

Interaktionen von Thymozyten mit Komponenten der
extrazellulären Matrix und Thymus-Epithelzellen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von
SNJEŽANA KUTLEŠA

Tag der mündlichen Prüfung:

19. September 2002

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter:

PD Dr. Gerd Klein

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen in der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und PD Dr. Gerd Klein durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Gerd Klein für die interessante und aktuelle Themastellung, für seine intensive Betreuung und für die fruchtbare Diskussionen während der gesamten Arbeit. Für die Möglichkeit, eigene Ideen zu verwirklichen und meine Ergebnisse auf internationalen Kongressen zu präsentieren, möchte ich mich besonders bedanken.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. Hans-Georg Rammensee für die Erstellung des Erstgutachtens sowie die intensive Betreuung und die Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

Frau Professorin Dr. Claudia Müller danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihr gezeigtes Interesse an meiner Arbeit.

Allen Mitgliedern der Sektion danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft. Dies gilt besonders für Oda Stoevesandt, Simone Knäpple, Inge Steiert, Tatjana Klatt, Jon Tolson und Dr. Thomas Flad, mit denen ich sehr gern zusammen gearbeitet habe.

Herrn Dr. Johannes Wessels danke ich herzlich für die Möglichkeit, die mikroskopische Bildverarbeitung in seinem Labor zu erlernen. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Frau Dr. Eva Tolosa danke ich für Hilfestellung bei der Zellkultivierung der Thymus-Epithelzellen und für die bereitgestellten Hybridoma-Überstände.

Für die Erstellung unzähliger Fotos danke ich Frau Margarete Ehrmann.

1	EINLEITUNG	6
1.1	T-Zellen	6
1.2	Extrazelluläre Matrix im Thymus	8
1.2.1	Die Laminin-Familie	10
1.2.2	Thymome	13
1.2.3	Die Integrin-Familie	13
1.2.4	Die Syndecan-Familie	15
1.3	Die Cadherin-Familie	17
1.3.1	Die funktionelle Bedeutung der Cadherine	19
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Zellkulturen und Gewebeproben	22
2.1.1	Zellkulturmedien	22
2.1.2	Zellkulturbedingungen	22
2.1.3	Passagieren von Zellen	22
2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
2.1.5	Zelllinien	23
2.1.6	Gewebeproben	23
2.1.7	Isolierung von Thymozyten	24
2.1.8	Etablierung und Kultivierung primärer Thymus-Epithelzellen	24
2.2	Antikörper	25
2.2.1	Primärantikörper	25
2.2.2	Sekundäre Antikörper	27
2.3	Extrazelluläre Matrixproteine	28
2.4	Proteinchemische Methoden	28
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.4.2	Coomassie Brilliant Blue Färbung	29
2.4.3	Affinitätschromatografie	30
2.4.4	Biotinylierung von Antikörpern	30
2.5	Immunologische Methoden	31
2.5.1	Western Blot-Analyse	31
2.5.2	Nicht-radioaktive Immunpräzipitation	31
2.5.3	Indirekte Immunfärbung	32
2.5.3.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	32
2.5.3.2	Peroxidase-DAB-Färbung	33
2.5.4	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)	34
2.5.4.1	Isolierung der DN, DP, SP CD4 ⁺ und SP CD8 ⁺ Thymozytensubpopulationen	34
2.5.4.2	Isolierung der CD8 ⁺ /CD103 ⁻ Thymozytensubpopulation	35
2.5.4.3	Isolierung der Syndecan-1(CD138) positiven Thymozyten	36
2.5.5	Durchflußzytometrie	36
2.6	Molekularbiologische Methoden	37
2.6.1	Isolierung von RNA	37
2.6.2	Reverse Transkription –Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38

2.7	Funktionsanalysen	39
2.7.1	Zelladhäsionstest	39
2.7.2	Zellbindungstest	40
2.7.3	Quantifizierung des Zellbindungstests	41
2.7.4	Zellproliferation nach Stimulation mit Matrixproteinen	41
2.7.5	Zellproliferation an kultivierten primären Thymus-Epithelzellen	42
2.7.6	TUNEL-Assay	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Expressionsanalyse verschiedener Laminin-Ketten	44
3.1.1	Expression verschiedener Laminin-Ketten im humanen Thymus	44
3.1.2	Expression der Laminin-Ketten in Thymomen	49
3.2	Expression der Laminin-Rezeptoren auf humanen Thymozyten	51
3.2.1	Expression der Integrin- α 3-, α 6-, β 1- und β 4-Ketten auf unterschiedlichen Thymozytensubpopulationen	52
3.2.2	Die Ko-Lokalisierung der Laminin- α 5-Kette mit DN Thymozyten	53
3.3	Funktionelle Analysen zur Rolle der Laminine in der Thymozyten-Entwicklung	54
3.3.1	Zell-Matrix-Interaktionen von Laminin-Isoformen mit reifenden Thymozyten	54
3.3.2	Funktionelle Charakterisierung von Laminin-Rezeptoren an unterschiedliche Thymozytensubpopulationen	56
3.3.3	Die Beteiligung von LN-5 und LN-10/11 an der Zellproliferation reifender Thymozyten	58
3.4	Bedeutung von E-Cadherin in der Thymozyten-Entwicklung	60
3.4.1	Untersuchung der Cadherin- und Catenin-Expression im humanen Thymus	60
3.4.2	Expressionsanalyse primärer Thymus-Epithelzellen	64
3.4.3	Expressionsanalyse der Integrin- α E-Kette (CD103) auf reifenden Thymozyten	68
3.4.4	Funktionelle Untersuchungen zur Beteiligung von E-Cadherin und CD103	72
3.4.4.1	E-Cadherin-vermittelte Adhäsion reifender Thymozyten	72
3.4.4.2	CD103-vermittelte Zellproliferation	75
3.5	Analyse der Syndecan-1 (CD138)-Expression im humanen Thymus	78
4	DISKUSSION	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATURVERZEICHNIS	94
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	107
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	109

1 Einleitung

1.1 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich aus Stammzellen des Knochenmarkes. Die Vorläufer der T-Zellen wandern zur Reifung in den Thymus. Aus diesem Grunde werden sie thymusabhängige (T-) Lymphozyten oder T-Zellen genannt. Im Thymus proliferieren und differenzieren die unreifen T-Zellen, die in diesem Stadium als Thymozyten bezeichnet werden. Hierbei durchlaufen die Thymozyten eine Reihe von definierten phänotypischen Stadien, die mit Hilfe von charakteristischen Expressionsmustern verschiedener Proteine auf der Zelloberfläche identifiziert werden können. Der Thymus ist ein lymphatisches Organ im oberen Brustbereich direkt über dem Herz. Er bietet ein geeignetes Mikromilieu für die T-Zell-Entwicklung, welches aus einem epithelialen Maschenwerk, Makrophagen, dendritischen Zellen und mesenchymalen Fibroblasten besteht (Shortman & Wu, 1996; Owen et al., 1999; Anderson & Jenkinson, 2001).

Die eigentlichen Funktionseinheiten des Thymus sind die Thymusläppchen, von denen jedes deutlich in eine äußere kortikale Region, den Thymuskortex, und eine zentrale Region, die Thymusmedulla, gegliedert ist. Der menschliche Thymus ist bereits vor der Geburt entwickelt. Das Stroma entsteht in der frühen Embryonalentwicklung aus endodermalen und ektodermalen Schichten der Embryonalstrukturen. Aus Untersuchungen mit Mäuseembryonen kann man ableiten, dass sich aus ektodermalen Schichten die Epithelzellen des Kortex bilden, während die Epithelzellen der Medulla aus endodermalen Zellen entstehen (Janeway & Travers, 2001). Diese epithelialen Gewebe bilden zusammen zunächst den rudimentären Thymus, die sogenannte Thymusanlage, die Zellen hämatopoetischen Ursprungs anlockt, die sich dort ansiedeln. Aus diesen entwickeln sich Thymozyten der T-Zelllinie sowie dendritische Zellen des Thymus. Unabhängig davon wird der Thymus auch von zahlreichen Makrophagen aus dem hämatopoetischen System besiedelt (Anderson et al., 1996; Anderson & Jenkinson, 2001; Janeway & Travers, 2001).

Während ihrer Proliferation und Reifung zu T-Zellen durchlaufen die Thymozyten eine Reihe von unterschiedlichen Stadien, die durch Veränderungen im Zustand der T-Zell-Rezeptorgene, durch die Expression eines prä-T-Zell-Rezeptors und die Expression der Ko-Rezeptoren CD4 und CD8 sowie weitere Moleküle auf der Zelloberfläche gekennzeichnet sind. Bestimmte Kombinationen der Zelloberflächenmolekülen CD3, CD4 und CD8 dienen

als Marker für die verschiedenen T-Zell-Entwicklungsstadien (Janeway & Travers, 2001). Die wichtigsten Stadien sind in Abb. 1-1 zusammengefasst.

Wenn Vorläuferzellen nach Verlassen des Knochenmarkes in den Thymus gelangen, exprimieren sie weder CD3 noch CD4 oder CD8 Moleküle. Da diesen Zellen sowohl CD4 als auch CD8 fehlen, nennt man sie auch „doppelt negative“ (DN) Thymozyten. DN Thymozyten bilden eine heterogene Zellpopulation. Eine kleine Zellpopulation der DN Thymozyten hat begonnen, die Gene für den γ/δ -Rezeptor umzuordnen. Diejenigen DN Thymozyten, die ihre Gene für die β -Kette des T-Zell-Rezeptors noch nicht rekombiniert haben, bilden die größere DN Population. Die Reifung von T-Zellen passiert danach ein Stadium, in dem die Zellen CD4 und CD8 exprimieren. Diese Zellen bezeichnet man als „doppelt positive“ (DP) Thymozyten. Die ersten DP Thymozyten exprimieren den prä-T-Zell-Rezeptor (pT α/β). Im weiteren Verlauf exprimieren DP Thymozyten eine geringe Menge an α/β -T-Zell-Rezeptoren. Diejenigen DP Thymozyten, deren Rezeptoren Selbst-MHC-Moleküle erkennen, verlieren entweder die CD4- oder CD8-Expression und erhöhen die Expression des T-Zell-Rezeptors. Solche Zellen sind reife „einfach positive“ (SP) T-Zellen, die aus dem Thymus in die Peripherie auswandern können (Owen et al., 1999; Anderson & Jenkinson, 2000; Janeway & Travers, 2001).

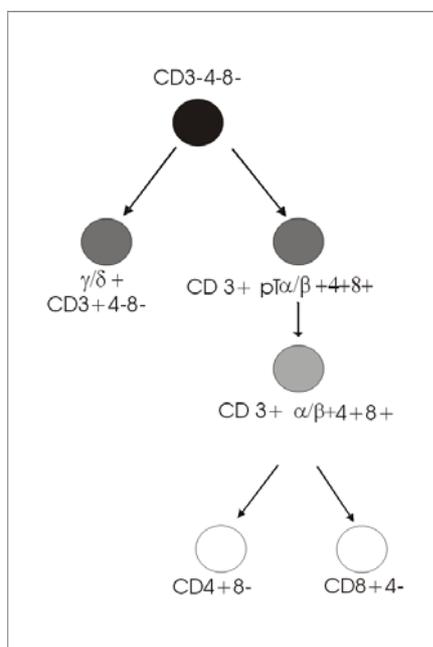


Abbildung 1-1 stellt die wichtigsten Stadien der Thymozyten-Entwicklung dar. (Schema nach Janeway & Travers, 2001)

Die Lokalisation der unterschiedlich gereiften Thymozyten im Thymusläppchen korreliert mit ihrem Entwicklungsstadium. Am äußeren Kortextrand, im subkapsulären Bereich des Thymus, befinden sich unreife doppelt negative Thymozyten. Nach der Proliferation und Reifung zu

doppelt positiven Thymozyten dringen sie tiefer in den Thymuskortex, der dicht mit Thymozyten gepackt ist, vor. Die weniger dicht gepackte Medulla enthält vor allem die reifen, einfach positiven Thymozyten, die mit der Zeit den Thymus verlassen und in den Blutkreislauf gelangen (Anderson & Jenkinson, 2001; Janeway & Travers, 2001).

1.2 Extrazelluläre Matrix im Thymus

Die meisten Zellen vielzelliger Organismen stehen durch ein kompliziertes Maschenwerk extrazellulärer Makromoleküle in Kontakt, die die extrazelluläre Matrix (ECM) bilden. Diese vielseitige Matrix wird von den Zellen sezerniert und baut sich im Extrazellularraum der meisten Gewebe zu einem wohlorganisierten Netzwerk zusammen. Die extrazelluläre Matrix hält aber nicht nur die Zellen innerhalb von Geweben und Organen zusammen, sondern sie beeinflusst auch die Entwicklung, die Polarität und das Verhalten von Zellen, mit denen sie Kontakt hat.

Jedes Organ hat seine eigene spezifische extrazelluläre Matrix, so auch der Thymus. Es liegen aber nur wenige Kenntnisse vor, welchen Einfluss die ECM im Thymus auf die Reifung der Thymozyten ausübt. Wechselwirkungen reifender Zellen mit der extrazellulären Matrix können auch im Thymus eine wichtige Rolle spielen. Für die reifenden T-Lymphozyten bietet der Thymus ein spezialisiertes „Microenvironment“. Wichtige Bestandteile dieses „Microenvironment“ sind neben extrazellulären Matrixmolekülen die Thymus-Epithelzellen, die dendritischen Zellen und die Makrophagen. Die komplexe ECM wird im Thymus meistens von den Thymus-Epithelzellen, den Endothelzellen des Blutgefäßes und dendritischen Zellen synthetisiert. Komponenten der extrazellulären Matrix können im subkapsulären, im kortikalen und im medullären Thymusbereich lokalisiert werden (Anderson et al., 1996; Villa-Verde et al., 1999; Savino et al., 2000).

Die Komponenten der extrazellulären Matrix lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine.

Kollagene sind eine der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix und besitzen eine tripel-helikale Domäne. Diese Domänen werden von drei Untereinheiten (drei α -Ketten), die ein jedes Kollagen aufbauen, geformt (Kreis & Vale, 1999). Auf Grund struktureller Merkmale können Kollagene in verschiedene Subfamilien unterteilt werden: interstitielle Kollagene vom Typ I, III und V, das mikrofibrilläre Kollagen Typ VI, netzwerkbildende Kollagene vom Typ IV und VIII sowie die Unterfamilie der Fibrillen-assoziierten Kollagene

mit unterbrochener Tripelhelix (FACITs; Kreis & Vale, 1999). Die Kollagene können adhäsive Wirkungen ausüben wie z.B. das mikrofibrilläre Kollagen Typ VI und das zur FACIT-Subfamilie gehörende Kollagen Typ XIV (Klein et al., 1995; 1997). Im humanen Thymus werden Kollagen Typ I und IV von medullären Thymus-Epithelzellen sezerniert (Savino et al., 1993), während Kollagen Typ VII von subkapsulären Thymus-Epithelzellen exprimiert wird (Virtanen et al., 1996).

Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein, das mit Glykosaminoglykan-Seitenketten kovalent verknüpft ist. Entsprechend der Disaccharid-Struktur der Glykosaminoglykan-Seitenketten lassen sich die Proteoglykane in vier Klassen einteilen: Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat (Kreis & Vale, 1999). Eine Besonderheit des Perlecan, welches ein Heparansulfatproteoglykan ist, liegt in der anti-adhäsiven Eigenschaft. Diese Eigenschaft stellt das Gegenstück zur adhäsiven Funktion zahlreicher Matrixkomponenten dar. Durch diese anti-adhäsive Aktivität kann die adhäsive Wirkung anderer Substrate, z.B. des Fibronectins, moduliert werden (Klein et al., 1994).

Zu den bekanntesten Vertretern der Glykoproteine gehören Fibronectin, Fibulin, die Tenascin-Familie und die Laminin-Familie.

Fibronectin ist ein ubiquitäres Protein der extrazellulären Matrix, welches nach differentiellem Splicen in verschiedene Isoformen unterteilt werden kann (Guan & Hynes, 1990). Es wird im Thymus von Stromazellen in einer netzartigen Form synthetisiert, wobei eine Wechselwirkung mit Thymozyten über Integrin-Rezeptoren erfolgen kann (Anderson et al., 1997; Villa-Verde et al., 1999; Dalmau et al., 1999; Savino et al., 2000; Yanagawa et al., 2001).

Fibulin ist hauptsächlich in Basalmembranen lokalisiert. Zur Fibulin-Familie gehören mittlerweile fünf Mitglieder (Fibulin-1 – Fibulin-5) (Giltay et al., 1999). Sie können an andere Proteine der extrazellulären Matrix, z.B. an Laminin-1 und Laminin-5, binden (Utani et al., 1997). Über eine Expression der Fibuline im Thymus ist noch kaum etwas bekannt.

