RO^+$  Th-Subpopulationen im peripheren Blut von gesunden Spendern zeigten sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Frequenzen der CD31-positiven und -negativen Populationen (Abb.11). Der Anteil von CD31-koexprimierenden Zellen in  $CD45RA^+$  Th-Zellen variiert stark zwischen den einzelnen Spendern und beträgt 30-75% ( $n=30$ ), wohingegen nur ein geringer Prozentsatz (ca.1-5%) der  $CD45RO^+$  Gedächtniszellen das CD31-Molekül ausprägt (Abb.11B und 11C).

### 3.1.3.2 Expression von CD31 auf $CD45RA^+$ Th-Zellen im Nabelschnurblut

Zur Analyse und Charakterisierung von humanen naiven Th-Zellen werden häufig Nabelschnurblut-Zellen verwendet (103, 104). Zunächst wurde der prozentuale Anteil von naiven  $CD45RA^+$  Th-Zellen und deren  $CD31^+$  und  $CD31^-$ -Subpopulationen aus isolierten  $CD4^+$  Nabelschnurblut-Zellen bestimmt und anschließend mit den Frequenzen der entsprechenden Zellpopulationen aus adultem peripheren Blut verglichen. Durch die durchflusszytometrische Analyse konnten folgende Frequenzen ermittelt werden: Die Mehrheit (ca.95%) der humanen neonatalen  $CD4^+$  T-Zellen im peripheren Blut sind phänotypisch durch eine starke Expression des  $CD45RA$ -Moleküls charakterisiert und wiederum ca. 95% dieser  $CD45RA^+$  Th-Zellen koexprimieren das  $CD31$ -Molekül (Abb.12).



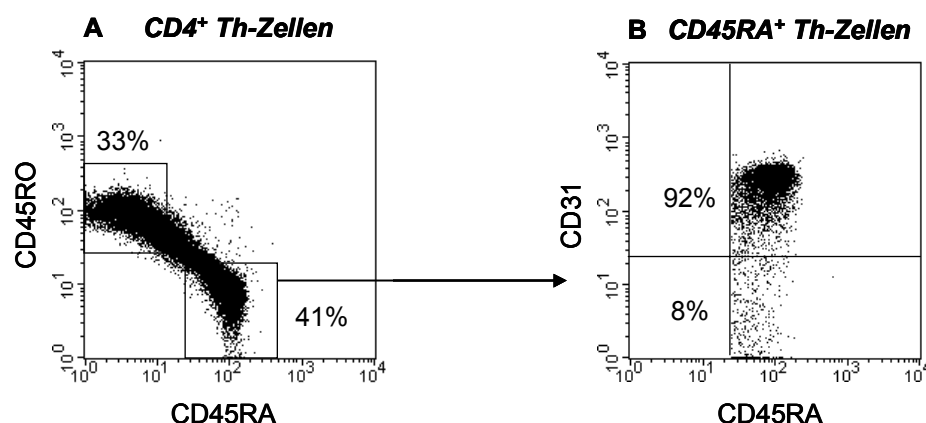
**Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von  $CD31$  auf  $CD45RA^+$  Th-Zellen im Nabelschnurblut.**

MACS-isolierte  $CD4^+$  neonatale Zellen wurden mit Antikörpern gegen  $CD45RA$ ,  $CD45RO$  und  $CD31$  markiert (A) und die  $CD45RA^+$   $CD45RO^-$  Th-Zellen auf die Expression von  $CD31$  untersucht (B).

### 3.1.3.3 Expression von CD31 auf CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im peripheren Blut von Patienten nach autologer Stammzelltransplantation

Bei der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie zur Immunrekonstitution bei Patienten nach autologer Stammzelltransplantation wurde u.a. auch eine phänotypische Untersuchung bezüglich der Expression der Oberflächenmarker CD45RA, CD45RO und CD31 auf peripheren CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durchgeführt. Bei diesem Therapieverfahren wird das „kranke“ Immunsystem der Patienten vermutlich durch eine Chemotherapie zerstört und anschließend werden zuvor isolierte körpereigene hämatopoetische Stammzellen durch Reinfusion zurückgegeben. Bis zu 6 Monate nach erfolgter Stammzelltransplantation gibt es keine naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im peripheren Blut der Patienten, erst nach 6-12 Monaten ist eine kontinuierlich ansteigende Anzahl von CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen beobachtbar.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass ca. 95% dieser „neuen“ CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen durch eine gleichzeitige Expression des CD31-Moleküls charakterisiert sind (n=6). In Abb.13 ist exemplarisch die Analyse der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines Patienten 10 Monate nach Therapie dargestellt. Somit sind die prozentualen Anteile von CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen (95%) im Blut der Patienten nach Transplantation vergleichbar mit den Frequenzen der entsprechenden Population im Nabelschnurblut (Abb.13B+12B).

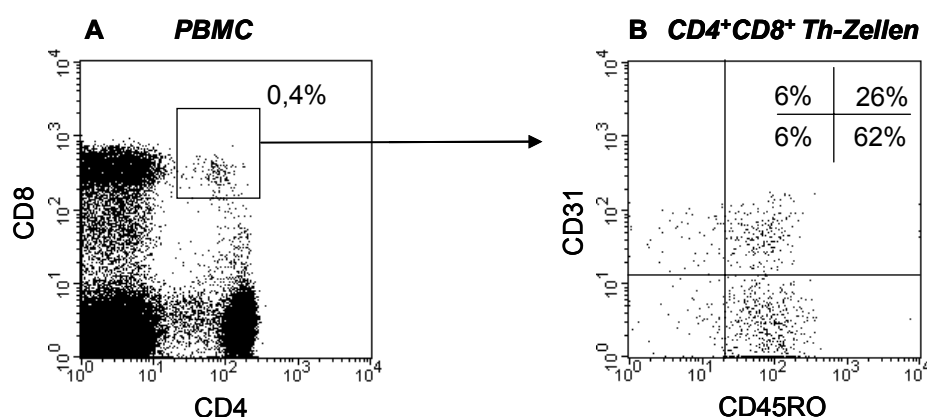


**Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD31 auf CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im peripheren Blut eines erwachsenen Patienten 9 Monate nach Erhalt einer autologen Stammzelltransplantation.**

MACS-isolierte CD4<sup>+</sup> Th-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO und CD31 markiert (A) und die CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen auf die Expression von CD31 untersucht (B).

### 3.1.3.4 Expression von CD31 auf peripheren CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die meisten T-Zellen, die aus dem Thymus auswandern sind entweder CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen. Es gibt jedoch auch einen sehr geringen Anteil (ca. 0,3-1% der PBMC) an „doppelt positiven“ CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut. Da in vielen Untersuchungen von naiven Th-Zellen in dieser Arbeit Analysefenster auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesetzt wurden oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut durch magnetische Zellseparation angereichert wurden, muss beachtet werden, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen einen, wenn auch sehr geringen Prozentsatz an CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen beinhalten. Aus diesem Grunde sollte auch die Expression der Oberflächenmarker CD45RA, CD45RO und CD31 auf CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert werden. Die phänotypische Untersuchung zeigte, dass mindestens 80% der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen die CD45RO-Isoform ausprägen und maximal 20% die CD45RA-Isoform exprimieren, wobei ca. die Hälfte der CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen das CD31-Molekül koexprimiert (n=3) (Abb.14).

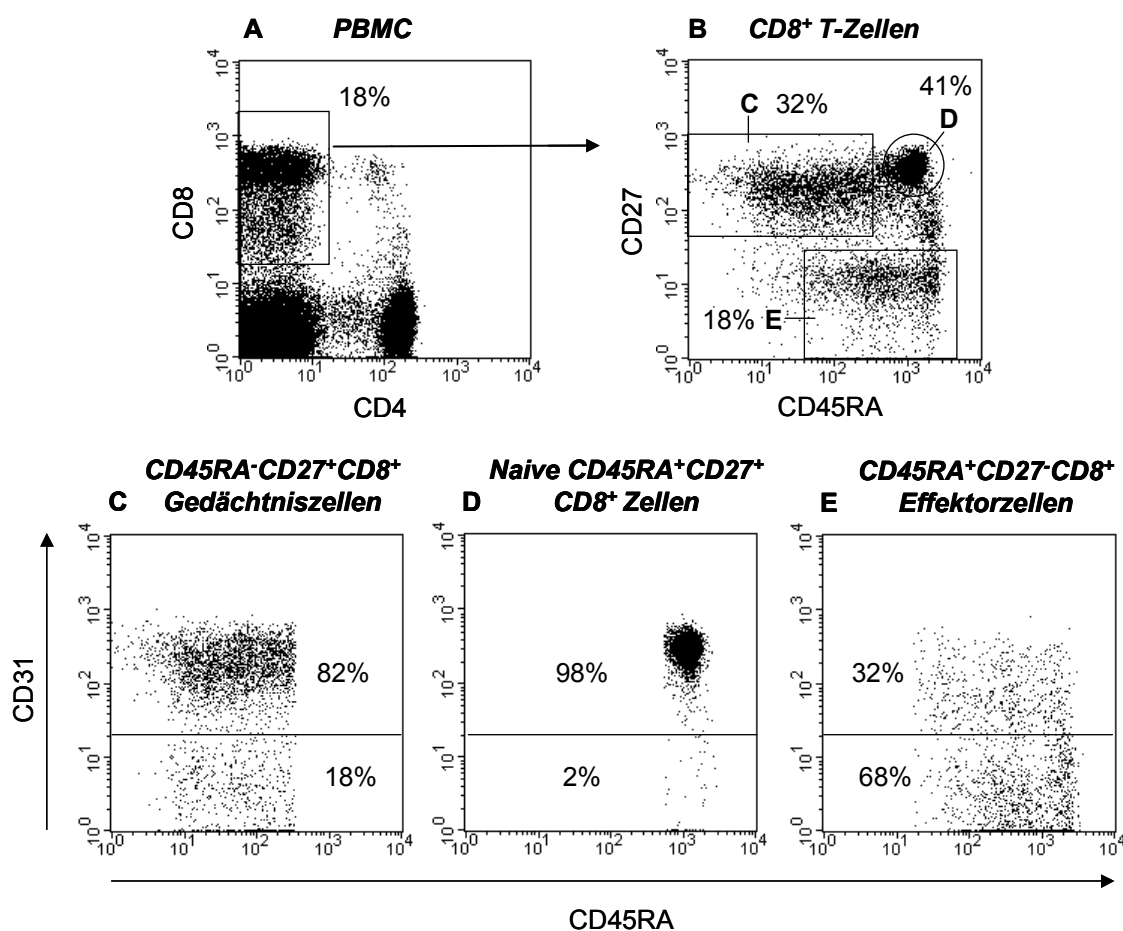


**Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD31 auf CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im adulten peripheren Blut.**

PBMC wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD45RO und CD31 markiert (A) und die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Expression von CD31 und CD45RO untersucht (B).

### 3.1.3.5 Expression von CD31 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich zytotoxische T-Zellen nicht durch die differentielle Expression des CD45-Moleküls in naive und Antigen-erfahrene CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden (105). Zur Unterscheidung und Analyse von naiven und Antigen-erfahrenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird der CD45RA-Rezeptor in Kombination mit dem CD27-Molekül verwendet.



**Abbildung 15:** Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD31 auf naiven CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> Effektorzellen und CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen.

PBMC wurden mit Antikörpern gegen CD8, CD4, CD45RA und CD27 markiert (A+B). Die CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen (C), naive CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (D) und CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> Effektorzellen (E) wurden auf die Expression von CD31 untersucht.

Ähnlich wie bei CD4<sup>+</sup> Th-Zellen variieren auch innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation die Anteile an naiven und Antigen-erfahrenen Gedächtnis- und Effektorzellen sehr stark zwischen den einzelnen Spendern: 30-80% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen des peripheren Blutes exprimieren CD45RA und CD27 (naive CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen), 1-30% prägen nur den CD45RA-Rezeptor auf ihrer Oberfläche aus (CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Effektorzellen) und 10-50% exprimieren nur den CD27-Rezeptor (CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen). Ca. 1-10% exprimieren weder CD27 noch CD45RA (n=4) (Abb.15A+B).

Die Abb.15C+D+E zeigen die durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD31 auf CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen, auf naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen und auf CD8<sup>+</sup> Effektorzellen im peripheren Blut eines gesunden Spenders. Die Mehrheit der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen (>90%) koexprimiert das CD31-Molekül, die Frequenz von CD31-positiven Zellen innerhalb der zytotoxischen Gedächtnis-T-Zellpopulation beträgt zwischen 50-80%, die Frequenz von CD31-positiven Zellen in CD8<sup>+</sup> Effektorzellen beträgt 20-50% (n=4).

### **3.1.3.6 Expression des CD31-Moleküls während der Konversion von naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen zu Antigen-erfahrenen CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen nach antigener oder mitogener *in vitro* Stimulation**

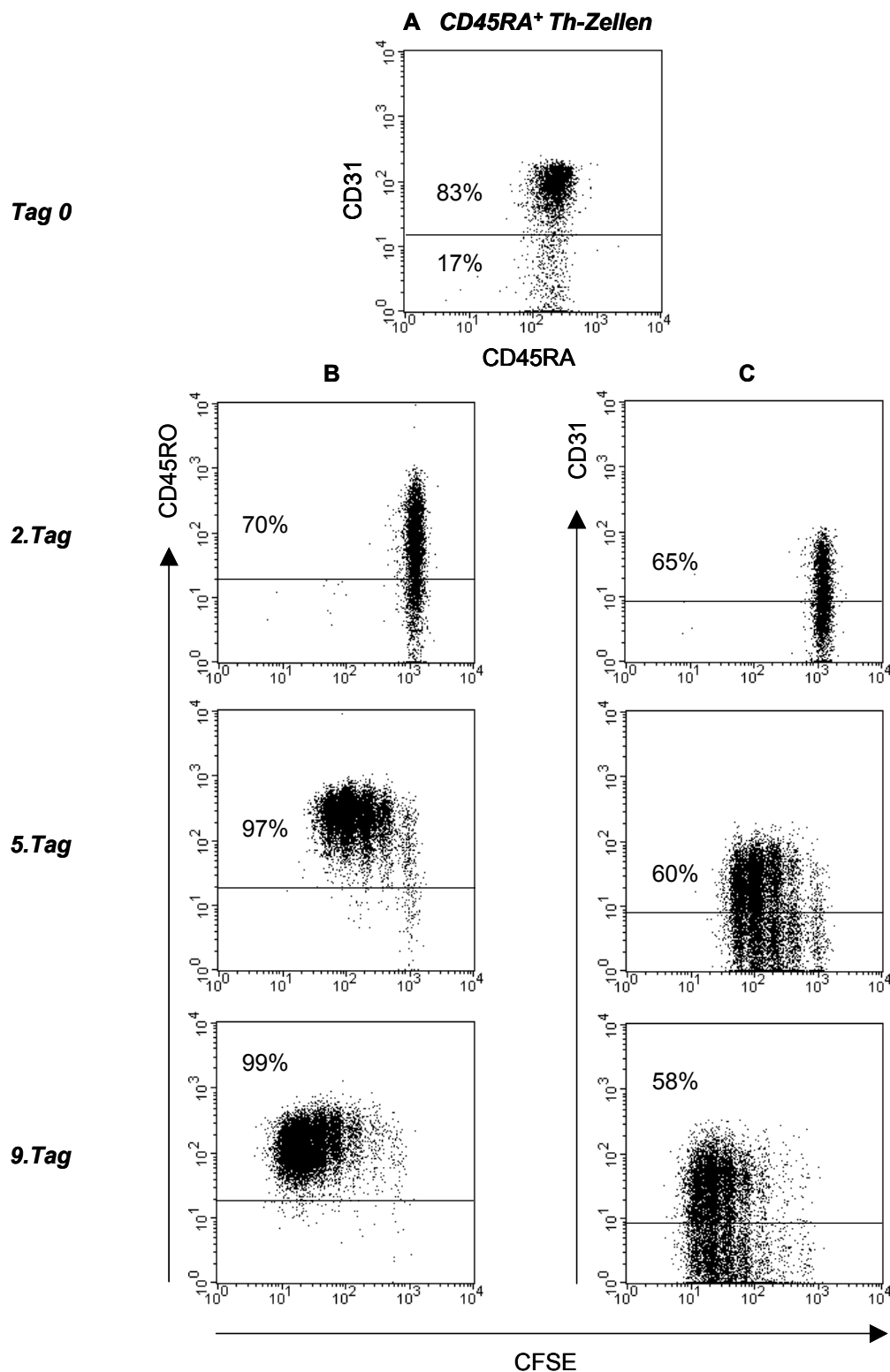
Nach antigener oder mitogener Aktivierung von naiven CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen findet eine Konversion zum Antigen-erfahrenen CD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellstadium statt (28, 29, 37). Die Mehrheit der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen und ungefähr die Hälfte der CD8<sup>+</sup> T-Zellen verlieren die Expression des CD31-Moleküls während dem Übergang von naiven Lymphozyten zu Gedächtnis-Lymphozyten (81, 106).

Wie in der Einleitung beschrieben sind zur Aktivierung von naiven Th-Zellen zwei durch APC vermittelte Signale essentiell. In vielen *in vitro*-Systemen wird daher zur Stimulation von T-Zellen eine Kreuzvernetzung des CD3-Moleküls, welches mit dem TCR assoziiert ist, und des CD28-Moleküls durch spezifische Antikörper induziert (107). Um die Regulation des CD31-Moleküls nach Aktivierung von naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen zu untersuchen, muss zunächst eine Population von naiven Th-Zellen isoliert werden. Hierzu habe ich im Rahmen meiner Diplomarbeit eine aus zwei Schritten bestehende magnetische Zellsortierung etabliert, mit der sich CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen aus PBMC in einer Reinheit von >98% isolieren lassen (siehe Kap.2.13.1.1 und 2.13.1.2). Zur Untersuchung der CD31-Expression nach Primärstimulation



wurden CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen aus PBMC von einem gesunden Spendern isoliert, anschließend mit CFDA-SE markiert und mit den immobilisierten  $\alpha$ CD3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern stimuliert. Mit Hilfe des membrangängigen CFDA-SE werden Zellen fluoreszenzmarkiert und Zellteilungen optisch detektierbar. Die Reinheit der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen betrug 99%, die der angereicherten CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen 98% (Reanalyse nicht gezeigt). Ca. 83% der angereicherten CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen sind vor Aktivierung CD31-positiv (Abb.16A). An Tag 2, 5 und 9 wurden Zellproben der Kultur entnommen, gegen CD31 und CD45RO markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Die in Abb.16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass nach Stimulation von CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen der Verlust des CD31-Moleküls erst nach der Konversion dieser Zellen zum CD45RO-Phänotyp erfolgt. Bereits zwei Tage nach T-Zell-Aktivierung exprimieren ca. 70% der zuvor naiven CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen die CD45RO-Isoform, wohingegen noch 65% das CD31-Molekül ausprägen. An Tag 5 haben sich nahezu alle Zellen (>95%) ein- bis viermal geteilt und exprimieren CD45RO, nur noch ca. 3% sind durch die Expression des CD45RA-Moleküls gekennzeichnet. An Tag 9 sind alle Zellen CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> (Abb.16B). Im Gegensatz hierzu nimmt die Expression von CD31 im gleichen Zeitraum nur sehr langsam und geringfügig ab, von 83% vor Aktivierung auf 65% an Tag 2, 60% an Tag 5 und 58% an Tag 9 (Abb.16C).



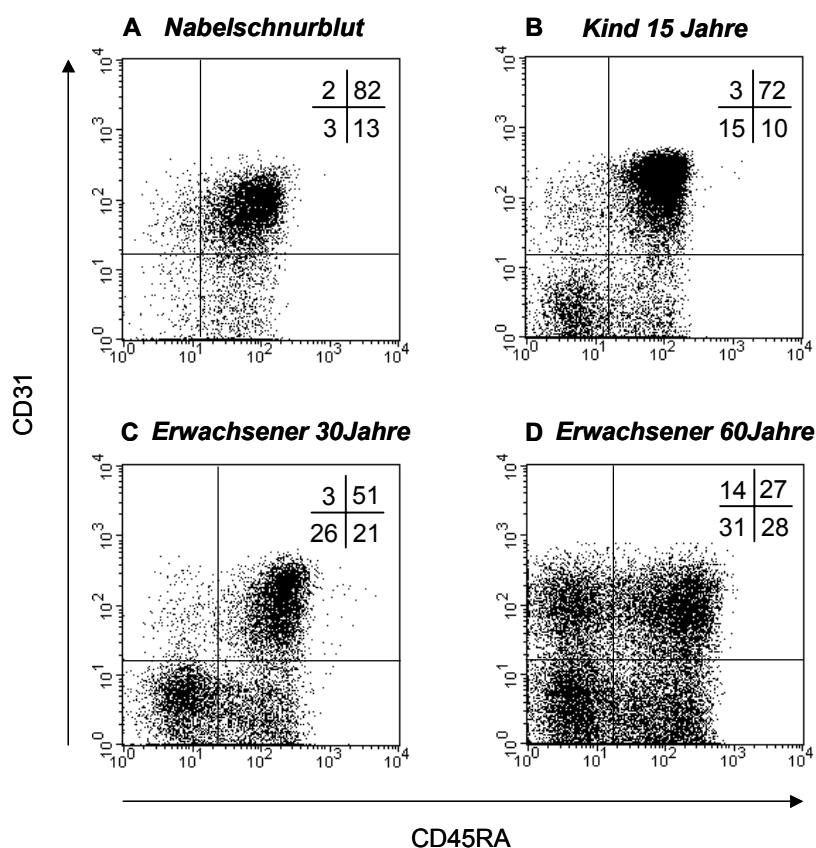
**Abbildung 16: Expression des CD45RO-Moleküls und des CD31-Moleküls nach Primärstimulation von naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen.**

CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen wurden mit CFDA-SE gefärbt und mit den immobilisierten  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28-Antikörpern stimuliert. Zellproben der Kulturen wurden am 2., 5. und 9. Tag entnommen, gegen CD31 und CD45RO markiert und im FACS analysiert. An Tag 0 ist die CD31-Expression innerhalb der isolierten CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellpopulation vor Stimulation dargestellt (A). In der linken Spalte ist die CD45RO-Expression (B), in der rechten Spalte die CD31-Expression (C) gegen das fluoreszierende CFSE der stimulierten Zellen an Tag 2, 5 und 9 gezeigt.

### 3.1.4 Bestimmung der Frequenzen von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Spender

Durch die in Kap. 3.1.3.1 – 3.1.3.3 beschriebenen Beobachtungen lässt sich feststellen, dass im peripheren Nabelschnurblut und im peripheren Blut von Patienten nach Stammzelltransplantation nur ein sehr geringer Anteil (<10%) der CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen gleichzeitig CD31-negativ sind. Somit sind CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen in höheren Frequenzen ausschließlich im adulten peripheren Blut detektierbar (Abb.11C, 12B, 13B). Bezüglich der Frequenz der CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im adulten peripheren Blut war außerdem ein starke Varianz zwischen den einzelnen Spendern (25-70%) auffällig (Kap. 3.1.3.1).

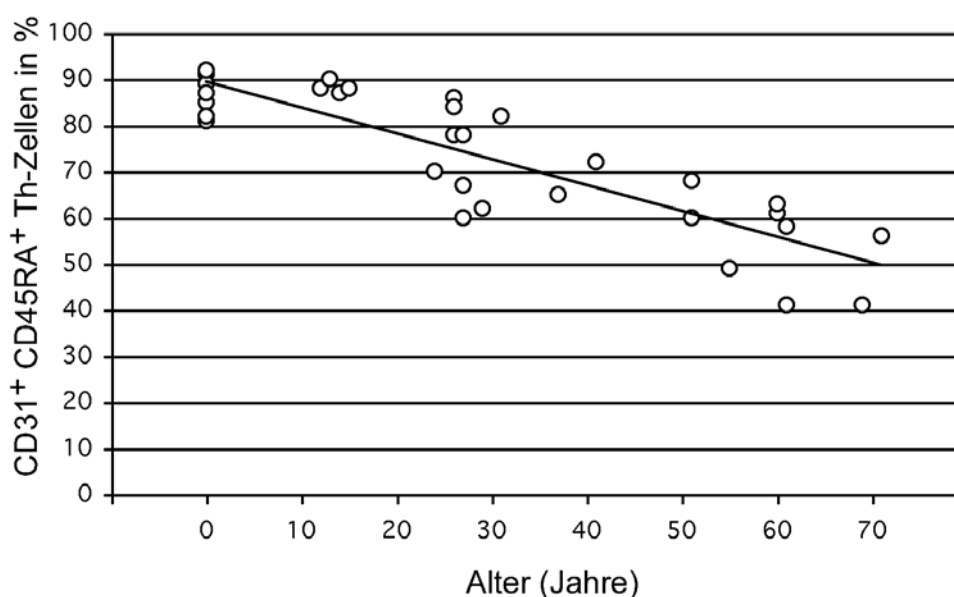
Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Frequenz von CD31-positiven Zellen auf naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und dem Alter der Spender besteht.



**Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD31 und CD45RA auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im peripheren Blut von vier Spendern verschiedener Altersstufen.**

MACS-isolierte CD4<sup>+</sup> Th-Zellen (Reinheit > 99%) von vier Spendern verschiedenen Alters (0, 15, 30 und 60 Jahre) wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO und CD31 markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben sind die Frequenzen der CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen.

Zur Untersuchung wurden hierfür  $CD4^+$  Th-Zellen aus Nabelschnurblut, aus peripherem Blut von Kindern und aus peripherem Blut von gesunden Erwachsenen unterschiedlichen Alters (bis 70 Jahre) zu hoher Reinheit isoliert und mit fluoreszenten Antikörpern, die spezifisch an CD45RA, CD45RO und CD31 binden, markiert. Nach durchflusszytometrischer Analyse der  $CD4^+$  Th-Zellen der einzelnen Spender (Abb.17) konnten dann die Frequenzen der  $CD45RA^+$  Th-Zellen, die CD31 koexprimieren in Abhängigkeit vom Alter der Spender bestimmt werden (Abb.18).



**Abbildung 18: Frequenz der  $CD31^+$  Zellen innerhalb der  $CD45RA^+$  Th-Zellpopulation in Abhängigkeit des Alters der Spender.**

$CD4^+$  Th-Zellen (Reinheit > 99%) wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO und CD31 markiert und die  $CD45RA^+$   $CD45RO^-$  Th-Zellen auf die Expression von CD31 analysiert. Die Punkte stellen die relative Frequenz der  $CD31^+$  Zellen innerhalb der  $CD45RA^+$  Th-Zellpopulation in den einzelnen Proben dar. Gezeigt ist die lineare Regressionsgerade. Es existiert eine starke negative Korrelation zwischen dem Alter und der relativen Frequenz der  $CD31^+$  Zellen innerhalb der  $CD45RA^+$  Th-Zellpopulation ( $r = -0,875$ ).

Abb.18 veranschaulicht, dass während des Alterns eine deutliche Änderung hinsichtlich der CD31-Expression auf  $CD45RA^+$  Th-Zellen stattfindet. Der Prozentsatz an  $CD31^+$  Zellen innerhalb der  $CD45RA^+$  Th-Zellen ist mit 90% im Nabelschnurblut und 85-90 % in Kindern sehr hoch und nimmt mit zunehmendem Alter über 60-80 % in 20- bis 30-Jährigen bis auf 40-60 % in über 60-Jährigen konstant ab. Zusätzlich dargestellt ist die zugehörige lineare Regressionsgerade, der

Wert des Korrelationskoeffizienten ( $r=-0,875$ ) verdeutlicht einen starken negativen Zusammenhang zwischen dem Alter der Spender und der Frequenz der  $CD31^+$  Zellen innerhalb der  $CD45RA^+$  Th-Zellen.

Im gleichen Maße wie die Frequenz der peripheren  $CD31^+$   $CD45RA^+$  Th-Zellen mit zunehmendem Alter abnimmt, konnte auch ein dementsprechender altersabhängiger Anstieg der Frequenz von  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen beobachtet werden.

Es sind mehrere Möglichkeiten für diese altersabhängigen Veränderungen denkbar. Die Frequenzerhöhung der peripheren  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen mit zunehmendem Alter könnte eine Zunahme von Gedächtnis- und Effektor-Th-Zellen widerspiegeln, welche zum naiven  $CD45RA$ -Phänotyp rekonvertiert sind. Als zweite Möglichkeit ist vorstellbar, dass die ansteigenden Frequenzen der  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen naive Th-Zellen repräsentieren, die in der Peripherie proliferiert sind.

### **3.2 Phänotypische, funktionelle und molekulare Analysen von $CD31^+$ und $CD31^-CD45RA^+$ Th-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern**

#### **3.2.1 Phänotypische Analyse von $CD31^+$ und $CD31^-CD45RA^+$ Th-Zellen**

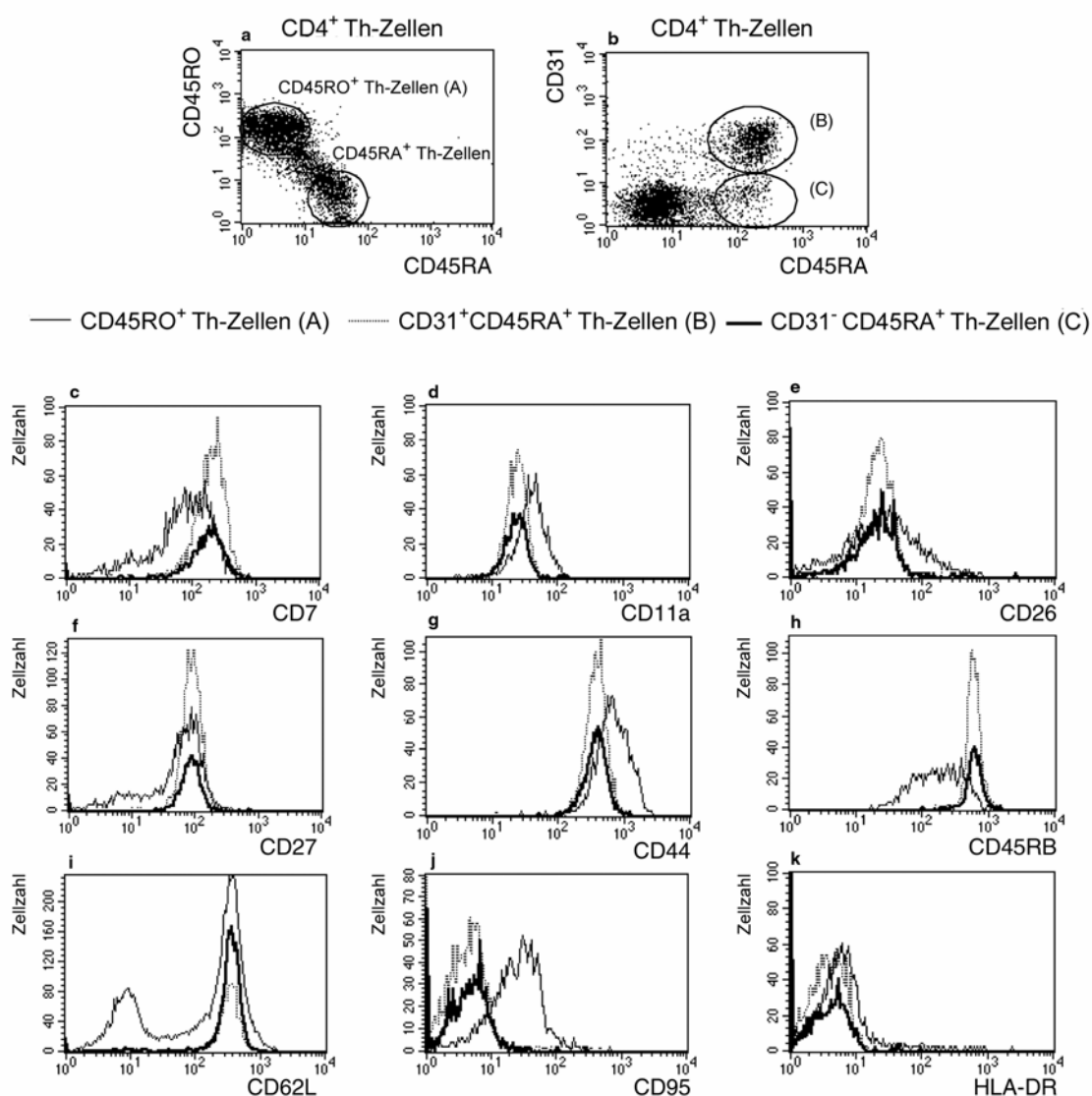
Das früher gültige Konzept der irreversiblen phänotypischen Konversion von naiven  $CD45RA^+$  Zellen nach deren Aktivierung zu  $CD45RO^+$  Zellen wurde durch mehrere Veröffentlichungen für  $CD4^+$  Th-Zellen in Frage gestellt (siehe Einleitung Kap.1.5). Um zu untersuchen, ob die mit dem Alter zunehmenden  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen Antigen-erfahrene Th-Zellen darstellen, welche den naiven  $CD45RA$ -Rezeptor re-exprimieren wurde eine phänotypische Analyse der  $CD31^+$  und  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zell-Subpopulationen durchgeführt. Hierbei wurde die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern auf den  $CD45RA^+$  Th-Zell-Subpopulationen analysiert, die verwendet werden, um Antigen-erfahrene Th-Zellen, die trotzdem  $CD45RA$  exprimieren zu identifizieren und die zur Unterscheidung von naiven und Antigen-erfahrenen Th-Zellen aufgrund ihres Differenzierungs- und Aktivierungszustandes herangezogen werden (siehe Einleitung, Tab.1).