Die Familie der Tenascine besteht aus vier Mitgliedern: Tenascin-C, Tenascin-R, Tenascin-X und Tenascin-Y (Chiquet-Ehrismann, 1995). Tenascin-C besteht aus sechs identischen Untereinheiten, weshalb es auch als Hexabrachion (HxB) bezeichnet wurde. Eine Tenascin-C-Expression konnte im humanen Thymus (Hemesath & Stefansson, 1994) nachgewiesen werden. Freitas et al. (1995) berichteten, dass Tenascin im humanen Thymus ebenso an der kortiko-medullären Grenzschicht, aber auch im medullären Thymusbereich exprimiert wird. Im Thymus der Maus konnte auch eine Tenascin-Expression detektiert werden (Ocklind et al., 1993).

1.2.1 Die Laminin-Familie

Die Laminin-Familie stellt eine Gruppe heterotrimerer Proteine dar, die aus jeweils einer α -, einer β - und einer γ -Kette besteht. Die Ketten sind untereinander durch Disulfidbrücken verknüpft und bilden eine kreuzförmige Struktur (Aumailley & Smyth, 1998; Colognato & Yurchenco, 2000). Bislang konnten beim Menschen fünf α -Ketten, drei β -Ketten und drei γ -Ketten identifiziert und charakterisiert werden. Aus diesen Ketten werden unterschiedliche heterotrimere Isoformen kombiniert, aber nicht alle theoretisch denkbaren Kombinationen werden auch realisiert. Bis heute wurden fünfzehn verschiedene Isoformen (LN1-LN15) detektiert (Colognato & Yurchenco, 2000; Libby et al., 2000). In der Tabelle 1-1 sind fünfzehn Laminin-Isoformen, teilweise mit alten Namen, und deren Ketten-Zusammensetzung dargestellt.

Laminin-Isoformen	alte Namen (1979-1994)	Ketten
Laminin 1	EHS-Laminin	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$
Laminin 2	Merosin	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
Laminin 3	S-Laminin	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
Laminin 4	Merosin/S-Laminin	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
Laminin 5	Kalinin/Nicein	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$
Laminin 6	K-Laminin	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$
Laminin 7	KS-Laminin	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$
Laminin 8		$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminin 9		$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminin 10		$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
Laminin 11		$\alpha 5\beta 2\gamma 1$
Laminin 12		$\alpha 2\beta 1\gamma 3$
Laminin 13		$\alpha 3\beta 2\gamma 3$
Laminin 14		$\alpha 4\beta 2\gamma 3$
Laminin 15		$\alpha 5\beta 2\gamma 3$

Tabelle 1-1 stellt die Laminin-Isoformen und deren Ketten-Zusammensetzung dar.

Laminin-1 wurde 1979 als Teil der extrazellulären Matrix eines Tumors (Engelbreth-Holm-Swarm Sarcoma) der Maus, der hauptsächlich Basalmembran-Komponenten synthetisiert, entdeckt (Timpl et al., 1979). Dessen allgemeine Struktur ist in Abbildung 1-2 dargestellt (Cognato & Yurchenco, 2000). Die drei kurzen Arme der kreuzförmigen Struktur von Laminin-1 werden jeweils von der α 1-, β 1- und γ 1-Kette gebildet. Die lange Arm setzt sich aus allen drei Ketten zusammen. Die globuläre Domäne G am Ende des langen Armes wird nur von der α 1-Kette geformt. Durch die Domäne G bindet Laminin-1 an seine Rezeptoren (Cognato & Yurchenco, 2000). Die Laminin-Isoformen haben die Fähigkeit zur Polymerisation, die durch die Domäne-VI vermittelt wird. Die Domäne-VI befindet sich am Ende der kurzen Arme der α 1-, β 1- und γ 1-Ketten. Diese Domäne kommt in allen Laminin-Ketten mit Ausnahmen der α 3-, α 4- und der γ 2-Kette vor (Engvall & Wewer, 1996; Cognato & Yurchenco, 2000).

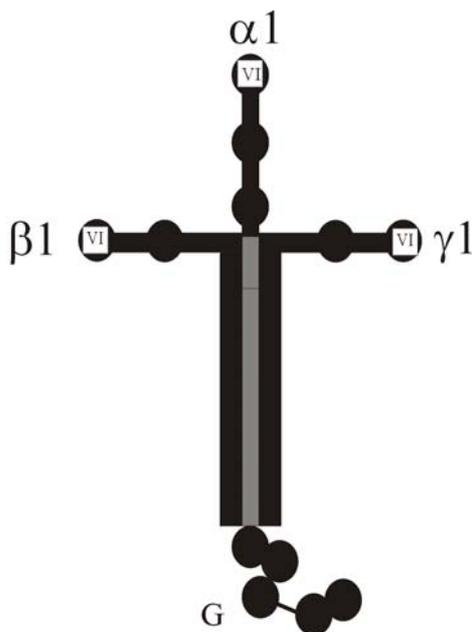


Abbildung 1-2: Schematische Struktur des kreuzförmigen Laminin-1 (modifiziert nach Cognato & Yurchenco, 2000). Laminin 1 besteht aus einer α 1-, β 1- und γ 1-Kette. Die kurzen Arme werden jeweils von den einzelnen Ketten, der lange Arm von allen drei Ketten gemeinsam gebildet.

Am Ende des langen Armes befindet sich die globuläre Domäne G, während sich die Domänen-VI am Ende der kurzen Arme aller drei Ketten befinden.

Alle Laminin-Isoformen können polymerisieren. Diese Eigenschaft hat eine biologische Funktion in der Ausbildung der Basalmembranen (Timpl, 1989). Bei der Bildung der Basalmembran assoziieren Laminin-Isoformen an ihren zellulären Rezeptoren (Henry & Campbell, 1998), was intrazellulär zu einer Assoziation der Rezeptoren mit dem Zytoskelett führt (Cognato et al., 1999). Basalmembranen bestehen aus den Hauptkomponenten Laminin, Kollagen Typ IV und Heparansulfatproteoglykan (Timpl, 1989). Viele

organspezifische Funktionen sind von den Funktionen der Basalmembran abhängig. So wird die Filtrationsrate in der Niere von der strukturellen Integrität der Basalmembran der Nierenglomeruli bestimmt (Fischer et al., 2000, Colognato & Yurchenco, 2000). In der Basalmembran des Skelettmuskels ist das Laminin Typ 2 stark exprimiert. Mutationen im Gen der darin vorliegende Laminin $\alpha 2$ -Kette führen zu Muskeldystrophie (Xu et al., 1994). Laminin-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) ist hauptsächlich in Hemidesmosomen lokalisiert und stellt ein Verbindungsglied zwischen Keratinozyten und der darunterliegenden Dermis der Haut dar (Nievers et al., 1999; Colognato & Yurchenco, 2000). Mutationen in den humanen Genen, die für Laminin-5 codieren, führen zu einer Spaltung zwischen Epidermis und Dermis der Haut, der „Epidermolysis Bullosa“ (Matsui et al., 1998).

In vitro können einzelne Laminin-Isoformen adhäsive Wirkungen und Einflüsse auf die Zellwanderung ausüben. Dies wurde unter anderem für Laminin-5 bei Ameloblastomen (Salo et al., 1999) und für Laminin-8 bei Monozyten (Pedraza et al., 2000) und Thrombozyten (Geberhiwot et al. 1999) gezeigt. Eine mitogene Wirkung konnte von Laminin-8 bei Lymphozyten (Geberhiwot et al., 2000) und von Laminin-10/11 bei CD34-positiven humanen Knochenmarkvorläuferzellen (Siler et al., 2000) nachgewiesen werden.

Unterschiedliche Resultate der Laminin-Expression wurden von verschiedenen Autoren im Thymus aufgezeigt. Mit einem polyklonalen Serum gegen EHS-Laminin (Laminin-1) zeigten Berrih et al. (1985) und Colombatti et al. (1989) Immunreaktionen in Basalmembranen im subkapsulären Epithel und an den Blutgefäßen. Chang und Mitarbeiter (1993) konnten die Laminin- $\alpha 2$ -Ketten mittels RT-PCR-Analyse im Thymus der Maus und des Menschen nachweisen, während Virtanen et al. 1996 eine Expression im humanen Thymus in der Basalmembran des subkapsulären Epithels von $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - (nur in mehrjährigem Thymus), $\alpha 3$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\gamma 1$ -Kette zeigten. In den Basalmembranen der Blutgefäße wurden die $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Kette nachgewiesen (Virtanen et al., 1996).

Im Thymus wurden bislang die Laminin-2- und Laminin-5-Isoform untersucht. Die Auswirkung von Laminin-2 auf die Differenzierung und das Überleben der Thymozyten zeigte Iwao et al. (2000) bei der Maus. In den Arbeiten von Vivinus-Nebot et al. (1999) und Kim et al. (2000) konnte eine Beeinflussung der T-Zellproliferation sowie der T-Zelldifferenzierung durch LN-5 nachgewiesen werden. Bislang liegen aber keine Kenntnisse über Wirkungen anderer Laminin-Isoformen im humanen Thymus vor, ebensowenig wie mögliche Funktionen in der Entwicklung von T-Zellen.

1.2.2 Thymome

Thymome sind epitheliale Tumore des Thymus, die als „organotypisch“ bezeichnet werden, da sie sowohl morphologisch als auch funktionell dem normalen Thymus ähneln können.

Nach der neuesten WHO-Nomenklatur, die auf histologischen Kriterien basiert, werden Thymome in die Klassen A (medulläres Thymom), AB (gemischtes Thymom) und B (kortikales Thymom) unterteilt (Müller-Hermelink & Marx, 2000). Klasse B wird noch in drei Subtypen (B1-B3) unterteilt. Als Typ C wird ein malignes Thymus-Karzinom bezeichnet, das als nicht „organotypisch“ angesehen wird (Müller-Hermelink & Marx, 2000). Eine Assoziation der Thymome mit verschiedenen autoimmunen Erkrankungen wie Myasthenia Gravis, Rheumatoide Arthritis oder Sklerodermie wurde bei Patienten individuell bemerkt (Vernino et al., 1999; Vincent et al., 1999). In Thymomen wurde die Entwicklung unreifer Thymozyten beobachtet. Thymome können somit weiterhin ein spezialisiertes Mikromilieu für die Reifung der Thymozyten, besonders von CD4⁺ T-Zellen, allerdings mit beschränkten Funktionen, bieten (Müller-Hermelink et al., 1997).

Ruco et al. (1993) berichteten über eine abnorme Expression von Fibronectin und Laminin in Typ A und AB, ohne jedoch einen Hinweis auf definierte Laminin-Isoformen zu geben. Ob es auch bei kortikalen Thymomen zu einer veränderten Matrixsynthese kommt, ist gänzlich unbekannt. Allgemein sind Untersuchungen über die Expression oder veränderte Funktionen der extrazellulären Matrix in Thymomen bislang kaum vorhanden.

1.2.3 Die Integrin-Familie

Zur Erhaltung der Gewebeorganisation sind Interaktionen zwischen den Zellen untereinander sowie mit der extrazellulären Matrix unabdingbar. Diese Interaktionen können über membranständige Zelladhäsionsmoleküle geregelt werden. Hämatopoetische Zellen exprimieren eine Vielfalt von Adhäsionsmolekülen. Auf Grund der Struktur und der funktionellen Ähnlichkeiten werden diese Adhäsionsmoleküle in vier Haupt-Familien eingeteilt: die Immunglobulinsuperfamilie, die Familie der Selektine, die Integrin-Superfamilie sowie die Cadherin-Superfamilie.

Integrine sind transmembranale, nicht kovalent gebundene heterodimere Glykoproteine, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen (Hynes, 1992). Die Integrin-Rezeptor-Familie schließt bis heute 18 α - und 8 β -Ketten ein. Sie stellen die wichtigste Klasse von Adhäsionsrezeptoren für extrazelluläre Matrixkomponenten dar. Die Integrine können während des Liganden-

Bindungsprozesses einer Konformationsänderung unterliegen, durch die die Integrine aktiviert werden. Die zytoplasmatische Domäne beider Ketten, besonders der β -Kette, hat einen wesentlichen Einfluss auf die Integrinfunktion. Hierdurch kann das Zytoskelett neu organisiert, Signale ins Zellinnere übertragen und letzt endlich die Zellmobilität reguliert werden (Hynes, 1999; Juliano, 2002). Die Unterteilung der Integrine in verschiedene Subklassen erfolgt über die β -Ketten. Die β 1- und die β 3-Subfamilien sind hauptsächlich an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt. Die β 2-Subfamilie umfasst die Leukozyten-Integrine, die ausschließlich auf Leukozyten exprimiert werden und an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind. Die β 4-Kette, die zur β 1-Subfamilie gruppiert wird, besitzt eine große zytoplasmatische Domäne, im Gegensatz zu den kurzen zytoplasmatischen Domänen anderer β -Ketten. Sie vermittelt in Hemidesmosomen Zell-Matrix-Interaktionen (Giancotti, 1996; Hynes, 1999; Juliano, 2002).

Mitglieder der Integrin-Familie und das α -Dystroglycan sind die Hauptrezeptoren für die untersuchten Laminin-Isoformen (Schulze et al., 1996; Tashiro et al., 1999; Colognato & Yurchenco, 2000; Kikkawa et al., 2000; Schober et al., 2000).

Folgende Tabelle 1-2 zeigt die bekannten Laminin-Isoformen, deren Kettenzusammensetzung, sowie deren bekannte Rezeptoren.

Laminin	Ketten	Rezeptoren
LN-1	α 1 β 1 γ 1	Integrin α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4, α 7 β 1, α v β 3, α -Dystroglycan
LN-2	α 2 β 1 γ 1	Integrin α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 4, α 7 β 1, α -Dystroglycan
LN-3	α 1 β 2 γ 1	Nicht bekannt
LN-4	α 2 β 2 γ 1	Integrin α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 4, α 7 β 1, α -Dystroglycan ,
LN-5	α 3 β 3 γ 2	Integrin α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4
LN-6	α 3 β 1 γ 1	Nicht bekannt
LN-7	α 3 β 2 γ 1	Nicht bekannt
LN-8	α 4 β 1 γ 1	Integrin α 6 β 1, α 6 β 4
LN-9	α 4 β 2 γ 1	Nicht bekannt
LN-10	α 5 β 1 γ 1	Integrin α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4
LN-11	α 5 β 2 γ 1	Integrin α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4
LN-12	α 2 β 1 γ 3	Nicht bekannt

LN-13	$\alpha 3 \beta 2 \gamma 3$	Nicht bekannt
LN-14	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 3$	Nicht bekannt
LN-15	$\alpha 5 \beta 2 \gamma 3$	Nicht bekannt

Tabelle 1-2 stellt die Laminin-Isoformen und deren Rezeptoren dar

Die Integrine $\alpha E\beta 7$ und $\alpha 4\beta 7$, die eine gemeinsame $\beta 7$ -Kette besitzen, kann man als eine eigene Subfamilie mit verwandten Funktionen im Immunsystem zusammenfassen (Belkin & Stepp, 2000). Das Integrin $\alpha E\beta 7$ wurde Ende der 80-iger Jahren auf intraepithelialen Lymphozyten im Darmtrakt entdeckt (Kilshaw & Baker, 1988). Die Integrin- αE -Kette wird auch als CD103 bezeichnet. Bislang sind Funktionen und regulatorische Mechanismen dieses Integrins nicht vollständig definiert. Das Integrin $\alpha E\beta 7$ wird auf intraepithelialen Lymphozyten in unterschiedlichen Organen wie der Lunge, der Haut, der Milz, einer kleinen Subpopulation der T-Zellen im peripheren Blut sowie in einer Subpopulation im Thymus exprimiert (Andrew et al., 1996; Agace et al., 2000; Pauls et al., 2001). Bei inflammatorischen Erkrankungen konnte z.B. bei rheumatoider Arthritis eine CD103-Expression auf intraepithelialen T-Zellen in der Synovia (Baumgart et al., 1996) oder in der Speicheldrüse beim Sjorgens's Syndrom (Fujihara et al., 1999) detektiert werden.

Der einzige bislang bekannte Ligand für das Integrin $\alpha E(CD103)\beta 7$ ist E-Cadherin. Die Integrin- $\alpha E\beta 7$ -E-Cadherin-Interaktionen spielen eine Rolle bei der Organisation des Epithels der Psoriasis-erkrankten Haut sowie der organspezifischen Lokalisierung der T-Lymphozyten in der Epidermis (Pauls et al., 2001). In CD103-defizienten Mäusen wurde die Zahl der mucosalen intraepithelialen T-Zellen reduziert und ihre regulatorische Funktion supprimiert (Schön et al., 1999). In der Haut von CD103-defizient Mäusen können inflammatorische Hauterkrankungen entstehen (Schön et al., 2000), der Mechanismus hierfür ist allerdings noch unbekannt. Die Thymozyten-Entwicklung bei CD103-defizienten Mäusen ist bislang nicht untersucht worden.

1.2.4 Die Syndecan-Familie

Neben der Integrin-Familie als die wesentlichen Rezeptoren für extrazelluläre Matrixmoleküle können auch Syndecane eine zelluläre Adhäsion an Matrixkomponenten als Ko-Rezeptoren vermitteln. Mit dieser ko-rezeptorischen Beteiligung der Syndecane kann die durch Integrine vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion moduliert werden (Woods & Couchman, 2000; Klass et al., 2000). Daneben können Syndecane auch mit der FGF-Familie (fibroblast

growth factor), anderen Zytokinen und Proteaseinhibitoren interagieren (Couchman & Woods, 1996).

Bislang sind vier Mitglieder der Syndecan-Familie, die ein gewebespezifisches Muster aufweisen, identifiziert und charakterisiert worden. Syndecan-1 (CD138) wird stark im Epithel (Couchman & Woods, 1996), Syndecan-2 (auch bekannt als Fibroglycan) auf mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten exprimiert (Bernfield et al., 1992; Couchman & Woods, 1996). Syndecan-3 (Synonym: N-Syndecan) wird im neuronalen Gewebe exprimiert (Bernfield et al., 1992; Kim et al., 1994). Syndecan-4 (Synonym: Amphiglycan oder Ryudocan) ist weniger Gewebe-spezifisch und wird in Epithel und Endothelzellen und auf Fibroblasten, Muskelzellen und Chondrozyten exprimiert (Kim et al., 1994; Couchman & Woods, 1996; Woods, 2001).

Syndecane sind integrale Membranproteine vom Typ I, die zu den Heparansulfat-Proteoglykanen gehören. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne, an welche drei bis fünf lange Heparansulfat-Glycosaminoglycan-(GAG)-Ketten kovalent gebunden sind, aus einer Transmembran-Domäne (TM) und einer zytoplasmatische Domäne (Woods & Couchman, 1998; Woods, 2001).

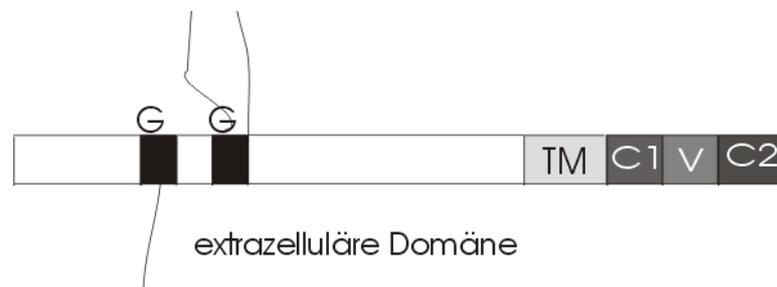


Abb. 1-3: Allgemeiner Aufbau der Syndecane (modifiziert nach Woods, 2001).

Die Syndecane bestehen aus einer extrazellulären Domäne, an welche GAG-Ketten gebunden sind, einem transmembranalen Teil (TM) und einer hochkonservierten, zytoplasmatischen Domäne, welche zwei konstante C1- und C2-Regionen und eine variable V-Region enthält.

Die kurze, hoch konservierte zytoplasmatische Domäne besitzt zwei konstante C-Regionen und eine variable V-Region, die für jeden Syndecan-Typ spezifisch ist. Über die C1- und die C2-Domäne können Syndecane mit dem Zytoskelett interagieren (Bernfield et al., 1999; Woods, 2001). Die variable V-Region definiert spezifische biologische Funktionen der Syndecane. Sie kann an PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) binden, welches das Enzym Proteinkinase $C\alpha$ durch eine Katalysierung superaktiviert. Damit wird eine Oligomerisation der V-Region oder der gesamten Syndecanproteine ermöglicht, so dass eine

fokale Adhäsion stattfinden kann. Bislang ist allerdings nur die Rolle von Syndecan-4 in der fokalen Adhäsion detailliert untersucht worden (Bernfield et al., 1999; Rapraeger, 2000; Woods & Couchman, 2001).

Syndecan-1, -2 und Syndecan-4 können durch die Bindung der extrazellulären GAG-Ketten an Heparan-Bindungsstellen von Matrixkomponenten Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln (Woods & Couchman, 1998; Bernfield et al., 1999; Woods, 2001). Syndecan-1 ist das einzige Mitglied der Syndecan-Familie, bei dem eine Assoziation mit der G-Domäne der Laminin α 1- und α 2-Kette nachgewiesen wurde (Hoffman et al., 2001). Syndecan-1 ist essentiell für den Phänotyp des Epithels, es kann die epitheliale Morphogenese, aber auch die Adhäsion von Bakterien und die Zellproliferation regulieren und ist zudem an der Wundheilung beteiligt (Woods & Couchman, 1998; Bernfield et al., 1999).

Seine Präsenz im blutbildenden System wurde bereits beschrieben. Unreife B-Lymphozyten und Antikörper-produzierende Plasmazellen exprimieren Syndecan-1, zirkulierenden B-Zellen hingegen zeigen keine Expression von Syndecan-1 (Woods, 2001). Auf malignen Myelomzellen wird Syndecan-1 ebenfalls stark exprimiert. Bei Myelompatienten wird Syndecan-1 im Serum gefunden, weshalb es als prognostischer Marker des Multiplen Myeloms dienen kann (Seidel et al., 2000).

Über eine Expression der Syndecane im Thymus und ihre eventuelle Rolle an der Thymozyten-Entwicklung als Ko-Rezeptoren der Integrin-Laminin-Bindung ist noch nichts bekannt.

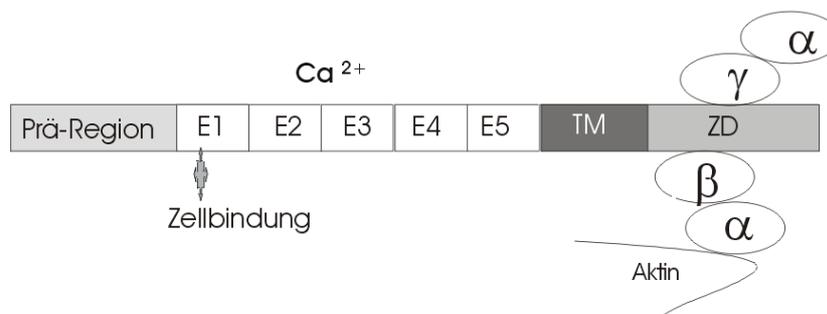
1.3 Die Cadherin-Familie

Cadherine stellen eine große Glykoprotein-Familie dar, die zu den Calcium-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen gehören und Zell-Zell-Interaktionen vermitteln (Takeichi, 1991). Sie spielen eine bedeutende Rolle bei fundamentalen Prozessen in der embryonalen Entwicklung und Histogenese, bei der Tumorgenese und bei der Gewebeerhaltung (Takeichi, 1993; Suzuki, 1996a).

Auf Grund ihrer Struktur werden die Cadherine in sechs verschiedene Genklassen eingeteilt: in die klassischen Cadherine Typ I und Typ II, in desmosomale Cadherine, in Cadherine mit verkürzter zytoplasmatischer Domäne, in die Protocadherine sowie in die Cadherin-verwandten Proteine (Suzuki, 1996a; 1996b). Zu den klassischen Cadherinen vom Typ I gehören E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin und R-Cadherin. Sie wurden ursprünglich als

Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 120 bis 140 kDa identifiziert und bekamen ihren Namen nach den Geweben, in denen sie zuerst detektiert wurden oder am häufigsten exprimiert sind. So wurde E-Cadherin auf Epithelzellen, N-Cadherin im neuronalen System, P-Cadherin in der Plazenta und R-Cadherin in der Retina gefunden (Geiger & Ayalon, 1992; Ranscht, 1994).

Die klassischen Cadherine bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne mit fünf strukturellen Cadherin-Motiven von ca. 100 Aminosäuren, einer transmembranalen Region und einem konservierten zytoplasmatischen Segment. Alle klassischen Cadherine haben gemeinsame Cadherin-spezifische Motive der extrazellulären Domäne, die aus mehreren Sequenzen, die sich wiederholen, bestehen („Cadherin-Repeat“). In der ersten Cadherin-Domäne EC1 findet sich die Bindungsstelle für Zell-Zell-Interaktionen. Das HAV-Motiv (**H**istidin-**A**lanin-**V**alin) in der ersten Cadherin-Domäne ist direkt an den adhäsiven Interaktionen beteiligt, es wurde allerdings nur bei einigen Cadherinen gefunden (Ranscht, 1994). Calcium-Bindungsstellen und Glykosylierungsstellen befinden sich in den Domänen EC2 bis EC4. Der zytoplasmatische Teil besitzt eine hochkonservierte Domäne von ca. 150 AS, die mit den zytoplasmatischen Cateninen (α , β und γ) assoziiert ist. Die Catenine können mit dem Aktin des Zytoskeletts interagieren und diese Bindung ermöglicht die Verknüpfung der Cadherine mit dem Zytoskelett (Kemler, 1993).



*Abbildung 1-4: Allgemeiner Aufbau der Cadherine (modifiziert nach Ranscht, 1994)
Die klassischen Cadherine vom Typ I bestehen aus fünf extrazellulären Domänen (EC1-EC5), einem transmembranalen Teil (TM), und einer hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne (ZD), welche an das Aktin des Zytoskeletts gebunden ist.*

Die Assoziation mit α -, β - und γ -Cateninen ist für die Zelladhäsionsfunktion der Cadherine notwendig (Kemler, 1993). Das α -Catenin ist ein Homologes des zytoplasmatischen Moleküls Vinculin und bindet über α -Aktinin an die Aktinfilamente des Zytoskeletts (Knudsen et al., 1995). Cadherine können mit β - oder γ -Catenin zwei unterschiedliche Komplexe bilden, mit denen α -Catenin assoziiert ist. Die Bildung des Cadherin- α - β -Catenin-Komplexes ist von

essentieller Bedeutung für die Cadherin-Funktion; das Fehlen eines Catenins oder der zytoplasmatischen Domäne des Cadherins kann zum Verlust der adhäsiven Funktion führen (Ranscht, 1994).

1.3.1 Die funktionelle Bedeutung der Cadherine

Die wichtigsten Funktionen, die den Cadherinen heute zugeordnet werden, sind Zellsortierungsmechanismen während der embryonalen Entwicklung, Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität sowie Beteiligung bei Signalübertragung in der Zelle (Knudsen et al., 1998; Gumbiner, 2000).

E-Cadherin, früher auch Uvomorulin genannt (Vestweber et al., 1987), wird bereits früh im Morula-Stadium exprimiert. Es bildet in erster Linie homotypische Zellkontakte und vermittelt die Adhäsion von Epithelzellen aneinander (Takeichi, 1991). Neben der homotypischen Zell-Zell-Interaktionen wurden auch homophil-heterotypische Interaktionen beobachtet, wobei aus dem Knochenmark stammende Langerhans-Zellen der Epidermis über E-Cadherin an Keratinozyten adhäreren (Tang et al., 1993). Die erste Beobachtung heterophil-heterotypischer Zell-Bindungen war eine Interaktion zwischen $\alpha E\beta 7$ -Integrin auf intraepithelialen Lymphozyten und E-Cadherin auf Darmepithelzellen (Cepek et al., 1994). Dies war die erste Ausnahme der Regel, dass Cadherine nur an Cadherine binden können.

E-Cadherin hat eine herausragende Bedeutung als Tumorsuppressorgen erlangt. Bei Karzinomen der Haut, Prostata und des Magen/Darmtrakts kann E-Cadherin deutlich herunterreguliert sein. Die Stärke der Expression kann umgekehrt proportional mit der Invasivität des Tumors korreliert sein (Takeichi, 1993; Wijnhoven et al., 2000).

Im Maussystem wurde die E-Cadherin-Expression auf Thymus-Epithelzellen und auf unreifen pränatalen CD4⁺/CD8⁻ DN Thymozyten detektiert, weshalb eine Interaktion zwischen E-Cadherin-exprimierenden Zellen denkbar war (Lee et al., 1994). Müller und Mitarbeiter (1997) konnten bei einer pränatalen Thymus-Organkultur mit Antikörper gegen E-Cadherin eine homophile Interaktion inhibieren, wobei diese Inhibition eine Wirkung auf die frühe Thymozyten-Entwicklung und Organisation des Epithels hatte. Dies deutet auf eine mögliche Rolle in der T-Zell-Entwicklung bei Mäusen hin. Bisher ist allerdings nicht bekannt, welche Funktionen von E-Cadherin-Interaktionen in der Entwicklung von humanen T-Zellen eine Rolle spielen. Auch an der Bildung von Erythrozyten ist E-Cadherin beteiligt. So kann durch Zugabe funktionsblockierender Antikörper gegen E-Cadherin die Erythropoese *in vitro* inhibiert werden (Armeanu et al., 1995).

N-Cadherin wird im Neuralgewebe und Muskelgewebe exprimiert. Es spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung (Takeichi, 1995). Während der Mesodermbildung verlieren ektodermale Zellen E-Cadherin und falten sich nach innen. In der Phase der Neurulation verändert sich das Expressionsmuster in der Neuralplatte. Die Expression von E-Cadherin nimmt ab, dafür wird N-Cadherin stärker gebildet und die Neuralleiste entsteht. N-Cadherin hat somit eine lebenswichtige Bedeutung als morphoregulatorisches Molekül für die Differenzierung, Teilung und Migration von Embryonalzellen (Takeichi, 1991). Bei der Tumorgenese kann N-Cadherin hochreguliert werden und die Adhäsion von Karzinomzellen an Stromazellen vermitteln. Damit fördert es die Bildung von Tumorzellaggregaten und die Assoziation mit umliegenden Stromazellen (Hazan et al., 1997). N-Cadherin kann hierbei als dynamisches Zelladhäsionsmolekül betrachtet werden, weil seine starke Expression die Migration und Metastasierung der Tumorzellen fördert (Hazan et al., 2000). N-Cadherin wurde auch auf frühen Vorläuferzellen des Knochenmarkes gefunden. In dieser Studie konnte durch die Expression von N-Cadherin ein neuer Vorläuferzelltyp der hämatopoetischen Zellen identifiziert werden (Puch et al., 2001).

Die Expression von N-Cadherin und eine mögliche Rolle bei der Organisation des Epithels im humanen Thymus wurde bislang nicht untersucht, genau sowenig wie die des P-Cadherins. Plazentäres P-Cadherin wird kaum in der humanen Plazenta exprimiert. P-Cadherin kann die Expression von E-Cadherin in Epithelien unterschiedlicher Geweben begleiten, z.B. im Epithel der Prostata, des Darmtraktes und der Lungen. Bei verschiedenen Lungenkarzinomen korreliert die P-Cadherin-Expression mit dem Zelldifferenzierungsgrad. Dies lässt auf eine Rolle in der Tumorgenese schließen (Shimoyama et al., 1989).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die lokale Verteilung verschiedener Laminin-Isoformen und einzelner Cadherine in humanen Thymus sowie ihre Bedeutung für die Entwicklung humaner T-Zellen war das Hauptziel dieser Arbeit.

Die Expression verschiedener Laminin-Ketten sollten mittels Immunfluoreszenz-Färbungen im humanen Thymus untersucht werden. Weiterhin sollten für diese Studien unterschiedliche Thymozytensubpopulationen isoliert werden und deren Interaktionen mit verschiedenen Laminin-Isoformen geprüft werden. Hierbei sollte geklärt werden, ob definierte Laminin-

Isoformen eine adhäsive Wirkung oder einen mitogenen Effekt auf isolierte Thymozyten zeigen. Darüber hinaus sollte die Verteilung verschiedener Integrin-Ketten auf unterschiedliche Thymozytensubpopulationen bestimmt und durch Inhibitionsstudien mit funktionsblockierenden Antikörpern die jeweils verantwortlichen Laminin-Rezeptoren bestimmt werden.