PBMC wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen  $CD4$ ,  $CD45RO$ ,  $CD31$  und jeweils einem der folgenden Oberflächenmarker (im jeweiligen Histogramm angegeben) markiert:  $CD7$ ,  $CD11a$ ,  $CD26$ ,  $CD27$ ,  $CD44$ ,  $CD45RB$ ,  $CD62L$ ,  $CD95$ ,  $HLA-DR$  und durchflusszytometrisch analysiert. Exemplarisch ist hier für einen gesunden Spender die phänotypische Charakterisierung der  $CD31^+$  und  $CD31^-$

CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen dargestellt (Abb.19), insgesamt wurden drei gesunde Blutspender untersucht.

51% der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen des hier untersuchten Spenders exprimieren ausschließlich CD45RO, 33% sind CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und ca. 16% bilden eine Übergangspopulation (CD45RO<sup>low</sup>/CD45RA<sup>low</sup> Th-Zellen) (Abb.19a). Die Frequenz der CD31<sup>+</sup> Th-Zellen innerhalb der CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellfraktion liegt bei 75% (Abb.19b). Die Histogramme (c-k) zeigen deutlich, dass CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen (starke Linie C) den gleichen naiven Phänotyp wie CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen (gestrichelte Linie B) aufweisen. Beide CD45RA-Subpopulationen zeigen keine erhöhte Expression von CD44 und CD11a und sind CD45RB positiv. Sowohl CD31<sup>-</sup> als auch CD31<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren weder das CD95-Molekül noch HLA-DR. Nur sehr geringe Frequenzen (<1%) der CD31<sup>-</sup> Th-Zellen waren durch einen CD27<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup> -Phänotyp charakterisiert und repräsentieren somit eine sehr kleine Zellpopulation von Antigen-erfahrenen Gedächtnis- und Effektor- Th-Zellen, die das CD45RA-Molekül reexprimieren. Die CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Th-Zellen (feine Linie A) weisen ein typisches Antigen-erfahrenes Expressionsmuster auf. Sie sind CD95<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD45RB<sup>low</sup> und exprimieren verstärkt CD44 und CD11. Ca. 50% der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen exprimieren das CD26-Molekül und mehr als die Hälfte der Zellen ist CD7<sup>-</sup>. Weiterhin hat ein Teil der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen die Expression von CD62L und CD27 verloren (CD27<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen: 15%, CD62L<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen: ca.30%).

Diese Daten zeigen, dass beide CD45RA<sup>+</sup> Th-Subpopulationen phänotypisch betrachtet aufgrund ihres Differenzierungs- und Aktivierungszustandes zu den naiven Th-Zellen gehören.



**Abbildung 19: Phänotypische Charakterisierung der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen bei einem gesunden Spender.**

PBMC wurden in (a und b) mit fluoreszenten Antikörpern gegen CD4, CD45RA, CD45RO und CD31 markiert und in (c-k) mit fluoreszenten Antikörpern gegen CD4, CD45RO, CD31 und jeweils einem der folgenden Oberflächenmoleküle: CD7 (c), CD11a (d), CD26 (e), CD27 (f), CD44 (g), CD45RB (h), CD62L (i), CD95 (j), HLA-DR (k) markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Die „dot-plots“ zeigen die Expression von CD45RA, CD45RO und CD31 auf peripheren CD4<sup>+</sup> Th-Zellen (a und b). Die Histogramme (c-k) zeigen die Expression der o.g. Oberflächenmoleküle auf CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen (feine Linie A), CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen (gestrichelte Linie B) und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen (starke Linie C). Für die Expressionsanalyse der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen wurden Analysefenster auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen gesetzt, für die Expressionsanalyse der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen wurden Analysefenster auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen gesetzt. Somit ist gewährleistet, dass die Übergangspopulation der CD45RO<sup>low</sup>/CD45RA<sup>low</sup> Th-Zellen von der Analyse der CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen ausgeschlossen wird.

### **3.2.2 Analyse der Zytokinproduktion von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen nach polyklonaler *in vitro* Stimulation**

Aufgrund der in Kap. 3.1.4 beschriebenen Beobachtungen wurden parallel zur phänotypischen Analyse auch Versuche durchgeführt, die potentielle funktionelle Unterschiede zwischen CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen aufdecken können. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen existieren, für die Effektorfunktionen nachgewiesen werden können.

Naive Th-Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung zunächst nur IL-2, während Antigen-erfahrene Th-Zellen nach Stimulation neben IL-2 zusätzlich Effektorzytokine exprimieren (25, 26). Um die Zytokinexpression von CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen gesunder Spender nach deren Aktivierung zu untersuchen, wurde ein direkter Vergleich des Zytokinpotentials der beiden CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen nach PMA/Ionomycin-Stimulation durchgeführt.

#### **3.2.2.1 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen mittels der magnetischen Mehrparameter-Zellsortierung**

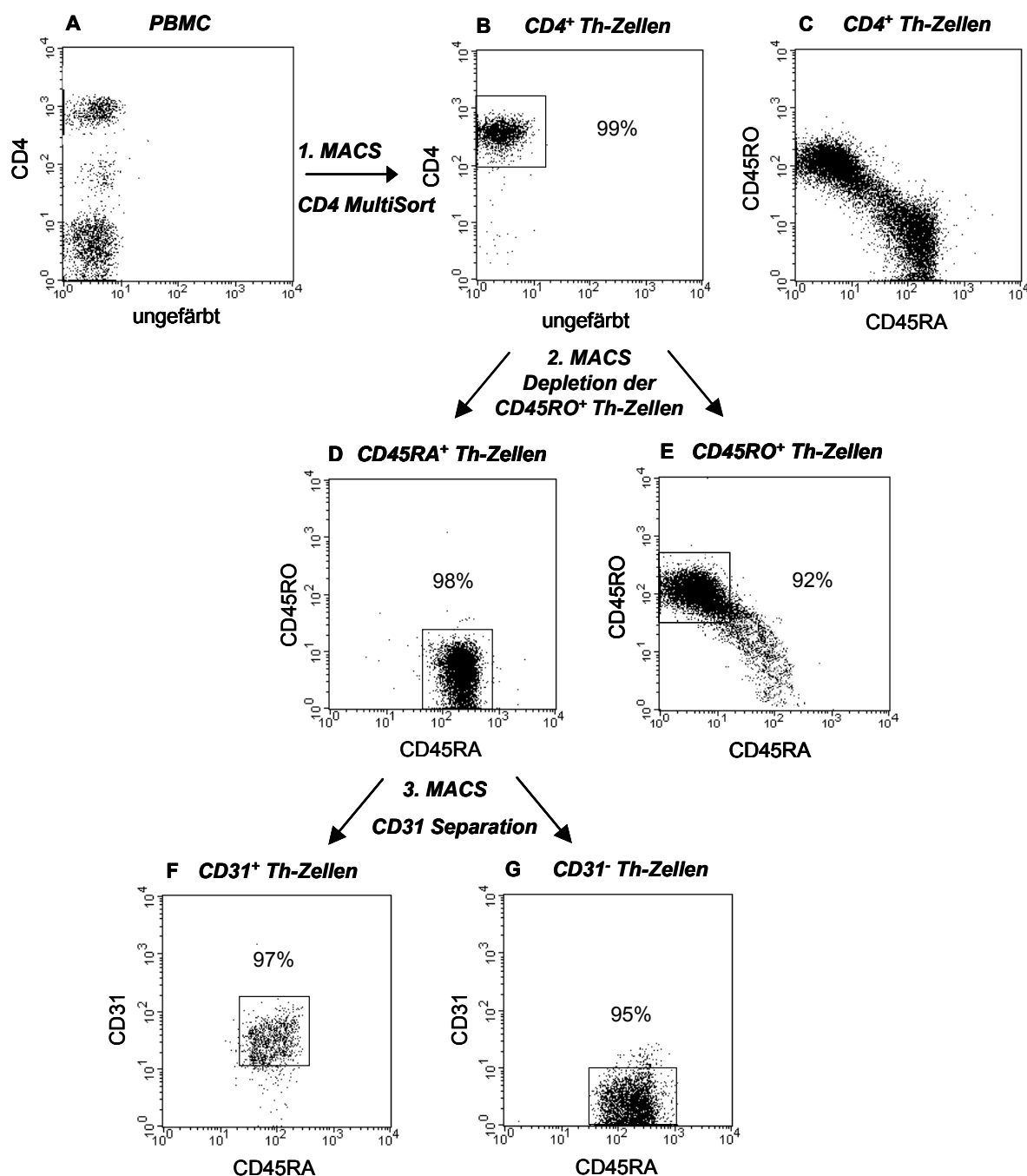
Die Analyse des Zytokinpotentials der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellpopulationen und der CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Th-Zellen nach Aktivierung erfordert sowohl die Trennung der naiven Th-Zellen von den Antigen-erfahrenen Th-Zellen und den zytotoxischen T-Zellen als auch die Separation der beiden CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen, um jede mögliche gegenseitige Beeinflussung dieser Zellpopulationen auszuschließen.

Zur Isolierung der Th-Zellpopulationen wurden in dieser Arbeit zwei Möglichkeiten genutzt: Die Anreicherung der Zellfraktionen mittels der magnetischen Mehrparameter-Zellsortierung (im folgenden aufgeführt) und die Anreicherung mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) (in Kap.3.2.4.1 beschrieben).

Mit Hilfe der magnetischen Mehrparameter-Zellsortierung können Zellen in mehreren aufeinanderfolgenden magnetischen Sortierungsschritten nach verschiedenen Oberflächenmarkern getrennt werden. Wie in Kap. 2.13.1.1 und 2.13.1.2 beschrieben wurden die CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen und die CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Th-Zellen (durch CD4<sup>+</sup>-Anreicherung und CD45RO<sup>+</sup>-Depletion) isoliert und zusätzlich ein dritter Separationsschritt, die Trennung von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen, durchgeführt. Dabei wurden die CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen mit Fitc-gekoppeltem  $\alpha$ CD31



markiert und anschließend mit magnetischen  $\alpha$ -Fic-Partikeln inkubiert. Die somit indirekt mit Microbeads markierten  $CD45RA^+$  Th-Zellen wurden dann zweimal über eine VS-Säule magnetisch getrennt.



**Abbildung 20: Isolierung von  $CD31^+$  und  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen und  $CD45RO^+$  Th-Zellen mittels der MACS-Technik.**

Aus PBMC (A) wurden im ersten magnetischen Sortierungsschritt  $CD4^+$  Th-Zellen angereichert (B+C). Nach enzymatischer Ablösung der magnetischen Partikel erfolgte in einer zweiten magnetischen Separation die Isolierung der  $CD45RA^+$  Th-Zellen (D) und der  $CD45RO^+$  Th-Zellen (E) durch Depletion der  $CD45RO^+$  Th-Zellen. Durch einen dritten Separationsschritt wurden  $CD31^+$  und  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen isoliert (F+G).

Die hier etablierte Isolierungsmethode für Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> Th-Zellen führt zu hohen Reinheiten (Reinheit der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen >99%, Reinheit der CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen >98%, Reinheit der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen >92%, Reinheit der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Subpopulationen ca. 97% bzw. 95%) und schließt nahezu vollständig das Vorkommen von CD45RO<sup>+</sup> Effektor-Th-Zellen in den CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> Th-Zell-Subpopulationen aus. Um die Reinheit der Zellpopulationen zu überprüfen, wurden bei allen Separationen Zellproben der unseparierten Ausgangsfraction sowie Proben nach jedem der drei aufeinanderfolgenden Sortierungsschritte entnommen und durch Antikörper gegen die entsprechenden Oberflächenmarker durchflusszytometrisch kontrolliert. In Abb.20 ist ein repräsentatives Beispiel einer FACS-Kontrolle der drei magnetischen Sortierungsschritte gezeigt.

### **3.2.2.2 Zytokinpotential von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen nach polyklonaler *in vitro* Stimulation**

Zur Analyse des Zytokinpotentials der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> Th-Zell-Subpopulationen nach polyklonaler Stimulation wurden die beiden Fraktionen von verschiedenen gesunden Spendern wie unter Kap. 3.2.2.1 beschrieben zu hoher Reinheit isoliert. Zusätzlich wurde die erhaltene positive Fraktion der Depletion, die CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellpopulation isoliert. Die drei isolierten CD4<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen wurden direkt mit PMA und dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin für sechs Stunden stimuliert und anschließend fixiert. Die polyklonale PMA/Ionomycin-Stimulation ermöglicht *in vitro* das Abrufen des Zytokinpotentials von T-Zellen. Die fixierten Zellen wurden intrazellulär mit Antikörpern gegen IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Insgesamt wurden CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und die entsprechenden CD45RO<sup>+</sup> Effektor- und Gedächtniszellen von vier gesunden Blutspendern untersucht, von weiteren vier Spendern wurde nur ein Vergleich von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen aufgestellt (Tab.6). Abb.21 zeigt zwei repräsentative Ergebnisse aus diesen Analysen.