Die Expressionen unterschiedlicher Laminin-Ketten wurde auch in Thymomen untersucht. Nach dem Expressionsmuster der Laminin-Ketten sollten Laminin-Isoformen in verschiedenen Thymomen bestimmt und mit der Laminin-Expression im gesunden Thymus verglichen werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Expression von Syndecan im Thymus. Integrine sind wesentliche Rezeptoren für die ECM, jedoch können Syndecane als Ko-Rezeptoren beteiligt sein. Es sollte deshalb geprüft werden, ob bestimmte Thymozytensubpopulationen auch eine Expression von Syndecan zeigen. Weiterhin sollte diese neue Thymozytensubpopulation charakterisiert werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden zum einen primäre Thymus-Epithelzellenkulturen etabliert und phänotypisiert. Hierbei sollten ihre Interaktionen mit verschiedenen Thymozytensubpopulationen in funktionellen Versuchsansätzen überprüft werden. Zum anderen sollte die Expression von klassischen Cadherinen auf etablierten Thymus-Epithelzellen untersucht werden. Gegebenenfalls sollte in einem *in vitro* System geprüft werden, ob sich eine biologische Funktion der Cadherine im Hinblick auf heterophil-heterotypische Interaktionen nachweisen lässt. Neben der adhäsiven Funktion können Cadherine auch signalübertragende Wirkung haben. Deshalb war auch der Einfluss der Cadherine auf die Proliferation der reifenden Thymozyten von Interesse. Weiterhin wurde mit Thymusgewebeproben unterschiedlichen Alters auch eine entwicklungsabhängige Expression der klassischen Cadherinen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturen und Gewebeproben

2.1.1 Zellkulturmedien

Die verwendeten Zellkulturmedien und deren Zusätze wurden von GIBCO BRL (Eggenstein) und BIOCHROM KG (Berlin) bezogen. Fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Für die Kultur der Zelllinien wurde RPMI 1640 Glutamax ITM mit 25mM HEPES benutzt, angereichert mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die primären Thymus-Epithelzellen wurden entweder in OPTIMEM I mit GLUTAMAX I (Serumreduziertes Medium) ohne Zusätze oder in MEM (Minimum Essential Medium) D-Valin Medium kultiviert. Das in diesem Medium enthaltene D-Valin (92 mg/ml) an Stelle von L-Valin ermöglicht das Wachstum von Epithelzellen und hemmt selektiv die Fibroblastenproliferation. MEM D-Valin Medium wurde zusätzlich mit 5% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 10 mM L-Glutamin und 25 mM HEPES (PAN-System, Aidenbach) angereichert.

Die Zellen wurden in Einfriermedium, das aus Zelllinienmedium mit 20% FCS und 10% DMSO besteht, eingefroren.

2.1.2 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% Kohlendioxid in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert.

2.1.3 Passagieren von Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes mit 0.02% Trypsin und 0.75% EDTA abgelöst. Bevor sich die Zellen vollständig abgelöst hatten, wurde sie mit PBS gewaschen. Die enzymatische Reaktion von Trypsin wurde durch Aufnahme der Zellen in kaltem Zelllinienmedium mit FCS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei

150 xg zentrifugiert, in PBS gewaschen, in Zellkulturmedium verdünnt und erneut ausgesät. Die Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche passagiert.

2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^6 pelletiert, in Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen (Greiner, Frickenhausen) pipettiert. Die Zellsuspension wurde in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene, Rochester) mit einer konstanten Abkühlung von 1°C pro Minute bis -80°C tief eingefroren. Nach einigen Tagen wurde die Zellsuspension in einen mit Stickstoff befüllten Tank für die langfristige Aufbewahrung bei -196°C umgelagert.

Im Stickstoff aufbewahrte Aliquote wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. 1 ml Zellsuspension wurde in 9 ml vorgewärmtes Medium überführt und fünf Min bei 150 xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert, um das toxische DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und unter den oben angegebenen Bedingungen kultiviert.

2.1.5 Zelllinien

Innerhalb dieser Arbeit wurde die humane Epithelkarzinomzelllinie A431 verwendet. Sie wurde von ATTC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) bezogen.

2.1.6 Gewebeproben

Als Ausgangsmaterial für die unterschiedliche Expressions- und Funktionsanalysen wurde Thymusgewebe (< 13 Jahre) verwendet. Nach Einwilligung der Eltern der Patienten konnte Thymusgewebe, das bei notwendigen chirurgischen Eingriffen entfernt wurde, unserem Labor zur Verfügung gestellt werden.

Die Thymomschnitte haben wir von Dr. med. P. Ströbel (Pathologisches Institut der Universität Würzburg) erhalten.

2.1.7 Isolierung von Thymozyten

Thymozyten konnten nach Zerkleinerung und Ausspülung mit PBS aus dem Thymusgewebe isoliert werden. Nachdem die Thymozyten bei 150 xg pelletiert wurden, wurden sie in PBS aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:3 auf vorgelegtes Ficoll-Kissen (Dichte 1.077 g/ml, Biochrom, Berlin) pipettiert und bei mittlerer Beschleunigung ungebremst 20 min bei 1500 xg zentrifugiert. Im Pellet befanden sich hauptsächlich tote Zellen und Erythrozyten, aus der Interphase zwischen Ficoll und PBS konnten die Thymozyten isoliert werden. Die Thymozyten wurden zweimal mit PBS gewaschen, bei 150 xg pelletiert und in einer Neubauerkammer ausgezählt.

2.1.8 Etablierung und Kultivierung primärer Thymus-Epithelzellen

Primäre Thymus-Epithelzellen wurden nach einem Protokoll von Röpke (1997) etabliert und kultiviert.

Thymusgewebe wurde in einer Petrischale (10 cm, Greiner, Frickenhausen) mit vorgelegtem RPMI 1640 Medium in kleine, 0.5 cm³ Stücke mit sterilisierten Scheren geschnitten und in Falcon-Röhrchen überführt. Die Gewebestücke wurden mit 1 mg/ml Collagenase A (Roche, Mannheim) und DNase I 50µg/ml (Roche) in RPMI 1640 für 45 min bei 37°C schüttelnd verdaut. Nach dem Verdau ließ man die Gewebefragmente für 5 min bei RT sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen. Die sedimentierte Gewebefragmente wurden erneut mit Collagenase A und DNase I für 30 min bei 37°C verdaut. Die durch den Verdau gewonnene Zellen wurden durch ein Zellsieb (40µm, BD Bioscience, Heidelberg) gegeben, in 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt und mit RPMI 1640 gewaschen. Die Zellsuspension ließ man 10 min sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierte Zellen wurden erneut mit RPMI gewaschen und es erfolgte eine weitere Sedimentation. Das Zellsediment wurde zweimal in PBS gewaschen und bei 150 xg 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet für die Thymus-Epithelzellkultur entweder in OPTIMEM I auf Kollagen Typ I beschichtete Petrischalen (BD Falcon, Heidelberg) oder in MEM D-Valin Medium auf Kollagen Typ IV (BD Falcon, Heidelberg) beschichtete Petrischalen ausplattiert. Jeden dritten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach vier bis acht Wochen konnte man die Bildung eine einschichtigen Epithelzellkultur, die bis zu 90% konfluent war, beobachten.

2.2 Antikörper

2.2.1 Primärantikörper

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper aufgelistet.

CD-Marker	Klon/Spezies	Hersteller
CD3-MB	Maus IgG2a	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD3-PE	Klon UCHT1 / Maus IgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD4-MB	Klon SK3 / Maus IgG1	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD4-FITC	Klon B-F5 / Maus IgG1	DPC-Biermann, Bad Nauheim
CD4-PE	Klon B-F5/ Maus IgG1	DPC-Biermann, Bad Nauheim
CD8-MB	Klon SK1 / Maus IgG1	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD8-FITC	Klon MCD8 / Maus IgG1	DPC-Biermann, Bad Nauheim
CD29	Klon 4B4 / Maus IgG1	Coulter, Hamburg
CD29	Klon TDM29/ Maus IgG1	Chemicon, Hofheim
CD31	Klon HC1/6 / Maus IgG1	Dianova, Hamburg
CD49c	Klon P1B5 /Maus IgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD49c-PE	Klon C3 II.1 /Maus IgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD49f	Klon GoH3 / Ratte IgG2a	BD Pharmingen, Heidelberg
CD49f-FITC	Klon 4F10 / Maus IgG2b	DPC-Biermann, Bad Nauheim
CD103	Klon 2G5.1 / Maus IgG2a	Serotec-Biozol, Eching
CD104	Klon 439-9B / Maus IgG2b	Dianova, Hamburg
CD104-FITC	Klon 450-9D / Maus IgG1	DPC-Biermann, Bad Nauheim
CD138-PE	Klon B-B4 / Maus IgG1	DPC-Biermann, Bad Nauheim
CD138-MB	Klon B-B4 / Maus IgG1	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Cadherine und Catenine		
E-Cadherin	Klon HECD-1/Maus IgG1	R&D System, Wiesbaden
E-Cadherin	Klon 67A4 / Maus IgG1	Dr. H. J. Bühring, Med. Klinik, Tübingen
N-Cadherin	Klon GC-4/Maus Ascites, IgG1	Sigma, Deisenhofen

N-Cadherin	Klon 8C11/Maus Ascites	Dr. M. Wheelock, Toledo University, Ohio, USA
P-Cadherin	Klon NCC-CAD 299	Dr. Hirohashi, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan
α -Catenin	polyklonal / Kaninchen	Sigma, Deisenhofen
α -Catenin	Klon 5 / Maus IgG1	Transduction Laboratories, Lexington, USA
β -Catenin	polyklonal / Kaninchen	Sigma, Deisenhofen
β -Catenin	Klon 14 / Maus IgG1	Transduction Laboratories, Lexington, USA
γ -Catenin	Klon 15/ Maus IgG1	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Laminin-Ketten		
Laminin α 1-Kette	Klon EB7 / Maus	Prof. Dr. I. Virtanen, Institute of Biomedicine, Helsinki, Finland
Laminin α 2-Kette	Klon 4H8-2 / Ratte	Prof. Dr. L. M. Sorokin, Universität Erlangen-Nürnberg
Laminin α 2-Kette	Klon 0411 / Maus IgG1	Biomol, Hamburg
Laminin α 3-Kette	Klon BM165 / Mouse IgG1	Dr. P. Rousselle, Institut de Biologie et Chimie, Lyon, France
Laminin α 4-Kette	377 / Kaninchen	Prof. Dr. L. M. Sorokin
Laminin α 4-Kette	anti-P3 / Kaninchen	Dr. Richards, University of Cambridge, UK
Laminin α 5-Kette	Klon 4C7 / Maus IgG1	Life Technologies, Eggenstein
Laminin β 1-Kette	Klon MCT402 / Maus IgG1	Life Technologies, Eggenstein
Laminin β 2-Kette	Klon C4 / Maus IgG1	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA
Laminin β 3-Kette	Klon 6F12 / Maus IgG1	Dr. P. Rousselle, Institut de Biologie et Chimie, Lyon, France
Laminin γ 1-Kette	Klon D18 / Maus IgG1	Developmental Studies Hybridoma Bank, , University of Iowa, USA
Laminin γ 2-Kette	Klon D4B5 /Maus IgG1	Chemicon, Hofheim
LN-1	ISH2 / Kaninchen	PD Dr. G. Klein, Med. Klinik, Tübingen

LN-10/11	EH6B01 / Kaninchen	Life Technologies, Eggenstein
Andere		
TE3	Maus IgG2	ATCC, Manassas, USA
TE4	Maus IgM	ATCC, Manassas, USA
HLA-DR	TÜ 36 W6/32. HL, IgG1	Prof. Dr. C. Müller, Med. Klinik, Tübingen
TCR α/β -FITC	Klon T10B9.1A-31/ Maus IgM	BD PharMingen, Heidelberg
TCR γ/δ -FITC	Klon B1 / Maus IgG1	BD PharMingen, Heidelberg
Isotypkontrollen		
IgG1-PE/IgG2b- FITC	Klon MCG1 / Maus IgG1 Klon MCG2b / Maus IgG2b	DPC-Biermann, Bad Nauheim

Tabelle 2-1 Verwendete Primärantikörper

In dieser Arbeit wurden unkonjugierte, Fluorochrom-konjugierte (FITC-konjugiert bzw. PE-konjugiert) und Magnetpartikel (MB)-konjugierte Antikörper eingesetzt.

2.2.2 Sekundäre Antikörper

In Tabelle 2-2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper aufgelistet.

Anti-Maus-AP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen-AP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus-IgM-Cy2	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG (Fab ₂)-FITC	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG1-FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Maus-IgG1-PE	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Maus-IgG2a-PE	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Maus-IgG2a-FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Maus-IgG2a+b-MB (Magnetpartikel)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Tabelle 2-2 Zusammenstellung der verwendeten Zweitantikörper

2.3 Extrazelluläre Matrixproteine

Für Zellbindungsstudien wurden verschiedene Laminin-Isoformen benutzt. Laminin-1, aus dem EHS-Tumor der Maus isoliert, wurde von Biozol (Eching) bezogen. Laminin-5 wurde aus dem Überstand von Zelllinie SCC25 (Squamous Cell Carcinoma) aufgereinigt und von Dr. P. Rousselle (Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Lyon, France) zur Verfügung gestellt. Humanes Merosin wurde mittels Ionen-Austausch-Chromatographie aus der Plazenta isoliert und enthält die Isoform die Laminin-2/4. Laminin-10/11 wurde durch Affinitätschromatographie mit dem Antikörper 4C7 aufgereinigt. Sowohl LN-2/4 als auch LN-10/11 waren kommerziell von die Firma Life Technologies (Eggenstein) erhältlich.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen aus Extrakten primärer Thymus-Epithelzellen oder Thymusgewebe nach ihrem Molekulargewicht wurden 10% SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Zur Herstellung der Lysate primärer Thymus-Epithelzellen wurde die gebildete Epithelzellkultur mit PBS gewaschen, bevor 650 µl Lysepuffer pro Petrischale zugegeben wurde. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurde das Zellysat 10 min bei 13000 rpm, 4°C zentrifugiert, um Zellkerne und Zelltrümmer zu entfernen. Bei den Gewebextrakten wurde Thymusgewebe mit dem Skalpell zerkleinert, in 1.5 ml Lysepuffer aufgenommen, nach einer einstündigen Inkubation auf Eis mit einem Ultraschall (Sonifer® B-12, Danbury, USA) für 2 min homogenisiert. Danach wurde das homogenisierte Gewebe für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden 1:5 mit Probenauftragspuffer versetzt und fünf min bei 95°C im Heizblock aufgeköcht. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Gelkammer Mighty Small (Hoefer, San Francisco, USA) für 90 min mit einer Stromstärke von 40 mA pro Gel. Als Molekulargewichtsstandard wurde der mit Farbstoffen markierte „Rainbow-Marker“ von Amersham-Pharmacia Biotec (Freiburg) verwendet.

In Tabelle 2-3 ist eine Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien dargestellt.

TBS	25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl pH 7.4
Lysepuffer	TBS, 2mM CaCl ₂ , 1% Triton X-100, 1% NP-40, 1mM PMSF, 1µg/ml Aprotinin
Trenngel	10% Acrylamid, 0.05% Bisacrylamid, 0.375 M Tris pH 8.8, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.03% Ammoniumpersulfat, 0.2% TEMED
Sammelgel	4% Acrylamid, 0.2% Bisacrylamid, 0.125 M Tris pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.05% Ammoniumpersulfat, 0.3% TEMED
Probenauftragspuffer (5x)	250 mM Tris pH 6.8, 500 mM DTT, 10% SDS, 0.5% Bromphenolblau, 50% Glycerol
Laufpuffer	50 mM Tris pH 6.8, 380 mM Glycin, 0.1% SDS

Tabelle 2-3 verwendete Reagenzien für SDS-PAGE

2.4.2 Coomassie Brillant Blue Färbung

Coomassie Brillant Blue R-250 eignet sich als sensitiver Farbstoff hervorragend dazu, Proteinbanden im SDS-Gel sichtbar zu machen. Die Gele wurden in der Färbelösung unter leichtem Schütteln für eine Stunde inkubiert und anschließend in der Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden deutlich sichtbar geworden wurden. Die Gele wurden für eine weitere Stunde in Easy-Breeze geschwenkt und in einem Gelrahmen zwischen zwei Zellophanfolien (Roth, Karlsruhe) getrocknet.

Färbelösung	0.05% Coomassie Brillant Blue R-250, 50% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärbelösung	50% Methanol, 10% Essigsäure
Easy-Breeze	40% Ethanol, 0.5% Glycerin

Tabelle 2-4 verwendete Lösungen für Coomassie Brillant Blue Färbung

2.4.3 Affinitätschromatografie

Zur Aufreinigung von TE3-Antikörper aus Hybridoma-Überständen wurde eine 1 ml HiTrap[®] Protein-G-Sepharose-Säule von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Protein-G, das aus Streptokokken gewonnen wird, bindet an den Fc-Teil der Immunglobuline. Die Vorgehensweise richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte mit Hilfe einer UV-Zelle mit angeschlossenem Detektor. Vor dem Auftrag des Hybridoma-Überstandes wurde die Säule mit Startpuffer (20 mM NaHPO₄) gewaschen. 350 ml Überstand wurde mit 150 ml Startpuffer verdünnt und im Ringschluss auf die Säule aufgetragen. Nach Zirkulation über Nacht wurde die Säule mit PBS gewaschen, bis nicht gebundene Antikörper ausgewaschen waren. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper mit 0.1 M Glycin pH 3 in mehreren Fraktionen eluiert und mit 0.75 M Tris pH 8.8 neutralisiert. Die Säule wurde anschließend mit PBS und dann mit 20% Ethanol gewaschen und konnte bei 4°C gelagert werden.

2.4.4 Biotinylierung von Antikörpern

Für die Biotinylierung aufgereinigter TE3-Antikörper wurde Biotin-XX-NHS von Calbiochem, Bad Soden, verwendet. Die Antikörper wurden mit Biotin durch eine einstündige Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln gekoppelt. Die Biotinylierung erfolgte durch eine Reaktion reaktiver Aminoradikale des Biotin-XX-NHS.

In 200µl frische hergestellte Proteinlösung in PBS mit einer Konzentration 1.5-2.0 mg/ml wurde 1µl Biotin-XX-NHS (aufgelöst in DMSO mit der Konzentration 12.5 mg/ml) gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 200 µl eiskaltem RPMI 1640 Medium gestoppt. Nicht gebundenes Biotin wurde mit Hilfe der Gel-Filtration durch eine Sephadex G-25 Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg) entfernt. Auf eine mit PBS äquilibrierte Säule wurden die 400µl der Biotinylierungsprobe aufgetragen. Anschließend konnten die biotinylierten Antikörper mit 680 µl kaltem PBS, angereichert mit 0.75% BSA, eluiert und in Fraktionen zu je 100 µl gesammelt werden.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Western Blot-Analyse

Mit Hilfe von Western Blot Analysen konnten definierte Proteine aus Thymusgewebe und Extrakten primärer Thymus-Epithelzellen nachgewiesen werden. Die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden entweder durch Semidry-Blotting oder Naßblotting auf eine Nitrozellulosemembran (\varnothing 0.2 μm , Schleicher&Schuell, Dassel) übertragen. Für den Transfer wurden die Membran, das Gel und Whatmann 3 MM Papiere entweder in 10 mM CAPS pH 11 für das Semidry-Blotting oder in Transfer-Puffer für das Naßblotting getränkt. Der Transfer erfolgte mit 0.8 mA/cm² für 1.5 Stunde, und seine Vollständigkeit wurde anhand des Transfers des Rainbow-Markers überprüft.

Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden mit Blockierungslösung entweder 1 Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C blockiert. Die Membran wurde danach 1 Stunde bei RT mit dem Erstantikörper, der in der Blockierungslösung verdünnt wurde, inkubiert, und danach dreimal für 10 min mit TTBS gewaschen. Für eine weitere Stunde bei RT wurde die Membran mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpern, die auch in der Blockierungslösung 1:400 verdünnt wurden, inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TTBS wurde die Alkalische-Phosphatase-Färbung mit FAST BCIP/NBT (Sigma, Deisenhofen) entwickelt.

TTBS	TBS+ 0.1% Tween 20
Transfer-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver in TTBS

2.5.2 Nicht-radioaktive Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation unterscheidet sich vom Western Blot dahingehend, dass der eingesetzte Antikörper an das native Protein binden kann. Dabei ist auch eine Kopräzipitation möglich. Miteinander assoziierte Proteine sind mit dieser Methode nachweisbar.

In der nicht-radioaktiven Immunpräzipitation wurde zu 1ml der gewonnenen Lysate, (wie unter in 2.4.1 beschrieben) 100 μl Protein-A-Sepharose (4B Fast Flow, Sigma, Deisenhofen),

1:1 mit Waschpuffer 1 gemischt, zugegeben und unter ständigen Drehen 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Durch diese Vorinkubation, dem sogenannten „preclearing“, werden unspezifische Bindungen an die Protein-A-Sepharose entfernt. Danach erfolgte eine zehninütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm. 5-10 µl Antikörper wurde zu dem aliquotierten Überstand gegeben und rotierend 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden 75 µl Protein-G-Sepharose (4B Fast Flow, 1:1 mit Waschpuffer 1 vermischt, Sigma, Deisenhofen) pro Ansatz zugesetzt und erneut 1 Stunde inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Antikörper durchgeführt. Die mit Protein-G-Sepharose präzipitierten Immunkomplexe wurden 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und danach dreimal mit Waschpuffer 1 und zweimal mit Waschpuffer 2 gewaschen. Die Sepharose wurden anschließend mit Probenauftragspuffer versetzt, fünf min auf 95°C erhitzt und die gelösten Präzipitate einer SDS-PAGE mit anschließenden Western Blot unterzogen.

IP-Waschpuffer 1	TBS, 1mM CaCl ₂
IP-Waschpuffer 2	0.125 M Tris pH 6.8

2.5.3 Indirekte Immunfärbung

2.5.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Expressionsanalysen direkt im Gewebe oder auf primären Thymus-Epithelzellen konnten mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden. Thymusgewebe wurde in einem Einbettmedium für Kryostatschnitte (Fa. Jung, Nussloch) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 5µm dicke Gefrierschnitte am Kryotom (Modell: 2700-Frigocut, Reichert & Jung, Heidelberg) angefertigt. Die luftgetrockneten Gefrierschnitte konnten bis zu 6 Wochen bei -20°C aufbewahrt werden. Für Immunfluoreszenzfärbungen primärer Thymus-Epithelzellen wurden diese Zellen in „8-Well Chamber CultureSlides“, beschichtet mit Kollagen Typ I (BD Falcon, Heidelberg), kultiviert.

Zu untersuchende Präparate wurden 5 min bei -20°C mit Methanol oder Aceton fixiert und danach zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT in einer dunklen, feuchten Schale mit den Erstantikörpern, verdünnt in PBS mit 0.1 % BSA. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Präparate mit dem Fluorochromgekoppelten Zweitantikörper, der gegen die Spezies der Erstantikörper gerichtet war, erneut in einer dunklen, feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Zur Anfärbung der DNA der

Zellkerne wurde der Zweitantikörperlösung 1 µg/ml DAPI (Roche, Mannheim) zugesetzt. Im Anschluss an drei Waschschrte mit PBS wurden die Thymusschnitte oder die primären Epithelzellen mit Elvanol, dem zur Fluoreszenzstabilisierung DABCO (Merck, Hohenbrunn) zugesetzt wurde, eingedeckelt.

Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen), das über eine digitale Kamera verfügte, die mit einem Computer verbunden war, unter Verwendung der Software ANALYSIS Doku® (Firma SIS, Leinfelden) ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte auch mit der Hilfe von Diafilmen EPL 400.

2.5.3.2 *Peroxidase-DAB-Färbung*

Das DAKO EnVision™+ System (DAKO Diagnostika, Hamburg) basiert auf einer Kopplung zwischen Enzymmolekülen (z. B. Meerrettichperoxidase oder Alkalische Phosphatase) und spezifischen Sekundärantikörpern mit einem Dextran-Rückgrat. Durch das gleichzeitige Vorhandensein von Sekundärantikörpern und mehreren Enzymmolekülen auf diesem löslichen Polymer wird die Sensitivität der Färbung erhöht. Peroxidase-DAB-Färbungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Aceton-fixierte Thymusgefrierschnitte (10 min bei -20°C) wurden für 5 min bei RT mit Peroxidase-Blockierungslösung (DAKO) inkubiert und danach zweimal für 3 min mit TBS/2mM CaCl₂ gewaschen. Es folgte eine 30minütige Blockierung der endogenen Peroxidase mit Normalserum (DAKO), drei Waschschrte mit TBS/2mM CaCl₂ für 5 min und eine Inkubation mit Primärantikörper für eine halbe Stunde bei RT. Nach erneuten Waschschrten wurden die Gewebeschnitte mit Peroxidase-gekoppeltem spezifischem Sekundärantikörper für eine weitere halbe Stunde inkubiert. Im Anschluss an drei Waschschrte mit TBS/2mM CaCl₂ wurden die Präparate mit einem Chromogen-Substrat (DAB-3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) für 10 min im Dunkeln inkubiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und 15 Sekunden mit Mayer's Hämalaun (Merck, Hohenbrunn) gegengefärbt. Anschließend wurden die Thymusschnitte unter fließendem Wasser gespült, luftgetrocknet und mit Entellan (Merck, Hohenbrunn) eingedeckelt.

2.5.4 Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)

2.5.4.1 *Isolierung der DN, DP, SP CD4⁺ und SP CD8⁺ Thymozytensubpopulationen*

Mit der magnetisch aktivierten Zellsortierung der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) gelingt es, aus einer Thymozytensuspension unterschiedliche Thymozytensubpopulationen zu isolieren. Die Sortierung erfolgte mit dem CD4-MultiSort Kit nach Angaben des Herstellers.

Mechanisch isolierte Thymozyten (5×10^8 Zellen) wurden in 300 μ l MACS-Waschpuffer aufgenommen und mit 100 μ l Blockierungsreagenz (humanes IgG1 5mg/ml, Sigma) und 200 μ l mit „Microbeads“-gekoppelten Antikörper gegen CD4 30 min bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit 5 ml Waschpuffer gewaschen, in 1ml Waschpuffer aufgenommen und zur Vereinzelnung durch ein Zellsieb gepresst. Die Thymozyten wurden auf eine zuvor mit Waschpuffer äquilibrierte LD-Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld befand. Nicht gebundene Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer in den Durchlauf gespült, während „MicroBead“-gebundene Zellen an der Säule haften blieben. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld wurden die gebundenen Zellen mit 3ml Waschpuffer eluiert. Diese Zellpopulation, die doppelt positive (CD4⁺/CD8⁺, DP) und einfach positive (SP CD4⁺) Thymozyten enthielt, wurde 45 min bei 4°C mit einem Release-Reagenz inkubiert, um enzymatisch die gekoppelten „Microbeads“ abzuspalten. Die Trennung der Zellen mit bereits abgespalteten „Microbeads“ und nicht abgespalteten „Microbeads“ erfolgte durch eine äquilibrierte LD-Säule. Die durchlaufenden Thymozyten mit abgespaltenen „Microbeads“ wurden in 300 μ l Stopp-Reagenz aufgenommen und mit anti-CD8-Microbead-gekoppeltem Antikörper für eine weitere halbe Stunde inkubiert und erneut durch die Säule getrennt. Die nicht magnetisch gebundenen Zellen enthielten einfach positive (SP CD4⁺) Thymozyten. Mit der Elution wurde die Population der DP Thymozyten gewonnen.

Die CD4-depletierte Zellpopulation wurde mit anti-CD8-Microbead-gekoppeltem Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert und danach gewaschen. Nach Auftrag der Zellen auf die Säule konnten die einfach positiven (SP CD8⁺) Thymozyten von doppelt negativen (DN) Thymozyten getrennt werden. Die Reinheit der Anreicherung wurde mittels durchflußzytometrischer Analysen (s. 2.5.5) bestimmt.

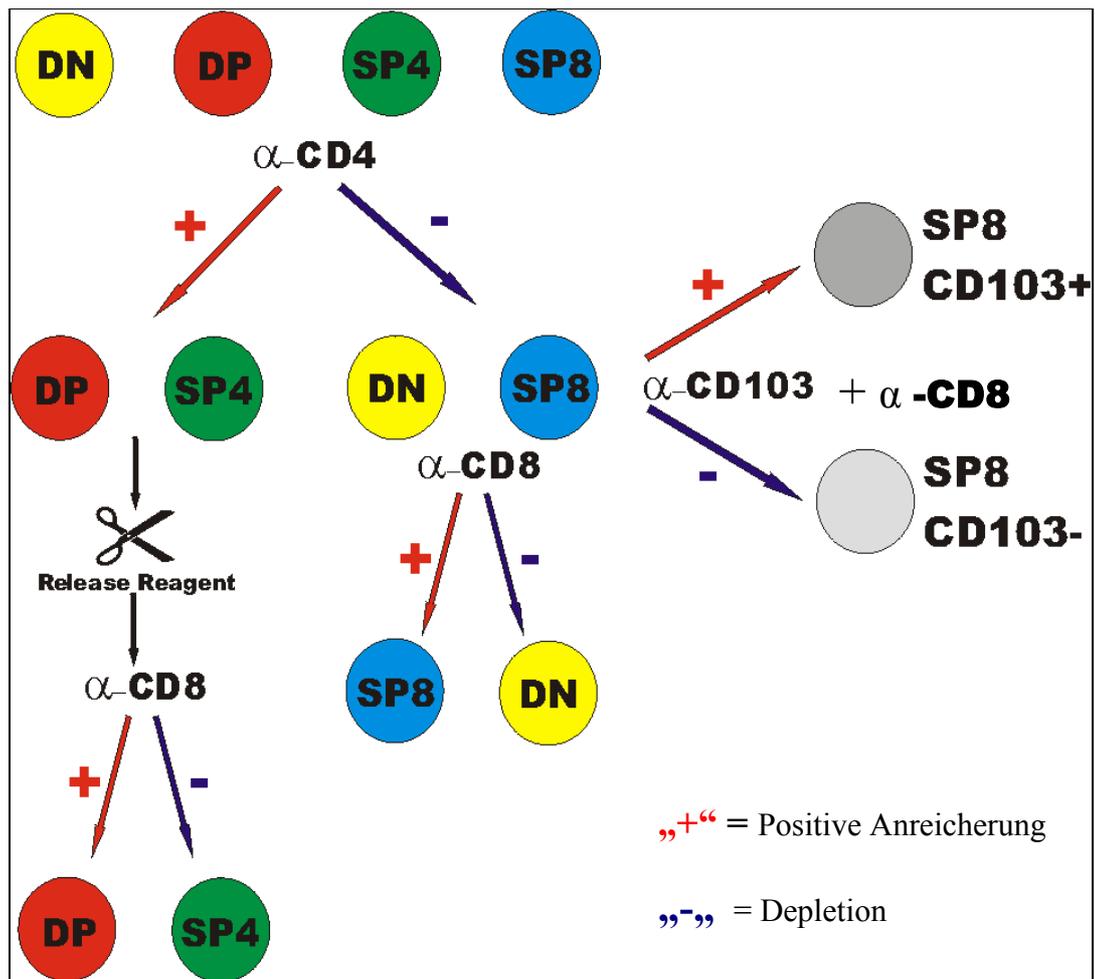


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des angewandten MACS-Protokolls

2.5.4.2 Isolierung der $CD8^+/CD103^-$ Thymozytensubpopulation

Für die Isolierung der $CD8^+/CD103^-$ Thymozytensubpopulation wurden $CD4$ -depletierte Thymozyten mit anti- $CD103$ IgG2a Antikörper für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit „Microbeads“-gekoppelten Sekundärantikörper (Ratte anti-Maus IgG2a+b) für eine halbe Stunde inkubiert. Die nach der Trennung durch die Säule erhaltenen Thymozyten waren einerseits $CD103^-/CD4^-/CD8^-$, andererseits $CD103^-/CD8^+$. Um DN von einfach positiven $CD8^+$ Thymozyten zu trennen, wurden die Zellen für 30 min mit anti- $CD8$ -Microbead Antikörper inkubiert und magnetisch getrennt. Damit wurde die $CD103^-/CD8^+$ Thymozytensubpopulation nach der Elution gewonnen.

2.5.4.3 *Isolierung der Syndecan-1(CD138) positiven Thymozyten*

Syndecan-1 positive Thymozyten wurden durch eine 45minütige Inkubation mit anti-CD138-Microbead-gekoppelten B-B4 Antikörper und eine anschließende magnetische Trennung isoliert. Die folgende zehnmünütige Inkubation mit Fluorchrom-konjugierten anti-CD138 Antikörpern ermöglichte eine sofortige Durchflusszytometrie-Analyse, um die Reinheit der Subpopulation zu überprüfen. Um eine bessere Effizienz der Populationsreinheit zu erzielen, wurden CD138⁺ Thymozyten ein zweites Mal auf die Säule aufgetragen und anschließend eluiert.