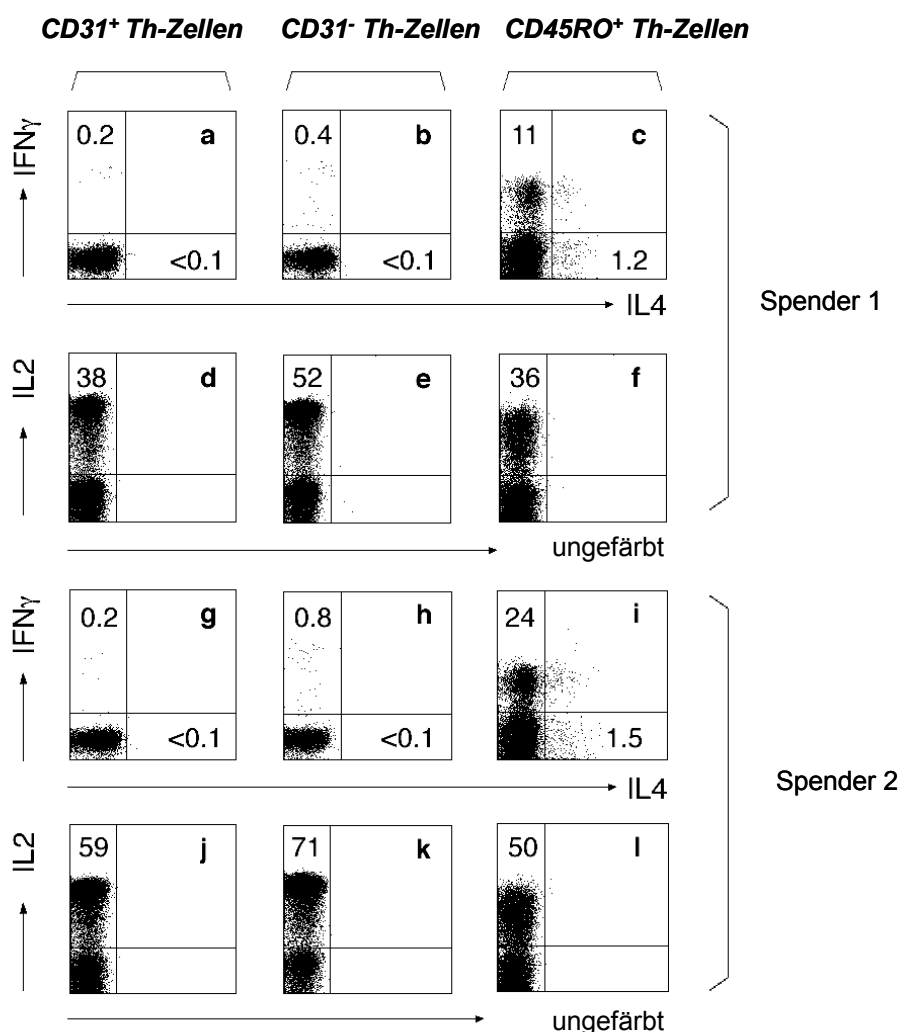
**Tabelle 6: Zytokinexpression von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen nach polyklonaler *in vitro* Stimulation.**

Angegeben sind die Prozentangaben der Zytokin-positiven Zellen innerhalb der Th-Zell-Subpopulationen der acht Spender.

<i>Spender</i>	<i>Zytokin</i>	<i>CD31<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup></i> <i>Th-Zellen</i>	<i>CD31<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup></i> <i>Th-Zellen</i>	<i>CD45RO<sup>+</sup></i> <i>Th-Zellen</i>
<b>1</b> (Abb.21)	IL-2	38	52	36
	IFN- $\gamma$	0.2	0.4	11
	IL-4	<0.1	<0.1	1.2
<b>2</b> (Abb.21)	IL-2	59	71	50
	IFN- $\gamma$	0.2	0.8	24
	IL-4	<0.1	<0.1	1.5
<b>3</b>	IL-2	39	55	55
	IFN- $\gamma$	0.8	0.8	20
	IL-13	<0.1	<0.1	3.2
<b>4</b>	IL-2	53	52	76
	IFN- $\gamma$	0.2	0.9	24
	IL-13	0.1	0.2	5.4
<b>5</b>	IL-2	50	52	--
	IFN- $\gamma$	0.4	0.2	--
	IL-4	0.3	0.3	--
<b>6</b>	IL-2	54	50	--
	IFN- $\gamma$	0.7	0.4	--
	IL-4	<0.1	<0.1	--
<b>7</b>	IL-2	41	49	--
	IFN- $\gamma$	0.3	0.4	--
	IL-4	<0.1	<0.1	--
<b>8</b>	IL-2	37	51	--
	IFN- $\gamma$	0.3	0.7	--
	IL-4	<0.1	<0.1	--

Sowohl in der CD31-angereicherten, als auch in der CD31-depletierten Fraktion, konnten hohe Frequenzen von IL-2-Produzenten detektiert werden, allerdings war bei sechs der acht Spender die Frequenz unter den CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen durchschnittlich 11% (Varianz 2%-16%) höher im Vergleich zu den CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen des gleichen Spenders. Weiterhin waren in beiden CD45RA<sup>+</sup> Th-Subpopulationen aller Spender nur sehr geringe Frequenzen von IFN- $\gamma$ -Produzenten (<1%) zu beobachten. Die Frequenzen der IL-4-positiven Zellen und der IL-13-

Produzenten waren in beiden Subpopulation mit  $\leq 0,3\%$  und  $< 0,2\%$  noch geringer (Tab.6, Abb.21). Im Gegensatz zu den CD45RA<sup>+</sup>-Th-Subpopulationen exprimierten 11 - 24% der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen das Th1-Effektorzytokin IFN- $\gamma$ , 1,2 - 1,5% das Th2-Effektorzytokin IL-4 und 3,2 - 4,5% das Th2-Effektorzytokin IL-13. Die Frequenz der IL-2 produzierenden Zellen lag bei 36% - 76%.



**Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen nach polyklonaler *in vitro* Stimulation.**

CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen wurden wie mit Hilfe der MACS-Technik aus PBMC gesunder Spender isoliert und direkt im Anschluss für 6h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Brefeldin A wurde nach 2h hinzugefügt. Nach Fixierung wurden die Zellen intrazellulär gegen die Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 mit Antikörpern gefärbt und die Frequenzen der intrazellulären Zytokinproduzenten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Frequenzen der Zytokin-positiven Zellen werden in den jeweiligen dot-plots in % angegeben.

In der durchgeführten Analyse der Zytokinproduktion nach direkter polyklonaler Stimulation konnten somit keine CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen mit Effektorfunktionen detektiert werden.

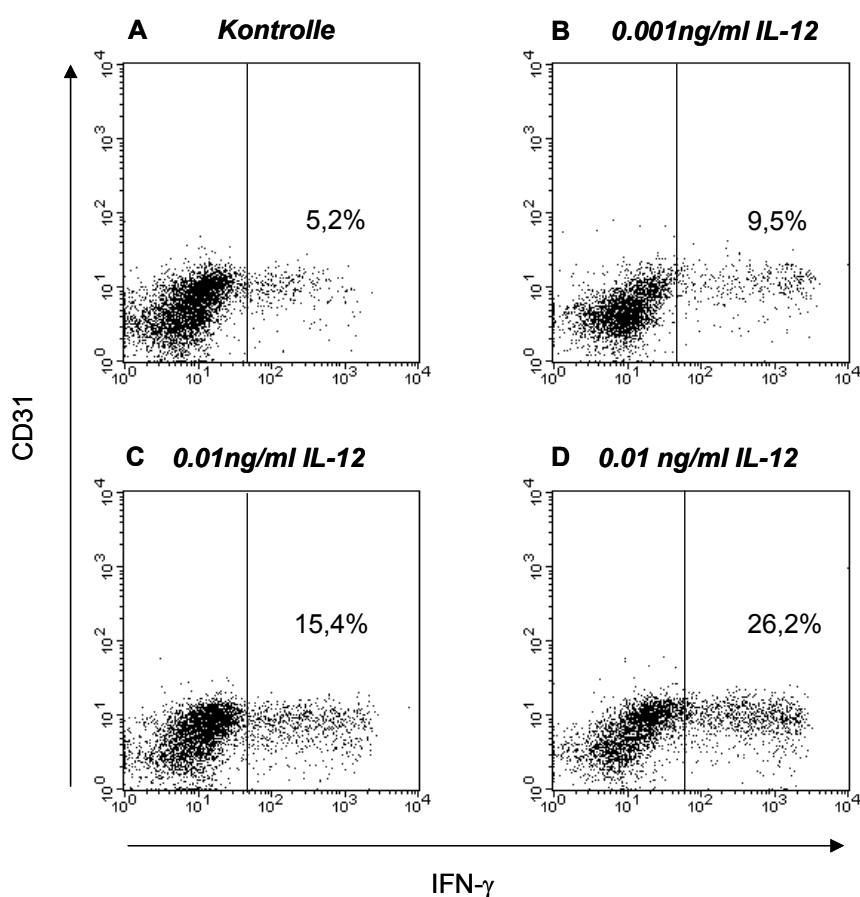
### **3.2.3 *In vitro* Polarisierung von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen zu proinflammatorischen Th-Zellen**

Im nächsten Schritt sollte ein weiteres Charakteristikum von naiven Th-Zellen, die Differenzierungsfähigkeit zu Th1-Zellen, untersucht werden. Wenn naive Th-Zellen über TCR-Ligation und Kostimulation aktiviert werden, können sie durch zusätzliche Differenzierungssignale wie z.B. IL-12 auf die Produktion von Th1-Effektorzytokinen wie z.B. IFN- $\gamma$  geprägt werden (siehe Kap.1.4).

Um potentielle funktionelle Unterschiede bezüglich der Differenzierungsfähigkeit von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen aufzudecken, sollte durch Analysen des Zytokinexpressionsmusters geklärt werden, ob und mit welcher Stärke eine *in vitro* Polarisierung der separierten CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellpopulationen zu proinflammatorischen Th-Zellen induzierbar ist.

In vorausgegangen Experimenten meiner Diplomarbeit und der Doktorarbeit von A. Hering wurde ein *in vitro* Stimulationssystem zur Aktivierung von aus adultem Blut isolierten naiven Th-Zellen etabliert. Dabei wurden die für Proliferation und Expansion von naiven Th-Zellen optimalen Bedingungen bezüglich Antikörper- und Zytokinkonzentrationen, Zytokinkombinationen und Restimulationszeitpunkt ermittelt. Zur Induktion und Analyse der Effektor- Zytokinexpression von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen nach deren Aktivierung wurden die Populationen wie in Kap.3.2.2.1 beschrieben aus PBMC von gesunden Spendern isoliert. Angereicherte und depletierte CD31-Zellpopulationen wurden unter Th1-polarisierenden Bedingungen (in Anwesenheit von  $\alpha$ IL-4 und IL-2 und unterschiedlichen IL-12-Konzentrationen 0,001ng/ 0,01ng/ 0,1ng) mit den immobilisierten  $\alpha$ CD3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern stimuliert. Nach fünf Kulturtagen erfolgte die Restimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär gegen das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  gefärbt. Zur Kontrolle wurde parallel je ein Ansatz nur unter  $\alpha$ IL-4-Zugabe und IL-2-Zugabe ohne IL-12 durchgeführt.

Durch die IL-12-Titration sollte festgestellt werden, ob bereits voraktivierte Zellen unter den CD31<sup>-</sup> Th-Zellen existieren, die nach Zugabe von geringen IL-12-Konzentrationen im Vergleich zu CD31<sup>+</sup> Th-Zellen höhere Frequenzen von IFN- $\gamma$ -Produzenten aufweisen. Insgesamt wurden sieben gesunde Spender unterschiedlicher Altersstufen analysiert. In Abb.22 ist am Beispiel eines Spenders die durchflusszytometrische Analyse der CD31<sup>-</sup> Th-Zellen nach IL-12-Titration dargestellt.



**Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse der IFN- $\gamma$ -Expression von CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen nach IL-12-Titration.**

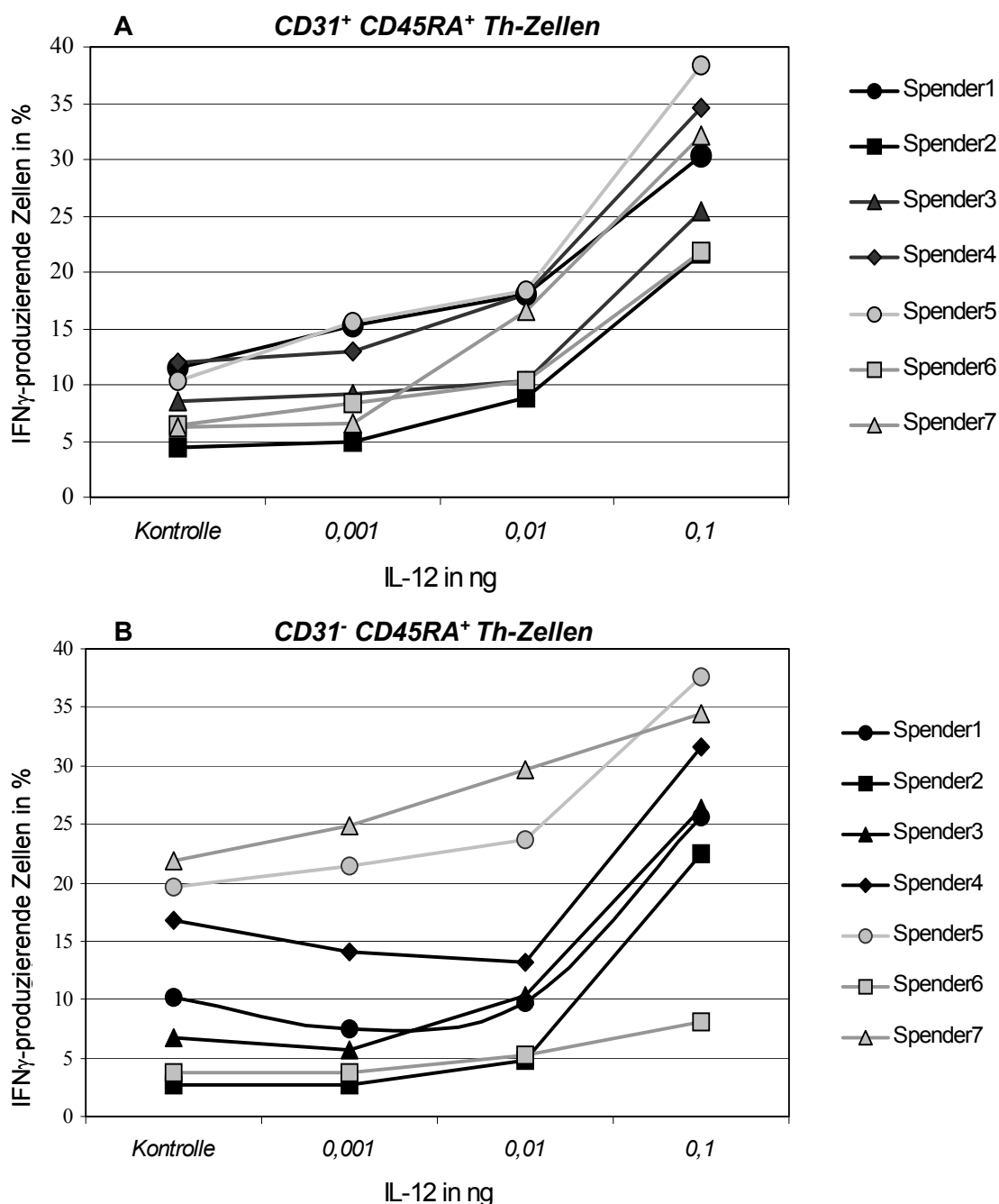
CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen wurden unter Th1-polarisierenden Bedingungen mit drei verschiedenen IL-12-Konzentrationen (0,001- 0,01- 0,1 ng) stimuliert. Nach fünf Kulturtagen wurden die Zellen aus der Kultur genommen, für 6h mit PMA/Ionomycin inkubiert (unter Anwesenheit von Brefeldin A in den letzten 2h), fixiert, permeabilisiert, intrazellulär gegen IFN- $\gamma$  gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen des Kontrollansatzes und der drei Titrationsstufen in den mit CD31<sup>-</sup> Th-Zellen initiierten Kulturen.