MACS-Waschpuffer	PBS, 0.5% BSA, 5mM EDTA, 15 Min entgast
-------------------------	---

2.5.5 Durchflußzytometrie

Eine Expressionsanalyse der membranständiger Proteinen (z.B. wie Integrine oder Cadherine) wurden mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Pro Durchflußzytometrie-Ansatz wurde 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für fünf min bei 1000 rpm pelletiert. Um unspezifische Bindungsstellen des Rezeptors der Zellen zu blockieren, wurden die Zellen mit 2% Polyglobin (Bayer, Leverkusen) in FACS-Waschpuffer für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschschrirt wurden die Zellen in 30 μ l Erstantikörperverdünung (Fluorochrom-konjugiert oder nicht konjugiert) aufgenommen und eine weitere halbe Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrirt und die Inkubation mit dem spezifischen Sekundärantikörper (FITC oder PE konjugiert). Bei der Negativkontrolle wurden statt dem Erstantikörper die entsprechenden Isotypkontrollen oder spezifische Sekundärantikörper zugegeben. Die Messung fluoreszenzmarkierter Zellen erfolgte am FACSort (Becton Dickinson, Heidelberg) in einem Messröhrchen, in dem die Zellen in 400 μ l Waschpuffer aufgenommen waren.

Die Auswertung der gemessenen Daten wurde mit der frei verfügbaren WinMDI-Software 2.8 (Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, USA) durchgeführt.

FACS-Waschpuffer	TBS/2mM CaCl ₂ , 0.1%BSA, 0.1% Natriumazid
-------------------------	---

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen oder Thymusgewebe wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) verwendet oder nach Angaben des Herstellers mit RNeasy-Kit von Qiagen (Hilden) vorgegangen.

Die Zellpellets oder zerkleinertes Thymusgewebe wurde mit 1ml Trizol (GIBCO BRL, Eggenstein) durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 0.2 ml 2M Natriumacetat pH 4.0 gemischt. In der Folge wurde 1ml Phenol und 0.2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert, wodurch die Proteine und die zelluläre DNA denaturiert wurden. Zur Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde die Mischung für 30 min bei 6000 xg und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die RNA erhielt, wurde vorsichtig abgenommen und mit gleichem Volumen an Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die RNA mit 75% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in 50 µl H₂O-Bidest aufgenommen und zur Verbesserung der Löslichkeit fünf min bei 37°C inkubiert. Um die in den RNA-Präparationen möglicherweise vorhandene DNA zu entfernen, wurden die RNA-Präparationen mit DNase behandelt. Dazu wurden 50 µl Gesamt-RNA mit 0.1 M Natriumacetat pH 5.2, 5mM MgCl₂ und 18 U RNase-freier DNase I (Roche, Mannheim) in einem Volumen von 100 µl für 30-60 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde im Anschluss mit 10 µl 3M Natriumacetat pH 5.2 und 250 µl 100% Ethanol für 30 min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und die nun DNA-freie RNA getrocknet. Die RNA wurde schließlich in 50 µl warmem H₂O-Bidest aufgenommen und die Konzentration im Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt.

Denaturierungslösung	4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7, 0.1 M 2-Mercaptoethanol, 0.5% N-Lauroylsarcosin
-----------------------------	---

2.6.2 Reverse Transkription –Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 3 µg RNA mit 1.5 µg Oligo (dT)₁₈₋₂₂ als Primer (Pharmacia Biotech Inc.), 1mM Nukleotidmischung (Promega, Mannheim) und 200 Einheiten M-MLV reverser Transkriptase (GIBCO BRL, Eggenstein) in dem dazugehörigen Reaktionspuffer, der 10 mM DTT enthielt, vermischt. Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 37°C. Die reverse Transkriptase wurde durch einen 10minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C inaktiviert. Die cDNA wurde auf Eis abgekühlt und entweder sofort für die PCR Analyse verwendet oder bei -20°C gelagert. Mit der gewonnenen cDNA wurden dann mit spezifischen Primern PCR Analysen durchgeführt. Die Konzentration der Primer wurden im Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt und auf 10 µM eingestellt. Pro PCR-Ansatz wurde cDNA aus 1 µg Gesamt-RNA mit 0.3 µM je Primer, 0.4 mM Nukleotidmischung und 4 U Biotherm-Polymerase (Natu Tec Forschungs- und Laborsysteme GmbH, Frankfurt/Main) im mitgelieferten PCR-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit folgenden Temperaturen und Inkubationszeiten durchgeführt:

1. Initialdenaturierung	94°C	60s
2. Denaturierung der cDNA	94°C	40s
3. Anlagerung der Primer	58°C	60s
4. Polymerisierung	72°C	60s
5. Endpolymerisierung	72°C	10 min

Die Schritte 2.-4. wurden in 40 Zyklen wiederholt. Als Positivkontrolle wurde pro PCR ein Ansatz mit β-Aktin und als Negativkontrolle ein Ansatz mit Gesamt-RNA ohne vorherige reverse Transkription durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit Auftragspuffer versetzt und anschließend durch eine Gelelektrophorese in 2% Agarose in TBE-Puffer nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Ethidiumbromid (1µg/ml) für 15 min angefärbt, unter fließendem Wasser entfärbt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Als Längenstandard wurden 1.6 µg der 100bp-Leiter (Roche, Mannheim) aufgetragen.

Agarose	SEAKEM [®] LE (Biozym, Hess, Oldendorf)
TBE	90 mM Tris-Borat, 1mM EDTA pH 8.0

6xProbenauftragspuffer	30% Glycerin, 0.25% Bromphenolblau
-------------------------------	------------------------------------

Geeignete Primerpaare, mit welchen die RNA der gesuchten Proteine nachgewiesen werden konnte, wurden von Dr. U. Siler (Siler et al., 2000) mit Hilfe des EMBL Primer-Suchprogramms (Heidelberg) herausgesucht. Diese Sequenzen und die daraus resultierenden PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Sequence-Alignment-Programmes „BLAST“ des NIH (USA) verifiziert.

In der Tabelle 2-5 sind die verwendeten Primer dargestellt.

Primer für	Produktlänge	EMBL-Zugangsnr.	Primersequenzen
Laminin α 1-Kette	357 bp	X58531	For: 3733-3751 5'-TGCAGAGCCGTTTTACTGG-3' Rev: 4089-4068 5'-TGCTGTAATCCTTGACCAT-3'
Laminin γ 2-Kette	579 bp	Z15008	For: 2276-2296 5'-ACAGGCTCATCACTCAGATGC-3' Rev:2854-2833 5'-CATTCTGTAAGAGCTGCTGTGC-3'
Laminin γ 3-Kette	557 bp	AF041835	For: 1277-1294 5'-CAGTGCGATGACACAGGC-3' Rev: 1833-1814 5'-CCTTCCAGCCTCAGCTGTCA-3'

Tabelle 2-5 Verwendete Primer

2.7 Funktionsanalysen

2.7.1 Zelladhäsionstest

Mit Hilfe des Zelladhäsionstests wurde die Interaktion verschiedener Thymozytensubpopulationen mit Komponenten der extrazellulären Matix untersucht.

Hierzu wurden verschiedene Lamininisoformen in entsprechenden Konzentrationen (10-100 μ g/ml, verdünnt in PBS), eingesetzt. 2 μ l der gelösten Matrixproteine wurden auf 35 mm Petrischalen (Greiner, Frickenhausen) aufgetropft und 30 min luftgetrocknet. Nach einem vorsichtigen Waschschrift mit PBS wurden unspezifische Plastikbindungsstellen mit 5%

BSA-Lösung bei 37°C blockiert. Nach einer Stunde wurde die BSA-Lösung abgenommen und die Petrischalen zweimal mit erwärmtem RPMI 1640 Medium gewaschen. 4×10^6 Thymozyten in 2 ml Testmedium wurden für eine Stunde bei 37°C in den Petrischalen inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Um die Thymozytenadhäsion zu inhibieren, erfolgte eine Vorinkubation der Thymozyten mit Antikörpern gegen membranständige Rezeptoren unter einer ständigen Rotation bei 37°C für 30 min, oder die auf Plastik immobilisierten Lamininpräparationen wurden mit den entsprechenden polyklonalen Antiseren gegen Laminin vorinkubiert. Die Auswertung der qualitativen Bindung der Thymozyten an die immobilisierten Matrixproteine erfolgte an einem Durchlichtmikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen).

Testmedium	RPMI 1640, 1.5 mM Kalziumchlorid, 1.5 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Manganchlorid
-------------------	--

2.7.2 Zellbindungstest

Direkte Zell-Zell-Interaktionen wurden durch einen Zellbindungstest in einem *in vitro* System mit verschiedenen Thymozytensubpopulationen und adhären wachsenden Epithelzellen analysiert.

Für den Test wurden die Epithelzellen in 24-Well-Platten kultiviert. Primäre Thymus-Epithelzellen wurden solange in OPTIMEM I Medium auf Kollagen Typ I kultiviert, bis sich eine konfluente Epithelzellschicht gebildet hatte. Die A431 Zelllinie wurde in nicht beschichteten 24-Well-Platten in RPMI 1640 Zellmedium kultiviert. Vor dem Versuchsbeginn wurden die Epithelzellen zweimal mit erwärmtem PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen am Rand des Wells zu blockieren, wurden die Zellen mit 2.5% BSA/PBS Lösung 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Epithelzellen mit den entsprechenden Medien gewaschen und 3×10^5 Thymozyten/500µl Medium zugefügt. Die Kultur wurde eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nicht adhärenente Thymozyten wurden durch vorsichtiges Waschen mit warmem Zelllinienmedium entfernt. Gebundene Thymozyten wurden zusammen mit den Epithelzellen in 4% Paraformaldehyd fixiert, 10 min mit 1% Kristallviolett angefärbt, mit PBS gewaschen und unter einem Durchlichtmikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen) analysiert. Die gebundenen Thymozyten konnten als

kleine, stark dunkel gefärbte Objekte vor einem wesentlich helleren Hintergrund, der die Epithelzellen darstellte, identifiziert werden.

Inhibitionsanalysen wurden entweder durch eine 30minütige Vorinkubation der Thymozyten bei 37°C unter ständigem Rotieren mit anti-Integrin Antikörper durchgeführt, oder die Epithelzellen wurden mit Antikörper vorinkubiert.

2.7.3 Quantifizierung des Zellbindungstests

Die Quantifizierung eines Zellbindungstests erfolgte durch eine fluorochrome Markierung frisch isolierter Thymozytensubpopulationen mit BCECF-AM [2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl Ester, Sigma, Deisenhofen]. 1×10^6 Thymozyten in 500 μ l PBS wurden mit 2 μ l in DMSO aufgelöstem BCECF-AM für 15 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Thymozyten mit den Epithelzellen unter den oben angegeben (2.7.2) Bedingungen inkubiert. Im Anschluss an zwei Waschschrte wurden die verbliebenen 500 μ l PBS nicht abgenommen, sondern es folgte eine sofortige Messung der BCECF-AM-Fluoreszenz in einem Fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermo Biosciences, Egelsbach) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission bei einer Wellenlänge von 538 nm.

Der Prozentsatz (%) der adhärenenten Thymozyten wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{(\text{Fluoreszenz der adhärenenten Zellen} - \text{Fluoreszenz der Negativkontrolle})}{\text{Fluoreszenz der eingesetzten Zellen}}$$

Als Negativkontrolle wurden Ansätze, in denen ausschließlich Epithelzellen vorhanden waren, verwendet.

2.7.4 Zellproliferation nach Stimulation mit Matrixproteinen

Dieser Test wurde eingesetzt, um mitogene Effekte von extrazellulären Matrixproteinen an bestimmten Thymozytensubpopulationen zu untersuchen.

Zur Analyse wurden isolierte Thymozytensubpopulation in einer Dichte von 1×10^6 in RPMI 1640 Zellmedium resuspendiert. Von diesen Zellsuspensionen wurden je 200 μ l (2×10^5 Zellen) in die Wells einer 96-Well-Zellkultur-Platte pipettiert. Zu den Ansätzen wurden 10 μ g/ml verschiedener Matrixproteine zugesetzt und für vier Tagen bei 37°C und 5% CO₂

inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch [^3H] Thymidin-Einbau in die DNA bestimmt. Am Ende der Inkubationszeit wurde [^3H] Thymidin ($1\mu\text{Ci}/\text{Well}$) zugegeben und die Zellen nach 16 Stunden auf Filterpapier (Fa. Packard, Meriden, USA) geerntet. Die manuell ausgestanzte Filterpapier wurde in Messröhrchen mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Fa. Packard, Meriden, USA) überführt. Der erfolgte Thymidin-Einbau wurde anschließend in einem β -Strahlen-Zähler (Beckmann Coulter, Irvine, CA, USA) gemessen. Alle Ansätze wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Daten wurden als „counts per minute“ (cpm) angegeben, wobei Mittelwert und Standardabweichung der Ansätze berechnet wurden.

2.7.5 Zellproliferation an kultivierten primären Thymus-Epithelzellen

Dieser Proliferationstest sollte dazu dienen herauszufinden, ob eine gemeinsame Zellkultur bestimmter isolierter Thymozytensubpopulationen mit primären Thymus-Epithelzellen eine Zellproliferation induzieren kann.

Für den Test wurden kultivierte primäre Thymus-Epithelzellen trypsiniert, in MEM D-Valin Medium für die Epithelzellkultur aufgenommen und in eine 96-Well-Zellkultur-Platte dicht ausplattiert. Nach ca. einer Woche hatte sich ein konfluenten Epithelzellrasen gebildet, zu dem die isolierten Thymozytensubpopulationen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Well in Proliferationsmedium zugegeben wurden. Diese Ko-Kulturen wurden 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. In den letzten 16 Stunden der Inkubationszeit wurde $1\mu\text{Ci}$ [^3H] Thymidin pro Ansatz zugegeben. Anschließend erfolgte die Messung des Thymidin-Einbaus und die Auswertung, wie dies in 2.7.4 angegeben ist.

Um eine Hemmung der Proliferation in den Ko-Kulturen zu untersuchen, wurden die Thymozyten während der 48stündigen Inkubation mit den Epithelzellen in Gegenwart von Antikörpern inkubiert.

Auch hier wurden alle Ansätze in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Proliferationsmedium	MEM D-Valin Medium, 100 U/ml Penicilin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 10% humanes AB Serum
-----------------------------	--

2.7.6 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling, Upstate Biotechnology, Biozol, Eching) ermöglicht die Identifizierung apoptotischer Zellen *in situ*. Bei dieser Methode wird an freie 3'-OH-Gruppen der geschnittenen DNA Biotin-dUTP gebunden. Biotin-gekoppelte DNA-Fragmente können durch eine Reaktion mit Fluoreszein-konjugiertem Avidin (Avidin-FITC) sichtbar gemacht werden. Dieser Test erfolgte nach den genauen Angaben des Herstellers (Upstate).

Primäre Thymus-Epithelzellen wurden in OPTIMEM I Medium in „8-Well-Chamber CultureSlides“ (BD Falcon, Heidelberg), das mit Kollagen Typ I beschichtet war, kultiviert. Zu den gebildeten konfluenten Thymus-Epithelzellschichten wurden isolierte Thymozytensubpopulationen zugegeben und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Ko-Kulturen mit PBS gewaschen und für 15 min bei RT mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min. Die Zellen wurden anschließend mit 0.05% Tween, 0.2 % BSA-Lösung in PBS für weiteren 15 min bei RT inkubiert und erneut 2 min mit PBS gewaschen. Inzwischen wurde eine Mischung von geliefertem TdT-Lösung, TdT-Puffer und Biotin-dUTP in einem Verhältnis 5:90:5 (TdT:TdT-Puffer:Biotin-dUTP) vorbereitet. Die Ko-Kultur-Ansätze wurden mit jeweils 50 µl dieser Mischung für eine Stunde bei RT inkubiert.

Die Reaktion wurde mit 1x TB-Puffer (Upstate) gestoppt und mit PBS für 2 min gewaschen. Mit 50 µl einer Blockierungslösung (Upstate) wurden unspezifischen Stellen in Ko-Kulturen für eine Avidin-Bindung bei RT blockiert. Die Blockierungslösung wurde nach 20 min abgenommen. Zu den Ansätzen wurde jeweils 50 µl 1:10 verdünnte Avidin-FITC Lösung in Blockierungslösung mit einer 1 µg/ml DAPI-Zugabe zugegeben und für eine weitere halbe Stunde im Dunkeln inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min im Dunkeln. Die Präparate wurden mit Elvanol eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) analysiert. Bei den Ansätzen wurde immer eine Positivkontrolle durchgeführt. Dabei wurden die Epithelzellen mit 50 µl DNase I (1 µg/ml, verdünnt in PBS, Upstate) für 1 Stunde bei 37°C verdaut.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse verschiedener Laminin-Ketten

3.1.1 Expression verschiedener Laminin-Ketten im humanen Thymus

Mitglieder der Laminin-Familie sind Hauptkomponenten von Basalmembranen, können aber auch in interstitiellen Geweben auftreten. Mit ihren Bindungen an Integrin-Rezeptoren können sie die Integrität der Gewebe erhalten. Neben ihrer mechanischen Rolle sind Laminine an dynamischen zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, Proliferation, Zelldifferenzierung und Zellmigration beteiligt. Damit sind Laminine für die Entwicklung verschiedener Zelltypen verantwortlich.

In dieser Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen individuelle Laminin-Ketten die Expression verschiedener Laminin-Ketten ebenso wie ihre lokale Verteilung im humanen Thymus untersucht (Abb. 3-1). Hieraus wurde auf das Vorhandensein von Laminin-Isoformen geschlossen. Mit Hilfe von RT-PCR- und Western Blot-Analysen wurde die Präsenz der Laminin- α 1-, Laminin- α 4-, Laminin- β 2-, Laminin- γ 2- und Laminin- γ 3-Kette überprüft.

Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 3-1) von Thymusschnitten und Western Blot-Analysen (Abb. 3-2) wurde mit einem polyklonalen Antiserum gegen LN-1, welches sowohl die Laminin- β 1- und γ 1 als auch die α 1-Kette erkennt, durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine starke Immunreaktion im subkapsulären Epithel der Thymusläppchen und im Endothel des Blutgefäßes. Die Western Blot-Analyse von Thymuszellextrakt zeigte (Abb. 3-2), dass das Antiserum gegen LN-1 die Laminin- β 1- und die Laminin- γ 1-Kette in diesen Extrakten erkennen kann. Die beobachtete breite Bande bei 200 kDa entspricht nicht den Proteingröße der Laminin- α 1-Kette von 400 kDa, sondern entspricht den Proteingrößen der Laminin- β 1- und der Laminin- γ 1-Kette. Die Laminin- α 1-Kette zeigte im Thymusschnitt auch keine Immunreaktion mit dem α 1-Ketten-spezifischen monoklonalen Antikörper EB7, welcher in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. I. Virtanen (University of Helsinki, Finland) generiert wurde (Abb. 3-1). Mittels RT-PCR-Analysen war ebenfalls keine Expression der mRNA der Laminin- α 1-Kette im Thymusgewebe nachzuweisen (Abb. 3-3, Spur-1). Als Positivkontrolle für eine Expression der α 1-Kette wurde die cDNA einer humanen Knochenmarklangzeitkultur amplifiziert. Das detektierte Signal bei 357 bp zeigt die Amplifikation der Laminin- α 1-Kette (Abb. 3-3, Spur-2).

Die Laminin- α 2-Kette wird in den Endothelzellen der Blutgefäße und im subkapsulären Epithelzellen exprimiert, während die Laminin- α 3-Kette nur in medullären Epithelzellen detektiert werden konnte (Abb. 3-1). Anhand von Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit dem Antikörper TE4, der ausschließlich Epithelzellen der Medulla erkennt, konnte eine Ko-Lokalisierung mit Laminin- α 3-Kette nachgewiesen werden (Abb. 3-4). Der monoklonale Antikörper gegen die humane Laminin- α 3-Kette wurde im Labor von Dr. P. Rousselle (Institut de Biologie et Chimie, Lyon, France) hergestellt und unserem Labor zur Verfügung gestellt.

Die Expression der Laminin- α 4-Kette wurde auf Proteinebene im Western Blot mit einem polyklonalen Antiserum, welches gegen eine kurze Peptidsequenz der α 4-Kette im Labor von Dr. Richards (University of Cambridge, UK.) generiert wurde, untersucht. Mit diesem Antiserum konnte eine Bande bei 200 kDa, welche der Laminin- α 4-Kette entspricht, detektiert werden (Abb. 3-2). Für Immunfluoreszenzfärbungen wurde ein polyklonales Antiserum, das wir von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. Sorokin (Universität Erlangen-Nürnberg) erhielten, verwendet. Hier zeigten nur Endothelzellen der Blutgefäße eine Expression der Laminin- α 4-Kette (Abb. 3-1). Dass diese Expression nur in Endothelzellen vorkommt, konnte durch eine Ko-Lokalisierung mit dem endothel-spezifischen PECAM-Antigen bestätigt werden (Abb. 3-4, d-f).

Subkapsuläre Epithelzellen und Endothelzellen der Blutgefäße im Thymus exprimieren die Laminin- α 5-Kette (Abb. 3-1). Dass die Expression der Laminin- α 5-Kette auf den Bereich der Epithelzellen des subkapsulären Thymusbereiches beschränkt ist und nicht auf kortikalen oder medullären Thymus-Epithelzellen gefunden werden kann, konnte durch Ko-Lokalisierung mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit dem TE3-Antikörper gezeigt werden. Hierbei richtet sich der verwendete Antikörper TE3 gegen kortikale Thymus-Epithelzellen, wobei er partiell ebenfalls subkapsuläre Epithelzellen erkennt (Abb. 3-4). Es konnte keine Ko-Lokalisierung auf kortikalen Epithelzellen detektiert werden.

Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen die Laminin-Ketten β 1, β 2 und γ 1 zeigten in subkapsulären Epithelzellen sowie in Endothelzellen der Blutgefäße eine deutliche Expression der untersuchten Laminin-Ketten (Abb. 3-1). Im Thymusextrakt konnte anhand von Western Blot-Analysen die Laminin- β 2-Kette nachgewiesen werden. Die detektierte Bande bei 200 kDa entspricht ihrer Proteingröße (Abb. 3-2).

Die Expression der Laminin- γ 2-Kette wurde in Immunfluoreszenzfärbung, im Western Blot und mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Hierbei wurde der Laminin- γ 2-Kette ausschließlich im Epithel der medullären Thymusregion gefunden (Abb. 3-1). Die Laminin- γ 2-Kette wurde

durch Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Laminin- γ 2-Kette aufkonzentriert und anschließend im Western Blot mit dem gleichen Antikörper als eine Bande bei 105 kDa detektiert (Abb. 3-2). RT-PCR-Proben des humanen Thymusgewebes (Abb. 3-3, Spur-3) sowie von humanen Endothelzellen der Nabelschnur, die hier als Positivkontrolle verwendet wurde (Abb. 3-3, Spur-4), zeigten ein Signal bei 579 bp,

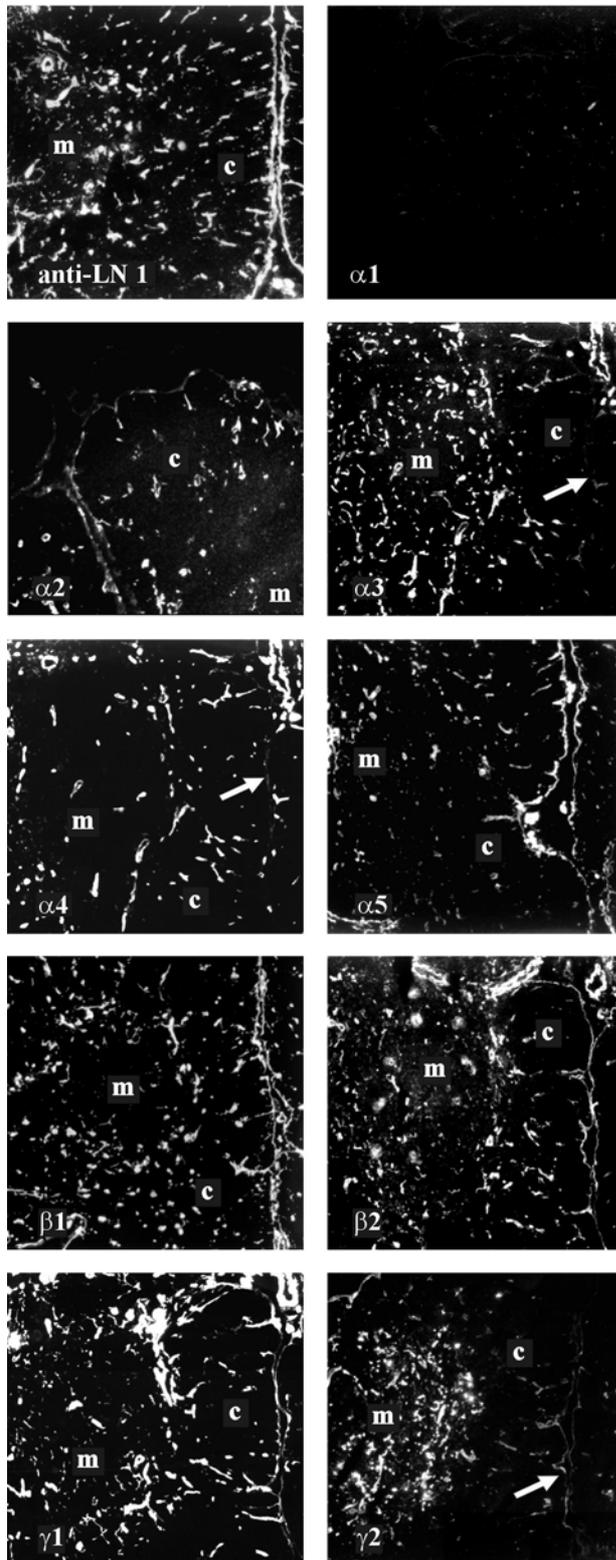


Abbildung 3-1 zeigt indirekte Immunfluoreszenzfärbungen von Thymusschnitten mit dem polyklonalen Antiserum gegen LN-1 und spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Laminin-Ketten (α 1- α 5, β 1 und β 2, γ 1 und γ 2). Das Antiserum gegen LN-1 zeigt eine starke Immunreaktion im subkapsulären Epithel der Thymusläppchen und im Endothel der Blutgefäße.

Die Antikörper gegen Laminin- α 2-, α 5-, β 1-, β 2- und γ 1-Kette zeigen eine Expression im subkapsulären Epithel der Thymusläppchen und im Endothel der Blutgefäße.

Die Expression der Laminin- α 4-Kette wird ausschließlich im Endothel der Blutgefäße detektiert (keine Expression im subkapsulären Epithel, mit dem Pfeil gezeigt), während die Expression von Laminin- α 3- und Laminin- γ 2-Kette ausschließlich im medullären Epithel gefunden werden konnte (keine Expression im subkapsulären Epithel). Die medulläre und kortikale Regionen der Thymusläppchen sind mit „m“ und „c“ bezeichnet.

Vergrosserung: $\times 45$

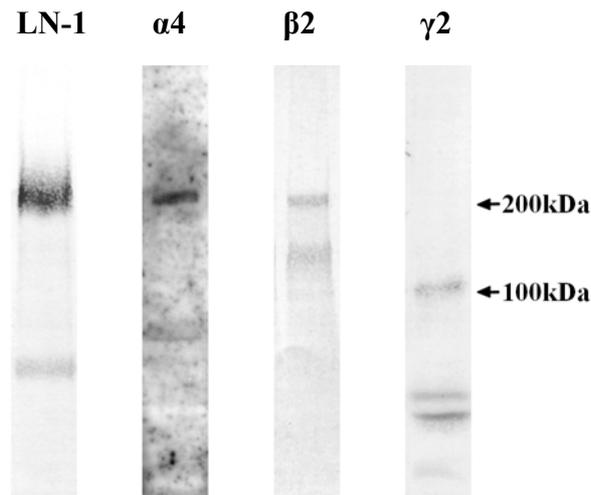


Abbildung: 3-2: Western Blot-Analyse von LN-1 sowie Laminin- α 4-, β 2- und γ 2-Ketten. Thymusextrakt wurde auf einem 10% SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach einstündiger Inkubation mit den polyklonalen Antisera gegen LN-1 und Laminin- α 4-Kette (1:100) sowie mit dem spezifischen Antikörper gegen Laminin- β 2- und γ 2-Kette (1:100) und einem alkalische Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper (1:400) konnten die Laminin-Ketten (α 4, β 1, β 2 und γ 1)-spezifische Banden bei 200 kDa und die 105 kDa der Laminin- γ 2-Kette nachgewiesen werden.

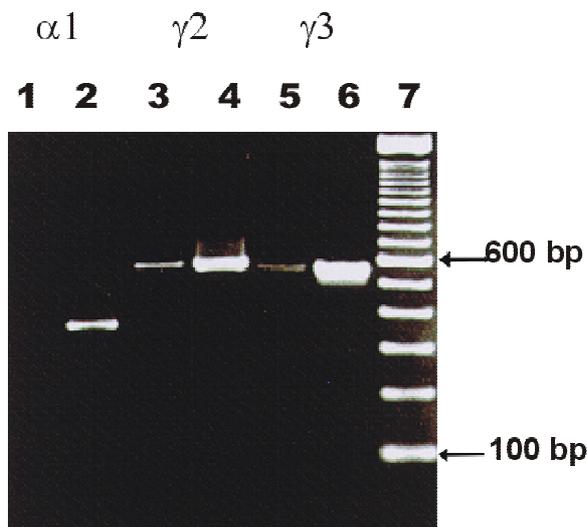


Abbildung 3-3: RT-PCR-Analyse der Expression der Laminin- α 1-, γ 2- und γ 3-Ketten im humanen Thymus. Als Längenstandard wurde eine 100 bp DNA-Leiter aufgetragen (Spur-7). Neben den PCR-Produkten des Thymus (Spuren-1, -3 und -5) wurden als Positivkontrolle für die Laminin- α 1-Kette die cDNA einer humanen Knochenmarklangzeitkultur (Spur-2), für die Laminin- γ 2-Kette die cDNA der Endothelzellen aus humanen Nabelschnurblut (Spur-4) und für die Laminin- γ 3-Kette die cDNA aus humanen Hautgewebe (Spur-6) amplifiziert. Das spezifische-Laminin- α 1-Kette-Signal bei 357 bp wurde im Thymusgewebe nicht detektiert (Spur-1). Der Thymus zeigt ein Signal bei 579 bp, welches auf Laminin- γ 2-Kette hinweist (Spur-3), und ein sehr schwachen Signal für die Laminin- γ 3-Kette bei 556 bp (Spur-5).

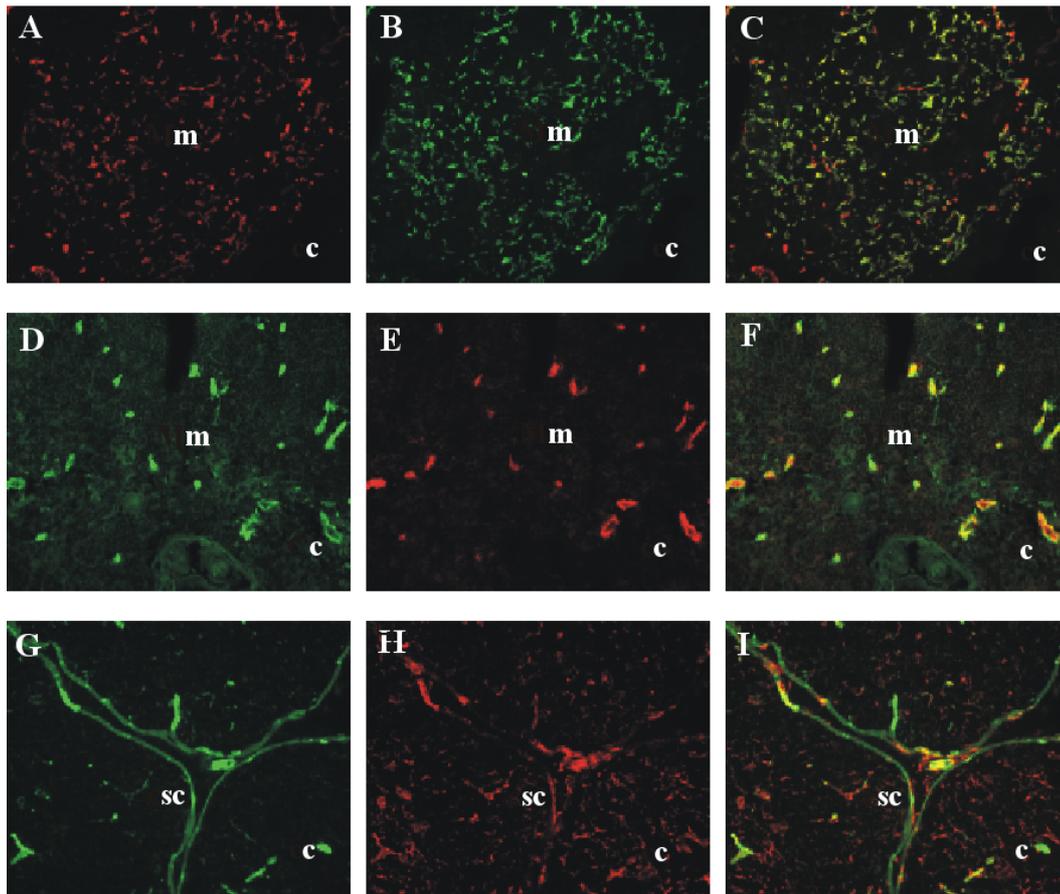


Abbildung 3-4 zeigt Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Thymusschnitten. Mit dem Antikörper BM165 gegen die Laminin- α 3-Kette (A) und dem TE4-Antikörper (B) konnte nach einstündiger Inkubation mit den verwendeten Antikörpern (1:100) und einem Cy³- (1:500) oder Cy²-gekoppelten Zweitantikörper (1:200) eine Ko-Lokalisierung der Laminin- α 3-Kette mit der TE4-Expression im medullären Epithel gezeigt werden (C).