Abb.23 zeigt, dass beide  $CD45RA^+$  Th-Subpopulationen aller Spender ein ähnliches Induktionsverhalten aufweisen, d.h. die Frequenz der  $IFN-\gamma$ -Produzenten in den mit  $CD31^+$  Th-Zellen initiierten Kulturen (Abb.23A) und der Anteil der  $IFN-\gamma$ -produzierenden Zellen in den mit  $CD31^-$  Th-Zellen initiierten Kulturen (Abb.23B) nehmen mit steigender IL-12-Konzentration zu. Schon die Zugabe sehr geringer IL-12-Konzentrationen (0,001ng) war für die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort sowohl in die  $CD31^+$  als auch in  $CD31^- CD45RA^+$  Th-Zellen ausreichend. Ausnahmen sind die  $CD31^-$  Th-Zellen von drei Spendern. Bei Spender 1 und 3 nimmt die Frequenz der  $IFN-\gamma$ -Produzenten bei der geringsten IL-12-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollansätzen ab, bei Spender 4 nimmt die Frequenz der  $IFN-\gamma$ -Produzenten bei zwei getesteten IL-12-Konzentrationen ab.

Trotz des generell sehr ähnlichen Kurvenverlaufs der beiden  $CD45RA^+$  Th-Zell-Subpopulationen sind auch erhebliche Unterschiede zwischen den Ansätzen der  $CD31^+$  und  $CD31^-$  Th-Zellen beobachtbar. Die  $CD31^-$  Th-Zellen der sieben verschiedenen Spender zeigten eine hohe Varianz bezüglich der  $IFN-\gamma$ -Expression in den Kontrollansätzen (3-22%) und in allen drei Th1-Polarisierungskulturen (Abb.23B: 0,001ng IL-12: 4-25%, 0,01ng IL-12: 5-30%, 0,01ng IL-12: 8-38%). Im Gegensatz hierzu war die Variabilität zwischen den Spendern in den Kulturen der  $CD31^+$  Th-Zellen sowohl in den Kontrollansätzen als auch in den Th1-Polarisierungskulturen sehr viel geringer (Abb.23A: Kontrolle: 4-12%, Th1- Kulturen: 0,001ng IL-12: 7-15%; 0,01ng IL-12 9-18%; 0,1ng IL-12: 22-38%).

Vergleicht man die Frequenz der  $IFN-\gamma$ -exprimierenden Zellen von  $CD31^+$  und  $CD31^- CD45RA^+$  Th-Zellen innerhalb eines Spenders lassen sich bei manchen Spendern schon in den Kontrollansätzen große Unterschiede feststellen (Spender 5-7). Aus diesem Grunde wurde die prozentuale Steigerung des Anteils der  $IFN-\gamma$ -Produzenten berechnet, wobei der Anteil der  $IFN-\gamma$ -Produzenten des Kontrollansatzes gleich 100% gesetzt wurde. Abb.24 zeigt die prozentuale Steigerung des Anteils der  $IFN-\gamma$ -positiven Zellen der  $CD31^+$  und  $CD31^- CD45RA^+$  Th-Zellen der einzelnen Spender. Alle Spender weisen signifikante Unterschiede bei mindestens einer der 3 untersuchten IL-12-Konzentrationen zwischen  $CD31^+$  und  $CD31^- CD45RA^+$  Th-Zellen auf. Die Frequenzen der  $IFN-\gamma$ -positiven Zellen in den  $CD31^-$  Th-Zellen sind in der Regel geringer als die von  $CD31^+$  Th-Zellen des gleichen Spenders. Nur bei Spender 2 und 3 und nur bei der höchsten IL-12-Konzentration von 0,1ng/ml sind die

Frequenzen der IFN- $\gamma$ -Produzenten in den CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen höher als die der CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen des gleichen Spenders.



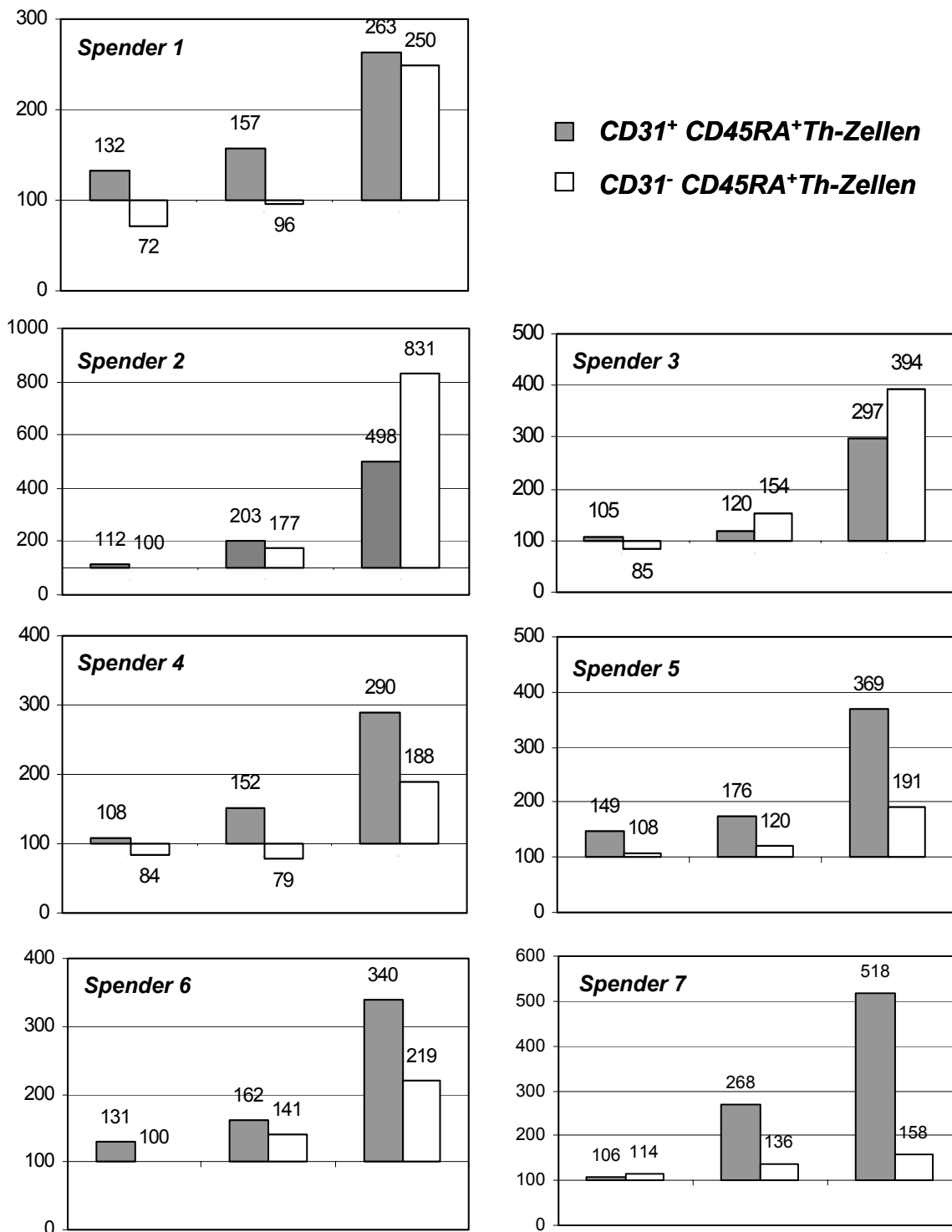
**Abbildung 23: Frequenzen der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen von stimulierten CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Zellen isoliert aus sieben gesunden Spendern.**

Mittels MACS isolierte CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen von sieben gesunden Spendern wurden unter Th1-polarisierenden Bedingungen mit drei verschiedenen IL-12 Konzentrationen stimuliert. Nach fünf Kulturtagen wurden die Zellen restimuliert, fixiert, intrazellulär gegen IFN- $\gamma$  gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Frequenz der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen in den unpolarisierten Kontrollkulturen ohne IL-12-Zugabe und in den Th1-polarisierten Kulturen in Abhängigkeit der IL-12-Konzentration. Allen Ansätzen, auch den Kontrollen wurde IL-2 und  $\alpha$ IL-4 zugegeben.

(A) IFN- $\gamma$ -Expression von stimulierten CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen

(B) IFN- $\gamma$ -Expression von stimulierten CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen





**Abbildung 24: Prozentuale Veränderungen des Anteils der IFN- $\gamma$ -positiven Zellen der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen der einzelnen Spender.**

Die Frequenz der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen der Kontrollansätze aus Abb.23 wurden gleich 100% gesetzt. Jedes Diagramm zeigt die prozentualen Veränderungen der IFN- $\gamma$ -positiven Zellen der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen nach IL-12-Titration.

Zusammenfassend ergaben die in Kap. 3.2.1 – 3.2.3 durchgeführten Untersuchungen von peripheren CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> Th-Zell-Subpopulationen, dass beide Populationen gleichermaßen die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von naiven Th-Zellen aufweisen:

1. Beide Populationen lassen den gleichen „naiven“ Differenzierungs- und Aktivierungszustand erkennen, nur sehr wenige Zellen innerhalb beider Populationen (< 0,5%) ähneln Effektor/Gedächtnis-Th-Zellen.
2. Sowohl CD31<sup>+</sup> als auch CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen produzieren nach polyklonaler Kurzzeitstimulation nur IL-2 und keine Effektorzytokine bzw. nur sehr geringe Frequenzen (< 1%).
3. Beide CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen lassen sich nach Separation *in vitro* sehr gut zu proinflammatorischen Th-Zellen polarisieren. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass CD31<sup>-</sup> Th-Zellen im Unterschied zu CD31<sup>+</sup> Th-Zellen eine größere interindividuelle Varianz bezüglich der IFN- $\gamma$ -Expression zeigen. Auffällig ist auch die starke intraindividuelle Varianz der Zytokinproduzenten von CD31<sup>+</sup> Th-Zellen und CD31<sup>-</sup> Th-Zellen.

Aufgrund dieser Daten ist ersichtlich, dass nur sehr wenige periphere CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen existieren (<1%), für die Effektorfunktionen nachgewiesen werden können und die somit revertierte Gedächtnis- und Effektor-Th-Zellen repräsentieren könnten.

### **3.2.4 Quantitative PCR-Analyse von TRECs in CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen**

Die altersabhängige Atrophie des Thymus führt zu einer drastischen Reduktion seiner Organfunktion, der T-Lymphozyten-Entwicklung. Dagegen nimmt die Anzahl der naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen in der Peripherie im Laufe des Lebens nur geringfügig ab (50, 51). Zur Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools während des Alterns müssen naive Th-Zellen in der Peripherie proliferieren.

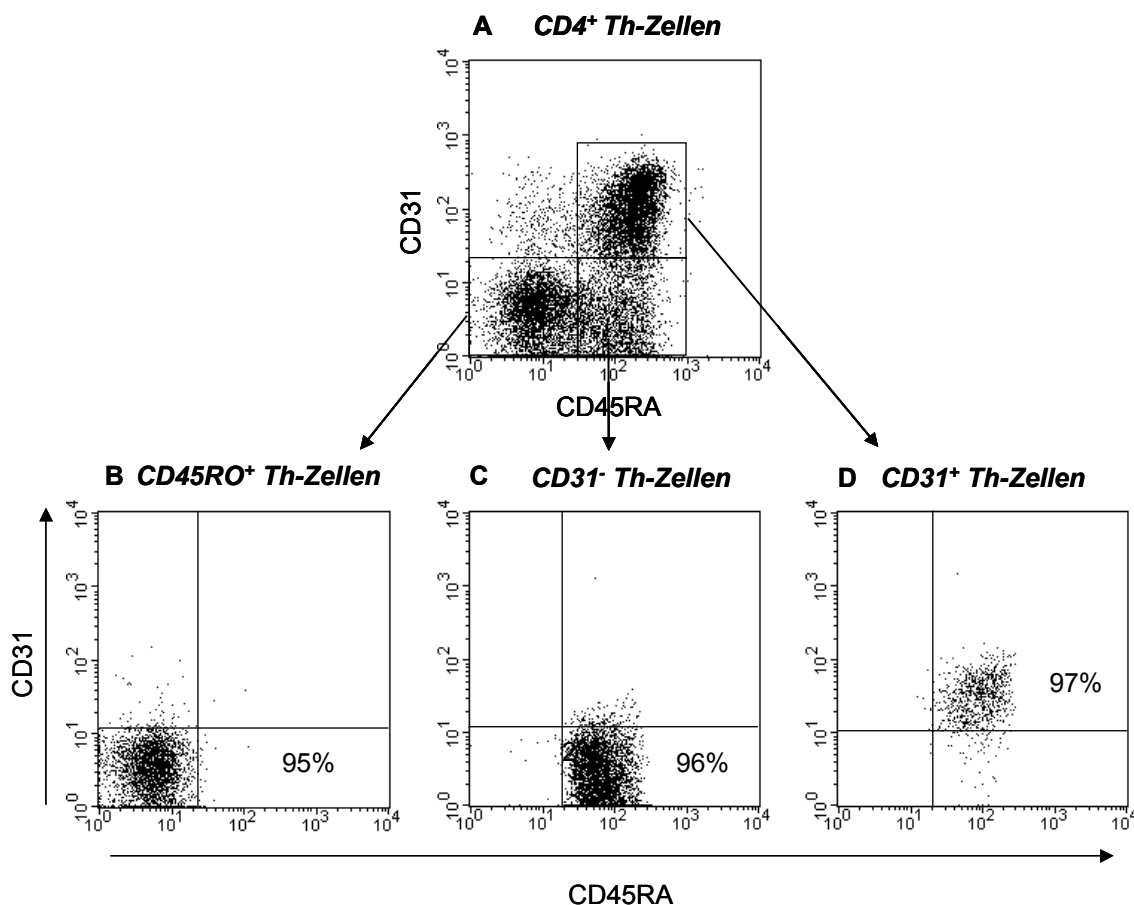
Um zu überprüfen, ob CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen naive Th-Zellen repräsentieren, die in der Peripherie expandiert sind, wurde der TREC-Gehalt in isolierten CD45RA-Subpopulationen durch quantitative PCR-Analyse bestimmt.

### 3.2.4.1 Experimentelles Sortierungssystem zur Isolierung von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulationen mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung

Auch zur Quantifizierung des TREC-Gehalts in CD45RA<sup>+</sup> Th-Subpopulationen ist die Trennung der naiven Th-Zellen von den Antigen-erfahrenen Th-Zellen und den zytotoxischen T-Zellen als auch die Separation der beiden CD45RA<sup>+</sup> Th-Subpopulationen notwendig. Außerdem musste gewährleistet werden, dass hohe Reinheiten der isolierten Populationen erzielt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine weitere Methode zur Isolierung der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen aus peripheren CD4<sup>+</sup> Th-Zellen mittels FACS etabliert.

Aus den PBMC von neun gesunden Spendern zwischen 24 und 52 Jahren wurden die CD4<sup>+</sup> Th-Zellen mit Hilfe der MACS-Technik mit >99% Reinheit isoliert und anschließend mit den fluoreszierenden Antikörpern  $\alpha$ CD4,  $\alpha$ CD45RA,  $\alpha$ CD45RO und  $\alpha$ CD31 markiert. Durch das Setzen und Verknüpfen von mehreren Sortierungsfenstern konnten gleichzeitig lebende CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen, CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Th-Zellen vom Gerät in getrennte Gefäße aussortiert werden. Zusätzlich wurde automatisch die Zellzahl bestimmt.

Um die Reinheit der sortierten Zellen zu überprüfen wurden nach jeder FACS-Anreicherung Zellproben der isolierten Populationen entnommen und eine Reanalyse im FACS Calibur vorgenommen. In Abb.25 sind exemplarisch die Reinheiten der drei isolierten Populationen eines Spenders dargestellt. Die Reinheiten der isolierten Zellpopulationen liegen bei mindestens 95% und sind somit etwas höher als die erzielten Reinheiten der magnetischen Mehrparameter Zellsortierung (siehe Kap.3.2.2.1).



**Abbildung 25: Reanalyse der mittels FACS-Methode isolierten CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup>Gedächtnis-Th-Zellen.**

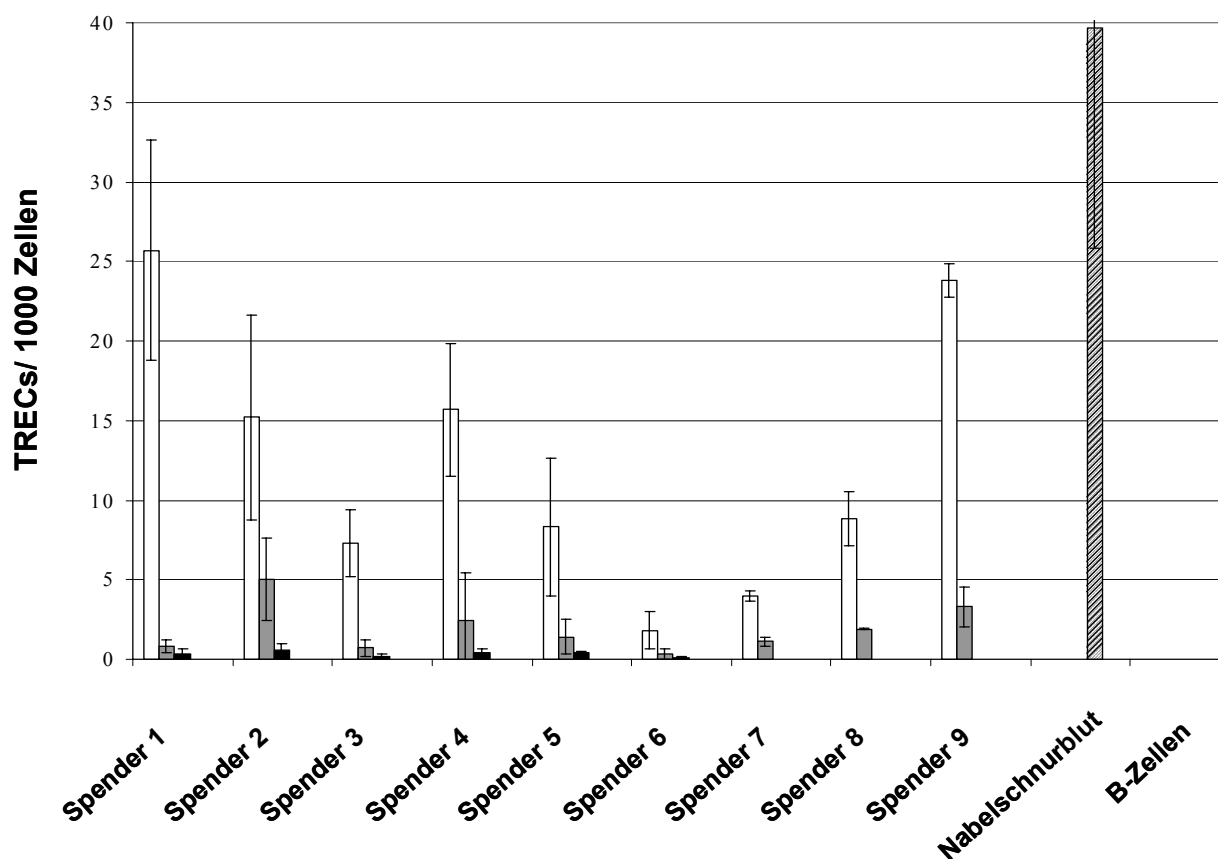
MACS-angereicherte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO und CD31 gefärbt (A). Die Anreicherung aller Th-Zellpopulationen wurde durch das Setzen elektronischer Sortierungsfenster und deren Verknüpfung erreicht. Doubletten wurden mittels Pulsweite und tote Zellen mittels Dapi ausgeschlossen. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Überprüfung der sortierten Th-Zellen im FACS Calibur.

- (A) CD45RA/CD31-Expression auf MACS-sortierten CD4<sup>+</sup> Th-Zellen
- (B) Reanalyse von sortierten CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen
- (C) Reanalyse von sortierten CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen
- (D) Reanalyse von sortierten CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen

### 3.2.4.2 Bestimmung des TREC-Gehalts in CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen

Nach Isolierung und Reanalyse der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen wurde im nächsten Schritt die DNA der Zellen extrahiert. Anschließend wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Grzegorz Przybylski und Katja Laurisch aus der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Schmidt (Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität, Berlin) der TREC-Gehalt der einzelnen Populationen aller neun Spender durch quantitative PCR-Analyse bestimmt. Als negative Kontrolle wurden zusätzlich B-Zellen, als positive Kontrolle CD4<sup>+</sup> Th-Zellen isoliert aus Nabelschnurblut untersucht.

In Abb.26 sind die Ergebnisse der TREC-Messungen dargestellt, jede Probe wurde dreimal gemessen, die Balken stellen den Durchschnittswert der drei Messungen dar. Innerhalb der naiven CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen aller neun untersuchten Spender war die Anzahl der TREC-positiven Zellen deutlich größer als innerhalb der CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen der gleichen Spender (CD31<sup>+</sup> Th-Zellen: 1,8-25,7 TRECs/1000 Zellen, Mittelwert 12,3 ; CD31<sup>-</sup> Th-Zellen: 0,3-5 TRECs/1000 Zellen, Mittelwert 1,9). Im Durchschnitt war der TREC-Gehalt der CD31<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu den naiven CD31<sup>-</sup> Th-Zellen um das 9-fache höher, die Differenzen zwischen den Individuen variierten zwischen 3-fach (Spender 2) und 32-fach (Spender1). Der schon zuvor in der Literatur beschrieben sehr geringe TREC-Gehalt in CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen konnte in den Proben aller Spender bestätigt werden (0,1- 0,6 TRECs/1000 Zellen; Mittelwert 0,3; bei Spender 7-9 wurden keine CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen isoliert). In drei Proben (Spender 1, 3 und 6) entsprach die gemessene reduzierte TREC-Anzahl innerhalb der CD31<sup>-</sup> Th-Zellen sogar fast der Anzahl der wenigen TREC-positiven Gedächtniszellen. Mit 40 TRECs pro 1000 Th-Zellen wurde in Nabelschnurblut-Th-Zellen die größte Anzahl von TRECs detektiert. In der zu hoher Reinheit isolierten B-Zellpopulation, der negativen Kontrolle, konnten keine TRECs nachgewiesen werden. Der gemessene TREC-Gehalt in humanen Thymozyten liegt bei durchschnittlich 200 TRECs pro 1000 Thymozyten (n=7, persönliche Mitteilung Grzegorz Przybylski).



**Abbildung 26: Quantifizierung der TREC-positiven Zellen in isolierten naiven CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-Th-Zellen von neun Spendern.**

Die genomische DNA der isolierten CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen von neun gesunden Spendern und zusätzlich von B-Zellen eines Spenders und CD4<sup>+</sup> Th-Zellen aus dem Nabelschnurblut wurden isoliert. Anschließend erfolgte die Messung der TRECs durch quantitative real time PCR-Analysen.

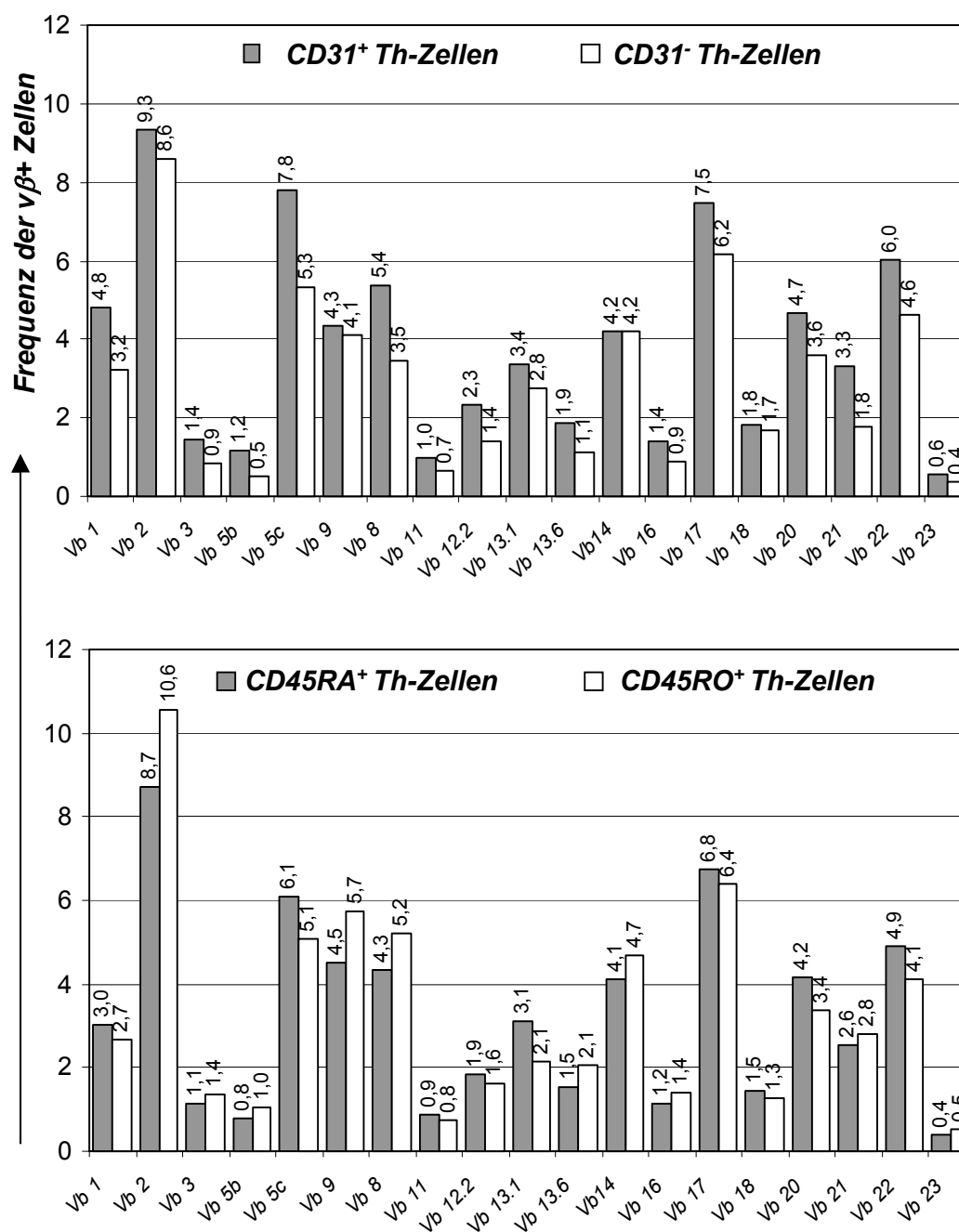
Die weißen Balken repräsentieren den TREC-Gehalt der CD31<sup>+</sup> Th-Zellen, die grauen Balken stellen den TREC-Gehalt der CD31<sup>-</sup> Th-Zellen dar, die schwarzen Balken repräsentieren den TREC-Gehalt innerhalb der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen und der gestreifte Balken repräsentiert den TREC-Gehalt in Nabelschnurblut-Th-Zellen.

### 3.2.5 Vergleich der TCR-Repertoires von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen

Während der Entwicklung von  $\alpha\beta$  T-Zellen im Thymus werden funktionelle TCR-Gene aus V (variablen)-, J (joining)- und D (diversity)- Gensegmenten durch genetische Rekombination zusammengefügt. Dadurch entstehen naive T-Zellen, deren gesamtes Repertoire von Antigenrezeptoren eine sehr große polyklonale Vielfalt aufweisen. Im Gegensatz hierzu kann die periphere Expansion von 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. Durch den Vergleich der Expression von TCR-V $\beta$ -

Familien von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen sollte untersucht werden, ob expandierte V $\beta$ -Familien innerhalb der CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zell-Subpopulation existieren.

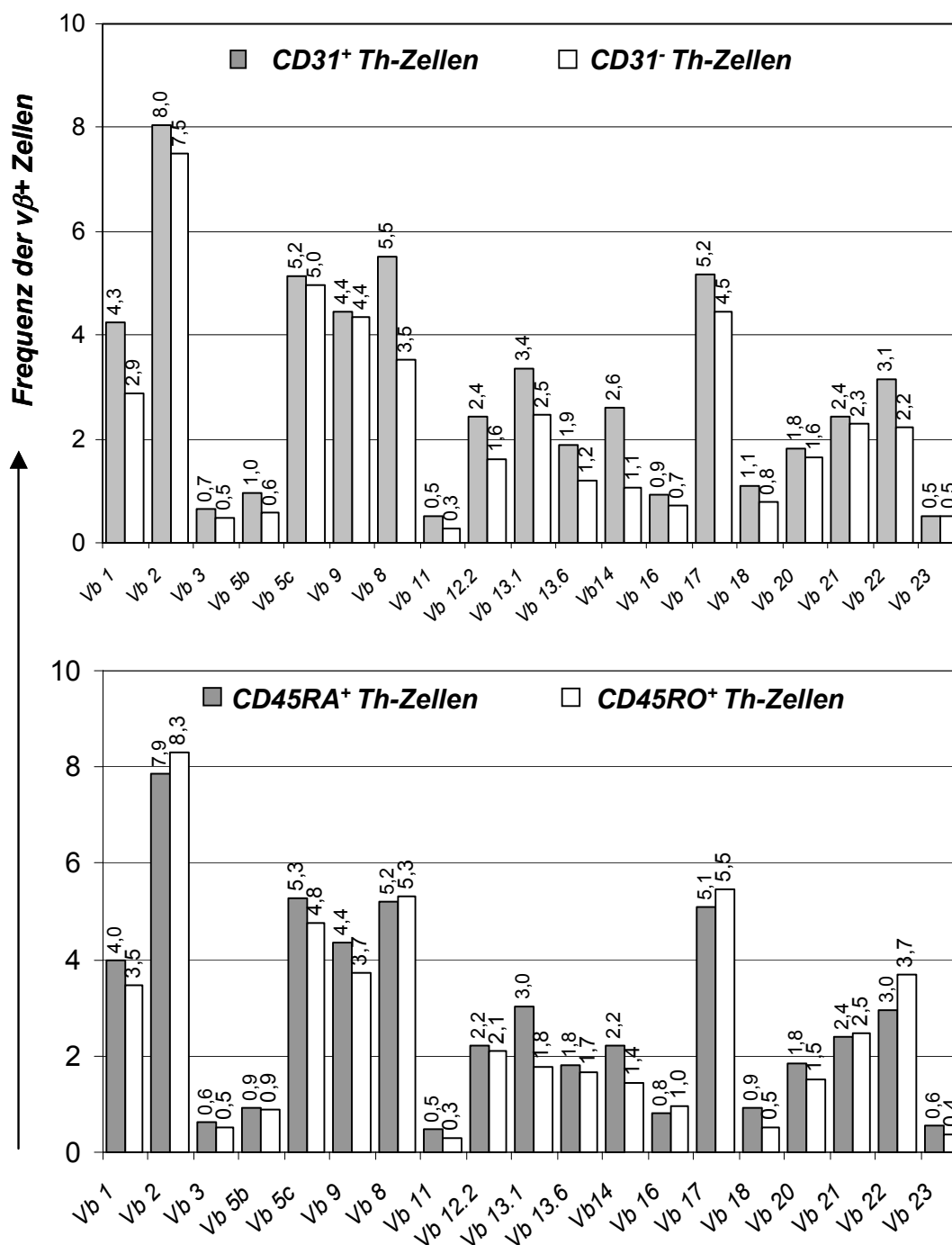
Von zwei gesunden Spendern wurden CD4<sup>+</sup> Th-Zellen isoliert und mit fluoreszenten Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO, CD31 und jeweils einem weiteren Marker gegen eine V $\beta$ -Familie markiert. Nach durchflusszytometrischer Analyse konnten dann die Frequenzen der Zellen innerhalb der Th-Zellpopulationen bestimmt werden, die eine bestimmte V $\beta$ -Familie exprimieren. Abb.27+28 zeigen jeweils den Expressionsvergleich zwischen naiven CD31<sup>-</sup> und CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und den Expressionsvergleich zwischen Antigen-erfahrenen CD45RO<sup>+</sup> und naiven CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen eines gesunden Spenders. Bei beiden Spendern waren bis auf jeweils eine Ausnahme die Frequenzen der untersuchten TCR-V $\beta$ -Familien (Spender 1: V $\beta$ 14, Spender 2: V $\beta$ 23) von CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen geringfügig vermindert (Spender1: -0,2% bis -2,5; Spender 2: -0,1 bis -2,0%). Die Frequenzen von V $\beta$ 14 bei Spender 1 und V $\beta$ 23 bei Spender 2 waren zwischen CD31<sup>-</sup> und CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen unverändert. Auch die Frequenzänderungen der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen waren nur sehr gering. Sie variierten von -1,0% (V $\beta$ 13.1) bis +1,9% (V $\beta$ 22) bei Spender 1. Die maximale Frequenzerhöhung der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen bei Spender 2 lag bei 0,7 % (V $\beta$ 2) , die maximale Abnahme bei -1,2% (V $\beta$ 5c).



**Abbildung 27: Vergleich der Expression von Vβ-Familien zwischen CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und zwischen CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen (Spender 1).**

MACS-isolierte CD4<sup>+</sup> Th-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO, CD31 und jeweils einem Marker gegen eine der 19 Vβ-Familien markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind in (A) die Frequenzen der einzelnen Vβ-Familien innerhalb der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und in (B) die Frequenzen der einzelnen Vβ-Familien innerhalb der CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen.





**Abbildung 28: Vergleich der Expression von Vβ-Familien zwischen CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und zwischen CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen (Spender 2).**

MACS-isolierte CD4<sup>+</sup> Th-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, CD45RO, CD31 und jeweils einem Marker gegen eine der 19 Vβ-Familien markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind in (A) die Frequenzen der einzelnen Vβ-Familien innerhalb der CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und in (B) die Frequenzen der einzelnen Vβ-Familien innerhalb der CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen.

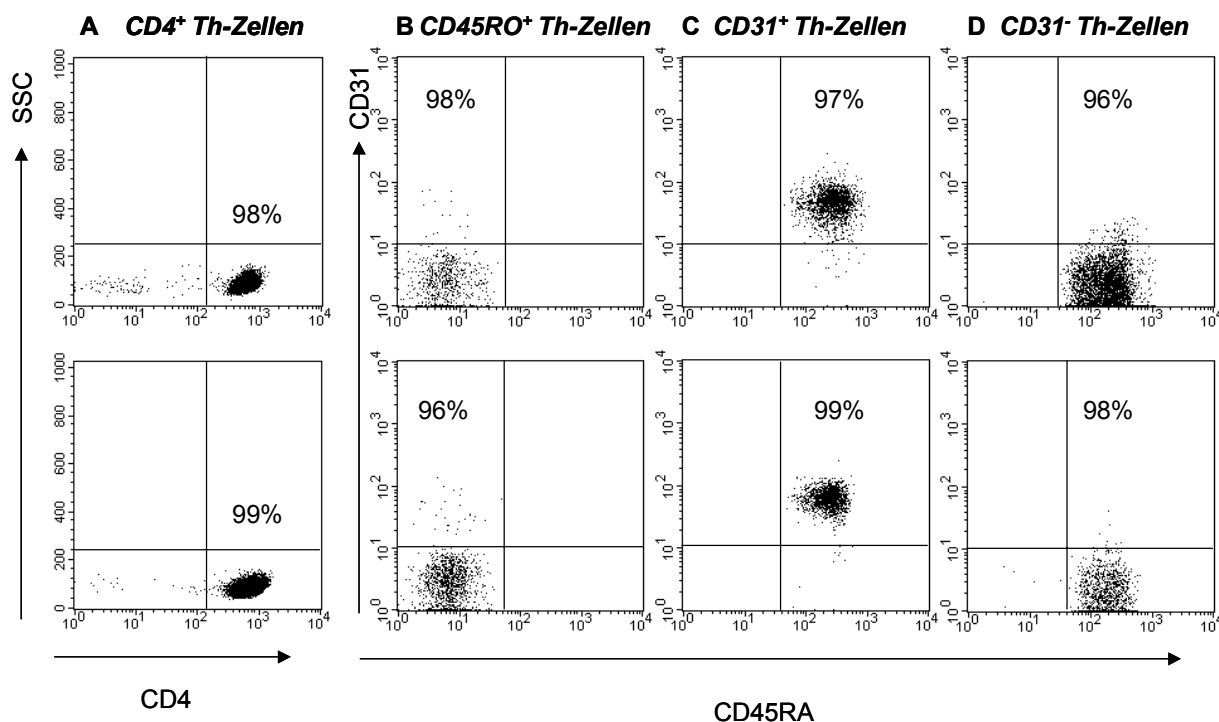
### **3.3 Genexpressionsstudien von CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen mit Hilfe der GeneChip®-Affymetrix Technologie**

Nach Initiierung des Proliferationsprozesses der peripheren naiven Th-Zellen zur Aufrechterhaltung des naiven Th-Zellpools nach Thymusinvolution müssen Faktoren existieren, die diesen Vorgang beenden bzw. regulieren um eine unkontrollierte Expansion der Zellen zu verhindern.

Um unterschiedlich exprimierte Gene in den ruhenden naiven CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Subpopulationen zu identifizieren, die an der Suppression und Regulation der peripheren homöostatischen Proliferation von naiven Th-Zellen beteiligt sind, wurden Affymetrix GeneChip®-Analysen durchgeführt. Zum Vergleich wurde zusätzlich das Genexpressionsprofil der Antigen-erfahrenen CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen analysiert.

#### **3.3.1 Zellmaterial und Reanalyse der isolierten Th-Subpopulationen**

Das Zellmaterial für die Genexpressionsstudie stammte von acht gesunden Blutspendern. Mit Hilfe der MACS-Technik wurden die CD4<sup>+</sup> Th-Zellen aus den PBMC der Spender mit >99% Reinheit isoliert, anschließend mit den Fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ CD4,  $\alpha$ CD45RA,  $\alpha$ CD45RO und  $\alpha$ CD31-Antikörpern gefärbt und mittels der FACS-Technik wie in Kap.3.2.4 beschrieben in CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen separiert. Hierbei musste gewährleistet werden, dass die isolierten Populationen eine sehr hohe Reinheit haben, da schon sehr geringe „Verunreinigungen“ mit anderen Zellpopulationen zu einem verfälschten Genexpressionsprofil führen können. Um die Reinheit der sortierten Zellen zu überprüfen wurden nach jeder FACS-Anreicherung Zellproben der isolierten Populationen entnommen und eine Reanalyse im FACS Calibur vorgenommen. Für diese Studie wurden ausschließlich CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Subpopulationen verwendet, deren Reinheit mindestens 95% betrug. Die erzielten Reinheiten der CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen waren etwas geringer (Minimum 93%), da dieses Kriterium für die Kontrollpopulationen nicht von wesentlicher Bedeutung war. Abb.29 zeigt repräsentativ die Reanalysen der isolierten Populationen von zwei der acht Spender.



**Abbildung 29: Reinheiten der isolierten  $CD31^+$  und  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen und  $CD45RO^+$  Th-Zellen von zwei Spendern.**

$CD31^+$  und  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen und  $CD45RO^+$  Th-Zellen wurden aus PBMC mittels MACS und FACS isoliert. Aliquots der isolierten Zellpopulationen wurden anschließend durchflusszytometrisch im FACS Calibur überprüft.

- (A) Reanalyse der MACS-angereicherten  $CD4^+$  Zellen
- (B) Reanalyse von sortierten  $CD45RO^+$  Th-Zellen
- (C) Reanalyse von sortierten  $CD31^+CD45RA^+$  Th-Zellen
- (D) Reanalyse von sortierten  $CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen

### 3.3.2 Isolierung und Poolen der RNA

Im Anschluss an die Isolierung der Gesamt-RNA der einzelnen Zellpopulationen pro Spender wurden die isolierten RNAs der gleichen Th-Zelltypen ( $CD31^+/CD31^-CD45RA^+$  Th-Zellen und  $CD45RO^+$  Th-Zellen) aller acht Spender unter folgenden Aspekten vereinigt. Zum einen wird durch das Poolen gewährleistet, dass interindividuelle genetische Unterschiede reduziert werden. Weiterhin gestattet erst das Poolen die für die Chips minimal notwendige Zellanzahl von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen (ca. 50-75  $\mu$ g Gesamt-RNA), da die Ausbeute der naiven  $CD31^+$  und  $CD31^-CD45RA^-$  Subpopulationen mit  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Zellen sehr gering war. Die drei RNA-Pools wurden zur Präparation von cRNA eingesetzt. Alle drei cRNA-Pools wurden anschließend aufgeteilt, so dass je zwei unabhängige Hybridisierungen pro Zellpopulation durchgeführt werden konnten.

### 3.3.3 Qualität der Chips/ Kontrolle der Technologie

Die Qualität der verwendeten Chips und die Zuverlässigkeit der GeneChip®-Technologie wurde durch die Analyse der Expression von „Markergenen“ d.h. Gene für spezifische Antigene der Zellpopulationen (wie z.B. CD31), spezifische T-Zellmarker (CD4, CD3, CD6, TCR), spezifische Antigene anderer Zelltypen (B-Zellen: CD19, CD22, CD79; zytotoxische T-Zellen: CD8; Monozyten: CD13, CD14; CD33; dendritische Zellen: CD1, CD83; Makrophagen: CD36; APC: MHCII) auf ihre An- bzw. Abwesenheit überprüft. In Tab.7 ist die Überprüfung dieser Markergene auf den sechs Chips dargestellt. Die grau markierten Felder zeigen detektierbare Gene, die nicht exprimiert sein sollten (z.B. das CD19-Antigen auf CD31<sup>+</sup> Th-Zellen, CD31<sup>-</sup> Th-Zellen, CD45RO<sup>-</sup> Th-Zellen) oder umgekehrt Gene, die nicht detektiert werden und exprimiert sein sollten wie z.B. das CD4-Antigen auf CD31<sup>+</sup> Th-Zellen CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen.

**Tabelle 7: Detektierbarkeit von Markergenen auf den sechs analysierten Chips.**

Die grau markierten Felder zeigen detektierbare Gene, die nicht exprimiert sein sollten oder Gene, die nicht detektiert werden und exprimiert sein sollten.

A: Absent, P: Present, M: Marginal

Genbezeichnung	CD31 <sup>+</sup> Th-Zellen						CD31 <sup>-</sup> Th-Zellen						CD45RO <sup>+</sup> Th-Zellen					
	Chip 1			Chip 2			Chip 3			Chip 4			Chip 5			Chip 6		
	Detection	Signal	p-value	Detection	Signal	p-value	Detection	Signal	P-value	Detection	Signal	p-value	Detection	Signal	P-value	Detection	Signal	p-value
<b>CD31-Antigen</b>																		
CD31 antigen	P	99,6	0,001	P	97,3	0,001	A	12,8	0,285	A	2,9	0,641	A	14,4	0,285	A	3,9	0,849
CD31 antigen	P	48,6	0,025	A	41,6	0,067	A	7,8	0,479	A	1,6	0,872	A	4,9	0,622	A	2,7	0,933
<b>T-Zell-Marker</b>																		
CD4 antigen (p55)	P	16,3	0,039	P	14,2	0,035	P	76	0,001	P	59,8	0,001	P	25,6	0,011	P	25,1	0,022
CD4 antigen (p55)	A	23,5	0,163	M	34,7	0,044	P	59,4	0,001	P	45,3	0,019	A	27,5	0,089	A	17,4	0,235
CD3G antigen, gamma polypeptide	P	53,4	0,001	P	44,6	0,001	P	83,8	0,000	P	70,5	0,000	P	39,2	0,001	P	46,5	0,003
CD3Z antigen, zeta polypeptide	P	764,3	0,000	P	917,5	0,000	P	795,3	0,000	P	939,6	0,000	P	519	0,000	P	572	0,000
CD3D antigen, delta polypeptide	P	678	0,000	P	603,3	0,000	P	601,4	0,000	P	539,8	0,000	P	588	0,000	P	561	0,000
CD6 antigen	P	483,3	0,000	P	537,1	0,000	P	384	0,000	P	393,7	0,000	P	553	0,000	P	588	0,000
CD6 antigen	P	83,4	0,035	P	94,2	0,019	P	124	0,001	P	137	0,001	P	87	0,022	P	93,4	0,022
T cell receptor alpha locus	P	1679	0,000	P	1599	0,000	P	1650	0,000	P	1607	0,000	P	1807	0,000	P	1726	0,000
T cell receptor alpha locus	P	178,8	0,000	P	161,4	0,000	P	596,4	0,000	P	665,5	0,000	P	282	0,000	P	245	0,000
T cell receptor beta locus	P	2802	0,000	P	3273	0,000	P	1783	0,000	P	1764	0,000	P	2197	0,000	P	2163	0,000
<b>Marker für B-Zellen, CD8-Zellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen</b>																		
CD19 antigen	A	18,5	0,190	A	31,8	0,089	A	8,9	0,235	A	15,2	0,285	A	14,2	0,151	A	13,2	0,204
CD19 antigen	P	44,9	0,003	P	60,9	0,008	P	31,4	0,002	P	46,1	0,003	P	24,8	0,025	M	27,9	0,044
CD22 antigen	A	51,4	0,060	A	46,3	0,089	A	21,1	0,117	A	31,3	0,151	M	41,1	0,044	A	40,5	0,190
CD22 antigen	A	1,7	0,933	A	0,9	0,994	A	0,5	0,951	A	0,6	0,965	A	2	0,837	A	1,7	0,837
CD79B antigen	A	21,8	0,340	A	8,1	0,765	A	10	0,521	A	3,4	0,733	A	11,2	0,541	A	6,4	0,602
major histocompatibility complex, class II	A	46,1	0,204	A	74,4	0,128	A	35,8	0,117	A	40,3	0,117	A	50,9	0,060	A	32,9	0,128
CD8 antigen	A	26,6	0,340	A	52,4	0,285	A	18,7	0,398	A	43,7	0,128	A	16,1	0,418	A	29,2	0,359
CD8 antigen	P	14,4	0,039	A	19,1	0,060	A	11,2	0,163	A	5,5	0,359	P	26,7	0,017	P	28,5	0,013
CD14 antigen	A	4,1	0,861	A	5,8	0,861	A	3,8	0,679	A	7,4	0,622	A	3,7	0,926	A	4,5	0,946
CD13	A	3,9	0,660	A	16,3	0,521	A	4,2	0,660	A	5,9	0,459	A	8,4	0,582	A	14,7	0,500
CD33 antigen (gp67)	A	9,8	0,459	A	22,9	0,116	A	7	0,340	A	13,3	0,128	A	12,2	0,235	A	14,8	0,267
CD83 antigen	A	27,6	0,074	M	28,6	0,049	A	13,7	0,219	A	30,4	0,107	A	22,5	0,089	A	29,2	0,067
CD1A antigen, a polypeptide	A	6,8	0,602	A	7,5	0,479	A	12,2	0,340	A	13,7	0,378	A	25,1	0,378	A	16,5	0,378
CD1B antigen, b polypeptide	A	1,4	0,861	A	2	0,749	A	1,4	0,715	A	0,7	0,861	A	1,7	0,697	A	4,6	0,660
CD1C antigen, c polypeptide	A	16,4	0,251	A	12,2	0,340	A	13,3	0,098	A	18,4	0,190	A	19,2	0,139	A	14,4	0,267
CD36 antigen	A	2,3	0,582	A	1,7	0,850	A	4,8	0,479	A	1,8	0,810	A	4	0,340	A	3,5	0,697

### 3.3.4 Differentiell exprimierte Gene in CD31<sup>+</sup> und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen - vorläufige Ergebnisse

Aufgrund der Replikate (zwei Chips des gleichen RNA-Pools) konnten für die Gegenüberstellung der Genexpression von zwei Zellpopulationen (CD31<sup>-</sup> Th-Zellen/ CD31<sup>+</sup> Th-Zellen, CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen/ CD31<sup>+</sup> Th-Zellen, CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen/ CD31<sup>-</sup> Th-Zellen) je vier Vergleiche aufgestellt werden. Hierbei wurde jeweils das Expressionsprofil der zuletzt genannten Probe als Basislinie definiert. Um eine sehr hohe Zuverlässigkeit für eine relevante Expressionsänderung eines Gens zwischen zwei Zellpopulationen zu gewährleisten, wurden bei der Auswertung, zusätzlich zu den von Affymetrix festgelegten Kriterien (siehe Kap.2.15) weitere stringendere Ausschlussgrenzen festgelegt. Hierbei wurden nur Genkandidaten berücksichtigt, die folgende Kriterien erfüllen:

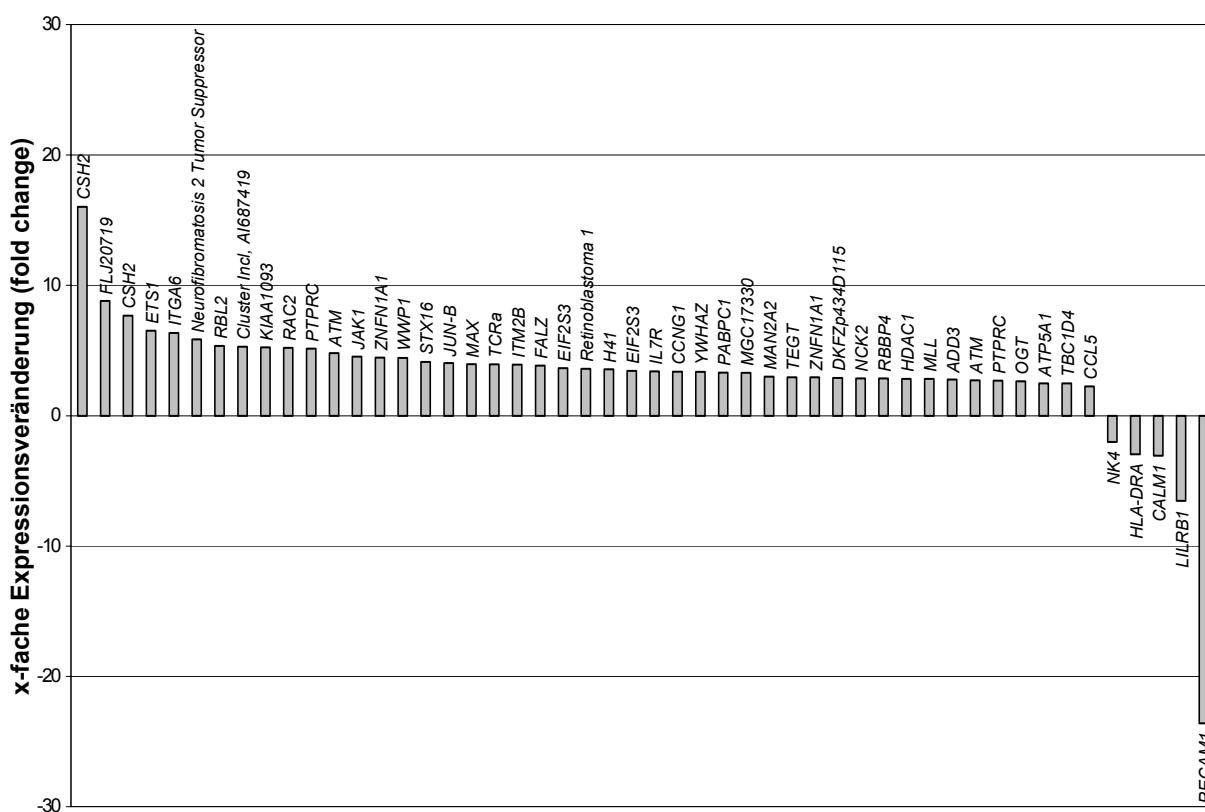
1. Die Gene müssen mindestens in drei der vier möglichen Vergleiche differentiell exprimiert sein.
2. Die detektierten Expressionssignale der sechs analysierten Chips sind allgemein sehr gering. Der durchschnittliche Signalwert für *Present* liegt bei 209, für *Absent* bei 10, für *Marginal* bei 31. Um die Zuverlässigkeit für eine relevante Zu- oder Abnahme zu erhöhen, muss bei differentiell exprimierten Genen eine der beiden Zellpopulationen ein Expressionssignal von mindestens 60 aufweisen.
3. Es werden nur differentiell exprimierte Gene in den Vergleichsanalysen berücksichtigt, die eine Expressionszunahme bzw. -abnahme (*Fold Change*) um mindestens den Faktor 1,5 gegenüber der Basislinie aufweisen.

Alle drei Kriterien basieren auf Erfahrungswerten und sind empirisch ermittelt (persönliche Mitteilung von Dr. Birgit Oppmann, Arbeitsgruppe Thiel, DRFZ).

Aufgrund dieser Auswahlkriterien waren zwischen naiven CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen und CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen 50 Gene unterschiedlich exprimiert (Tab.8 und Abb.30) Zwischen CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen und CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen waren 73 Gene und zwischen CD45RO<sup>+</sup> Th-Zellen und CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen 138 Gene unterschiedlich exprimiert (Daten nicht gezeigt).

In Tab.8 und Abb.30 ist die differentielle Genexpression von CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen im Vergleich zu CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen, nach dem abnehmendem *Fold Change* geordnet, aufgelistet bzw. dargestellt.

Die hier durchgeführten Genexpressionsstudien liefern nur Hinweise auf relevante Gene und sollen in weiteren Untersuchungen mittels quantitativer PCR-Analyse oder mittels Westernblot direkt auf Proteinebene geprüft werden.



**Abbildung 30: Differentiell exprimierte Gene im Vergleich CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen gegen CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen.**

Das Expressionsprofil der CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen wurde als Basislinie definiert. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert eines differentiel exprimierten Gens aus den vier möglichen Vergleichen. Die vier einzelnen Vergleiche und die Genbezeichnungen der Gensymbole sind in Tab.8 angegeben.

**Tabelle 8a: Differenziell exprimierte Gene im Vergleich CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen gegen CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen. A: Absent, P: Present, I: Increase, D: Decrease**

Gen-Symbol	Genbezeichnung	CD31 <sup>+</sup> Th-Zellen		CD31 <sup>-</sup> Th-Zellen		Vergleich CD31 <sup>-</sup> Th-Zellen versus CD31 <sup>+</sup> Th-Zellen										
		Chip 1		Chip 2		Chip 3		Chip 4		Fold Change der 4 Vergleiche				Mittelwert Fold Change	Change Call	Change p-value
		Signal	Detection	Signal	Detection	Signal	Detection	Signal	Detection							
CSH2	chorionic somatomammotropin hormone 2	25,7	A	11,4	A	103,3	P	107,8	P	26,9	11,3	7,6	18,3	16,0	I	0,000
FLJ20719	hypothetical protein FLJ20719	52,4	P	59,7	P	480,7	P	418,4	P	13,6	7,7	5,1	8,7	8,8	I	0,000
CSH2	chorionic somatomammotropin hormone 2	10,6	A	7,2	A	106,2	P	114,2	P	16,6	3,7	2,6	7,8	7,7	I	0,000
ETS1	vets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	24,2	A	25,2	A	192,9	P	111,1	P	13,4	5,4	2,6	4,8	6,5	I	0,000
ITGA6	integrin, alpha 6	11,1	A	12,7	A	107,2	P	83,3	P	9,8	6,6	3,8	5,1	6,3	I	0,000
Neurofibromatosis 2 Tumor	Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor	76,1	P	79,3	P	447,5	P	215,1	P	10,6	5,4	2,2	5,3	5,8	I	0,001
RBL2	retinoblastoma-like 2 (p130)	27,9	P	21,4	P	154,8	P	149,4	P	8,5	4,2	2,9	5,9	5,4	I	0,000
AI687419	AI687419	30,3	P	25,8	P	168,6	P	115,3	P	8,9	5,3	2,3	4,7	5,3	I	0,000
KIAA1093	KIAA1093 protein	34,0	P	39,1	P	167,8	P	167,6	P	8,0	5,0	2,8	5,2	5,2	I	0,001
RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	57,8	P	77,7	P	330,0	P	299,2	P	8,6	4,7	2,8	4,6	5,2	I	0,000
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	62,7	P	47,6	P	267,9	P	270,3	P	8,8	3,8	2,4	5,7	5,1	I	0,000
ATM	ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	42,7	P	31,7	A	128,3	P	125,7	P	8,1	3,6	2,5	4,9	4,8	I	0,000
JAK1	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	37,8	P	22,7	P	130,8	P	93,3	P	8,2	3,7	2,4	3,9	4,5	I	0,000
ZNFN1A1	zinc finger protein, subfamily 1A, 1 (Ikaros)	58,4	P	87,3	P	196,7	P	184,1	P	7,5	3,4	2,2	4,7	4,4	I	0,000
WWP1	Homo sapiens Nedd-4-like ubiquitin-protein ligase WWP1 mRNA	32,3	P	20,1	P	173,5	P	170,2	P	7,8	3,0	1,8	5,2	4,4	I	0,000
STX16	syntaxin 16	14,4	A	24,7	A	113,1	P	117,3	P	6,7	3,7	2,4	3,7	4,1	I	0,000
JUN-B	Human transactivator (jun-B) gene	77,5	P	96,1	P	329,0	P	322,6	P	6,1	3,5	2,4	4,1	4,0	I	0,000
MAX	H_sapiens max gene	7,9	A	21,0	A	79,6	P	78,1	P	4,4	4,8	3,5	3,2	4,0	I	0,000
TCRa	Human gene for T-cell receptor alpha chain C region	178,8	P	161,4	P	596,4	P	665,5	P	6,5	3,1	2,0	4,2	3,9	I	0,000
ITM2B	integral membrane protein 2B	170,5	P	166,6	P	401,7	P	372,8	P	5,0	3,4	2,8	4,5	3,9	I	0,000
FALZ	fetal Alzheimer antigen	36,0	P	23,2	P	132,2	P	114,6	P	5,4	3,8	2,7	3,5	3,8	I	0,000
EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	36,8	P	30,9	P	121,5	P	102,7	P	5,9	3,1	2,0	3,6	3,7	I	0,000
Retinoblastoma 1	Retinoblastoma 1	48,2	P	51,2	P	91,4	P	90,8	P	6,2	2,2	1,7	4,2	3,6	I	0,000
H41	hypothetical protein H41	37,5	P	30,1	P	111,4	P	100,5	P	6,1	2,8	1,7	3,5	3,6	I	0,000
EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	27,7	P	27,6	P	98,5	P	69,3	P	5,7	3,1	1,5	3,4	3,4	I	0,000



**Tabelle 8b: Differenziell exprimierte Gene im Vergleich CD31<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen gegen CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Th-Zellen. A: Absent, P: Present, I: Increase, D: Decrease**

Gen-Symbol	Genbezeichnung	CD31 <sup>+</sup> Th-Zellen				CD31 <sup>-</sup> Th-Zellen				Vergleich CD31 <sup>-</sup> Th-Zellen versus CD31 <sup>+</sup> Th-Zellen						
		Chip 1		Chip 2		Chip 3		Chip 4		Fold Change der 4 Vergleiche				Mittelwert Fold Change	Change Call	Change p-value
		Signal	Detection	Signal	Detection	Signal	Detection	Signal	Detection							
IL7R	interleukin 7 receptor	439,4	P	426,9	P	1293,2	P	1167,5	P	5,3	3,1	1,9	3,3	3,4	I	0,000
CCNG1	cyclin G1	22,2	P	29,9	P	64,6	P	76,8	P	4,8	3,3	2,4	3,0	3,4	I	0,000
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	106,6	P	118,0	P	269,2	P	257,4	P	5,3	2,8	1,8	3,5	3,4	I	0,000
PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	984,4	P	1174,8	P	2572,6	P	2629,1	P	5,0	2,6	2,0	3,6	3,3	I	0,000
MGC17330	hypothetical protein MGC17330	78,5	P	105,9	P	398,7	P	349,4	P	4,8	2,9	2,3	3,2	3,3	I	0,000
MAN2A2	mannosidase, alpha, class 2A, member 2	24,6	P	21,2	A	84,2	P	104,6	P	4,4	2,4	1,7	3,5	3,0	I	0,000
TEGT	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	116,9	P	106,8	P	286,5	P	256,8	P	4,6	2,4	1,6	3,1	2,9	I	0,000
ZNFN1A1	zinc finger protein, subfamily 1A, 1 (Karas)	54,0	P	39,0	P	173,7	P	146,0	P	4,5	2,8	1,9	2,6	2,9	I	0,000
AL042668	AL042668	36,2	P	45,0	P	126,5	P	119,0	P	4,1	2,5	1,9	3,1	2,9	I	0,000
NCK2	NCK adaptor protein 2	24,0	A	31,9	A	95,0	P	60,4	P	3,8	3,5	1,9	2,3	2,9	I	0,003
RBBP4	retinoblastoma binding protein 4	37,8	P	42,4	P	89,3	P	76,8	P	3,8	2,8	2,1	2,9	2,9	I	0,000
HDAC1	histone deacetylase 1	34,4	P	37,4	M	115,4	P	104,0	P	4,1	3,0	1,6	2,5	2,8	I	0,000
MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	26,5	A	26,8	A	80,6	P	71,6	P	4,3	2,4	1,7	2,9	2,8	I	0,001
ADD3	adducin 3 (gamma)	80,9	P	54,4	P	239,6	P	212,9	P	4,6	2,5	1,6	2,4	2,8	I	0,000
ATM	ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	26,5	A	22,3	A	133,0	P	122,4	P	4,3	2,1	1,5	2,9	2,7	I	0,000
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	290,5	P	289,8	P	551,4	P	497,7	P	4,0	2,8	1,5	2,4	2,7	I	0,000
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-	83,1	A	102,3	A	28,2	A	39,0	A	3,6	3,2	1,6	2,2	2,6	I	0,001
ATP5A1	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle	113,1	P	133,4	P	251,4	P	253,2	P	3,4	2,5	1,6	2,5	2,5	I	0,000
TBC1D4	TBC1 domain family, member 4	31,9	P	44,2	P	93,2	P	107,7	P	3,5	2,2	1,6	2,7	2,5	I	0,000
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	23,4	A	32,7	A	60,9	P	61,6	P	2,9	2,5	1,5	2,1	2,3	I	0,000
NK4	natural killer cell transcript 4	1724,3	P	2053,5	P	810,1	P	829,5	P	-1,5	-1,9	-2,6	-2,0	-2,0	D	1,000
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	171,1	P	194,2	P	27,0	P	31,8	P	-1,8	-3,5	-4,3	-2,2	-3,0	D	1,000
CALM1	Homo sapiens calmodulin-1 (CALM1) mRNA, 3'UTR, partial sequence	120,4	P	92,1	P	30,1	P	26,7	M	-1,7	-3,7	-4,0	-2,8	-3,1	D	1,000
LILRB1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1	61,5	P	60,3	P	5,6	A	7,6	A	-4,6	-7,9	-8,2	-5,5	-6,5	D	1,000
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	99,6	P	97,3	P	12,8	A	2,9	A	-3,7	-7,5	-52,3	-30,9	-23,6	D	1,000