Abb-F zeigt die Ko-Lokalisierung der Expression der Laminin- α 4-Kette mit der endothel-spezifischen PECAM-Expression in Endothelzellen der Blutgefäße. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem polyklonalen Serum gegen die Laminin- α 4-Kette (1:100) (D) und einem monoklonalen PECAM-Antikörper (1:100) (E) durchgeführt. Als Zweitantikörper wurden Cy³- (1:500) oder ein FITC-gekoppelter Antikörper (1:100) verwendet.

Abb-G zeigt die Expression der Laminin- α 5-Kette im subkapsulären Epithel sowie in Endothelzellen der Blutgefäße. Für diese Immunfluoreszenzfärbung wurden Antikörper gegen die Laminin- α 5-Kette (1:100) sowie FITC-gekoppelte Zweitantikörper (1:20) verwendet. Der verwendete TE3-Antikörper (unverdünnter Zellkultur-Überstand), welcher die kortikalen und auch partiell subkapsulären Epithelzellen erkennt, mit einem spezifischen Cy³-gekoppelten Zweitantikörper (1:500) zeigt eine dementsprechende Expression (H). In Abb-I ko-lokalisiert die Laminin- α 5-Kette mit der TE3-Expression im subkapsulären Epithel, während im kortikalen Thymusbereich auf Epithelzellen keine Ko-Lokalisierung detektiert werden kann.

Legende: Mit c ist die kortikale Thymusregion, mit m die medulläre und mit sc die subkapsuläre Thymusregion bezeichnet. Vergrößerung: x55

welches für die Laminin- γ 2-Kette spezifisch ist. Die Laminin- γ 3-Kette wurde im Thymusgewebe nur mit einem schwachen Signal bei 557 bp detektiert (Abb. 3-3, Spur-6). Als Positivkontrolle für die Laminin- γ 3-Kette wurde die cDNA von Hautgewebe aufgetragen (Abb. 3-3, Spur-6).

3.1.2 Expression der Laminin-Ketten in Thymomen

Die Autoimmunerkrankung Myasthenia Gravis (MG) ist mit pathologischen Änderungen des Thymus assoziiert (Vernino et al., 1999; Vincent et al., 1999). Deshalb wurden in dieser Arbeit verschiedene Laminin-Ketten (α 1- α 5, β 1- β 3, γ 1- γ 2) mittels Immunfluoreszenzfärbungen in unterschiedlichen Thymomgefrierschnitten vom medullären Typ A, vom kortikalen Typ B2/3 und vom gemischten Typ AB mit und ohne MG untersucht. Die Lokalisation der Laminin-Ketten wurde hier im Bezug auf den histo-pathologischen Befunde nicht weiter analysiert. Nach der Expression der Laminin-Ketten wurden die Laminin-Isoformen abgeleitet. In der Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse der einzelnen Laminin-Ketten in den unterschiedlichen Thymom-Typen zusammengefasst. Im medullären Thymom-Typ A (mit und ohne MG) konnte eine sehr schwache Expression von LN-5 (α 3 β 3 γ 2) detektiert werden, während im gemischten Typ AB keine Expression von LN-5 nachgewiesen werden konnte. Der kortikale Typ B2/3 mit MG zeigte eine sehr starke Expression der LN-5-Isoform, demgegenüber zeigte der kortikale Typ B2/3 ohne MG keine LN-5-Expression. Alle untersuchten Thymomen vom Typ A, B2/3 und AB (mit und ohne MG) exprimieren sehr stark LN-10 (α 5 β 1 γ 1). Eine sehr schwache Expression der LN-11-Isoform (α 5 β 2 γ 1) konnte im kortikalen, medullären und gemischten Thymom-Typ (mit und ohne MG) detektiert werden, während die LN-11-Expression im gemischten Typ AB mit MG nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expression der Laminin- α 1-Kette konnte in den Thymomen vom Typ A ohne MG und vom Typ AB (mit und ohne MG) ebenso wie die Expression von Laminin- α 2- und α 4-Kette nicht detektiert werden.

In Tabelle 3.1 sind die Expressionen der untersuchten Laminin-Ketten dargestellt.

THYMOM-TYP						
	Typ A	Typ A mit MG	Typ AB	Typ AB mit MG	Typ B2/3	Typ B2/3 mit MG
LN-1	++	++	+++	+++	+++	+++
LN α 1-Kette	k. Exp.	n.d.	k. Exp	k. Exp	n.d.	n.d.
LN α 2-Kette	k. Exp.	n.d.	k. Exp	k. Exp	n.d.	n.d.
LN α 3-Kette	+	+	k. Exp.	k.Exp.	k.Exp.	+++
LN α 4-Kette	k. Exp.	n.d.	k. Exp	k. Exp	n.d.	n.d.
LN α 5-Kette	++	++	+++	+++	+++	+++
LN β 1-Kette	+++	+++	+++	+++	++	++
LN β 2-Kette	+	+	+	k. Exp.	++	+
LN β 3-Kette	+	+	k. Exp.	k. Exp.	k. Exp.	+++
LN γ 1-Kette	++	+++	+++	++	+++	+++
LN γ 2-Kette	+	+	k. Exp.	k. Exp.	k. Exp.	+++

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzfärbungen der untersuchten Laminin-Ketten im Thymom. Die Thymome der Klasse A (medulläres Thymom), der Klasse B (kortikales Thymom) sowie der Klasse AB (gemischtes Thymom) ohne und mit Myasthenia Gravis wurden auf die Expressionen der unterschiedlichen Laminin-Ketten untersucht.

Legende: n.d.-nicht durchgeführt; k. Exp. –keine Expression; + -sehr schwache Expression; ++ -deutliche Expression; +++ -sehr starke Expression; MG -Myasthenia Gravis

3.2 Expression der Laminin-Rezeptoren auf humanen Thymozyten

Integrine sind transmembranständige heterodimere Rezeptoren, die bei Zell-Zell sowie bei Zell-Matrix-Interaktionen eine entscheidende Rolle spielen können. Interaktionen mit verschiedenen Lamininen können durch verschiedene Heterodimere der Integrin-Familie wie $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$ und $\alpha 9\beta 1$, welche auf unterschiedlichen Zell-Typen exprimiert sind, erfolgen (Geberhiwot et al., 1999; Colognato & Yurchenco, 2000; Kikkawa et al., 2000).

Für die Untersuchungen der Thymozyten-Interaktionen mit unterschiedlichen Laminin-Isoformen sollte mittels durchflußzytometrischer Analysen (Doppelfärbung) die Expression potentieller Laminin-Rezeptoren auf unfraktionierten Thymozyten ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl CD3-positive als auch CD3-negative Thymozyten die Integrin- $\alpha 6$ -Kette (CD49f) exprimieren. Etwa ein Drittel aller Thymozyten exprimiert den Integrin- $\alpha 6\beta 1$ -Rezeptor (Abb. 3-5).

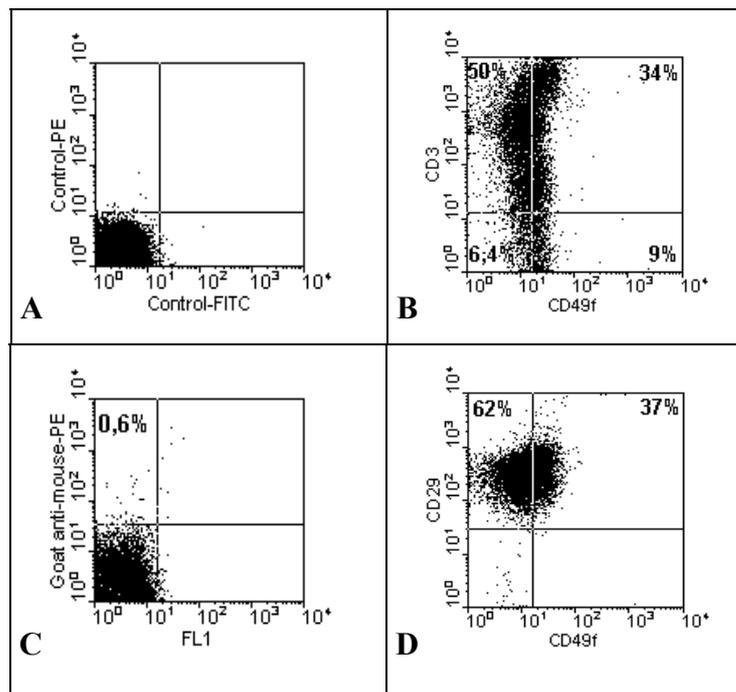


Abbildung 3-5 zeigt Doppelfärbungen von durchflußzytometrischen Analysen. Frisch isolierte Thymozyten wurden mit direkt markierten Antikörpern gegen T-Zell-Rezeptor-Komplex (CD3-PE, 1:20) und Integrin- $\alpha 6$ -Kette (CD49f-FITC, 1:20), sowie mit indirekt markierten Antikörpern gegen Integrin- $\beta 1$ -Kette (CD29, 1:20) und einem PE-gekoppelte Zweitantikörper (1:20), welcher als Negativkontrolle verwendet wurde (C), inkubiert. Als Negativkontrolle wurde auch die konjugierte-FITC/PE Isotypkontrolle (1:20; Abb. A) verwendet.

Die Integrin- $\alpha 6$ -Kette exprimieren CD3-positive und CD3-negative Thymozyten (Abb.B).

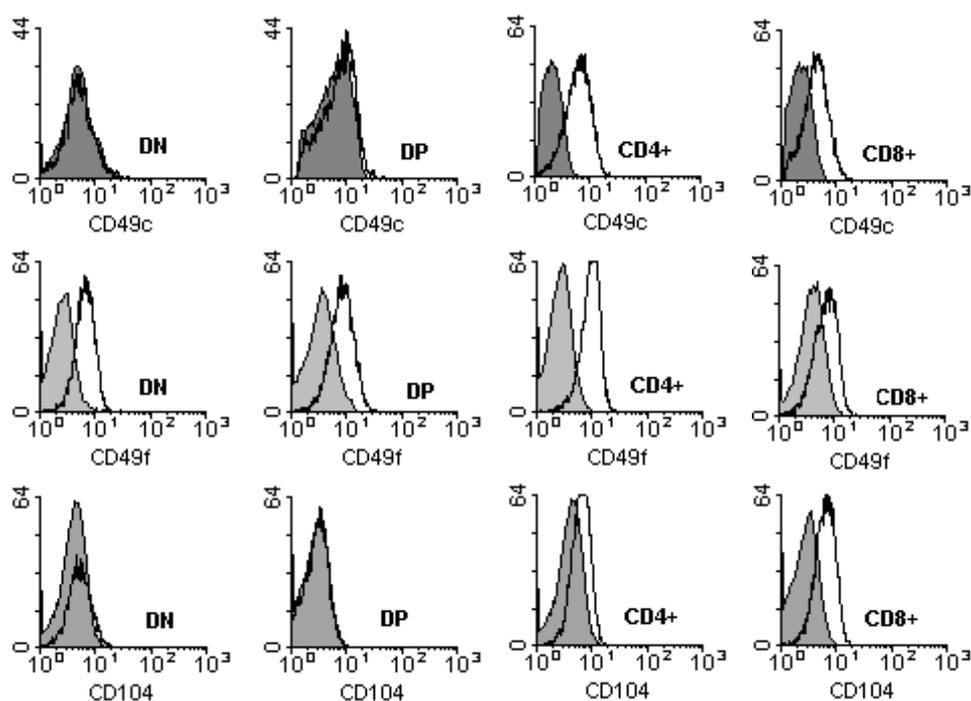
Alle Thymozyten zeigen eine Expression der Integrin- $\beta 1$ -Kette und ca. 37% des Integrin- $\alpha 6\beta 1$ -Rezeptors (Abb.D)

3.2.1 Expression der Integrin- α 3-, α 6-, β 1- und β 4-Ketten auf unterschiedlichen Thymozytensubpopulationen

Die genaue Verteilung der Integrin α 3-(CD49c), α 6-(CD49f), β 1-(CD29) und β 4(CD104)-Ketten sollte auf verschiedenen Thymozytensubpopulationen untersucht werden. Hierdurch sollte ermittelt werden, in welchem Entwicklungsstadium der Thymozytenreifung ein potenzieller Laminin-Rezeptor exprimiert wird.

Um doppelt negative (DN), doppelt positive (DP), einfach positive (SP) $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozyten zu gewinnen, wurde die MACS-Methode angewendet. Frisch isolierte Thymozytensubpopulationen wurden in der Durchflußzytometrie (Einfachfärbung) auf die Expression der oben genannten Integrin-Ketten untersucht. Alle Thymozytensubpopulationen zeigen eine sehr hohe Expression der Integrin- β 1-Kette (CD29). Die Integrin- α 6-Kette (CD49f) ist unterschiedlich stark auf allen untersuchten Thymozytensubpopulation exprimiert. Die Expression der Integrin- α 3- und β 4-Kette wurde nicht auf DN und DP Thymozyten detektiert. SP $CD4^+$ Thymozyten exprimieren die Integrin- α 3-Kette (CD49c) stärker als die SP $CD8^+$ Thymozyten, die hingegen eine stärkere Integrin- β 4-Kette(CD104)-Expression zeigen als die SP $CD4^+$ Thymozyten (Abb. 3-6).

Die Ergebnisse belegen, dass der Integrin- α 6 β 1-Rezeptor auf Thymozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien exprimiert ist. Reifere, medulläre SP $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozyten zeigen Expressionen der Integrin- α 3 β 1-, α 6 β 1- sowie α 6 β 4-Rezeptoren.



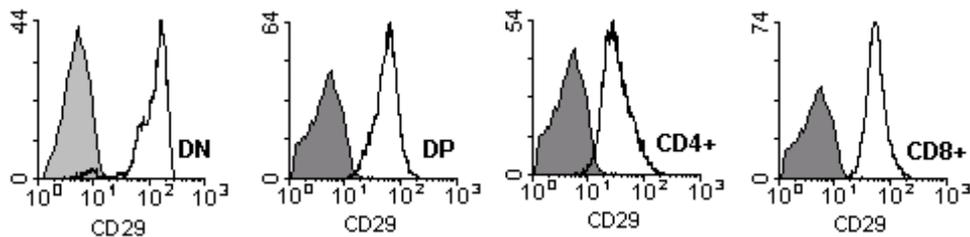


Abbildung 3-6 zeigt durchflußzytometrische Analysen der DN, DP und SP $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozyten. MACS-isolierte Thymozytensubpopulationen wurden auf die Expression von CD29, CD49c, CD49f und CD104 untersucht. Die Integrin- β 1-Kette (CD29) ist sehr hoch exprimiert, während die Integrin- α 6-Kette (CD49f) unterschiedlich stark auf allen Thymozytensubpopulationen exprimiert ist. Die DP und die DN Thymozyten zeigen keine Expression von Integrin- α 3- und β 4-Kette. Die einfach positiven $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozyten zeigen eine Expression der Integrin- α 3-(CD49c) und β 4-Kette (CD104).

Legende: Die gefüllte Fläche repräsentieren die Negativkontrolle, die weiße Fläche repräsentieren die zu untersuchende Probe.

3.2.2 Die Ko-Lokalisierung der Laminin- α 5-Kette mit DN Thymozyten

Thymozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien sind im Thymus spezifisch lokalisiert. Die vorliegende Ergebnisse zeigen *in situ* eine Ko-Lokalisierung der Laminin- α 5-Kette und der exprimierten Integrin- α 6 β 1-Rezeptoren auf subkapsulären DN Thymozyten (Abbildung 3-7). Die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen belegen, dass die Laminin- α 5-Kette (Abb. 3-7A) mit der Integrin- α 6-Kette (Abb. 3-7B) im subkapsulären Thymusbereich ko-lokalisiert. DN Thymozyten in der subkapsulären Thymusregion exprimieren Integrin- α 6-Kette (Abb. 3-7, D). Dass die Integrin- α 6-Kette auf DN Thymozyten exprimiert ist, konnte mit einem Antikörper gegen T-Zell-Rezeptor-Komplex (anti-CD3) bestätigt werden. Im subkapsulären Thymusbereich wurde keinerlei Expression von CD3 detektiert (Abb. 3-7C).

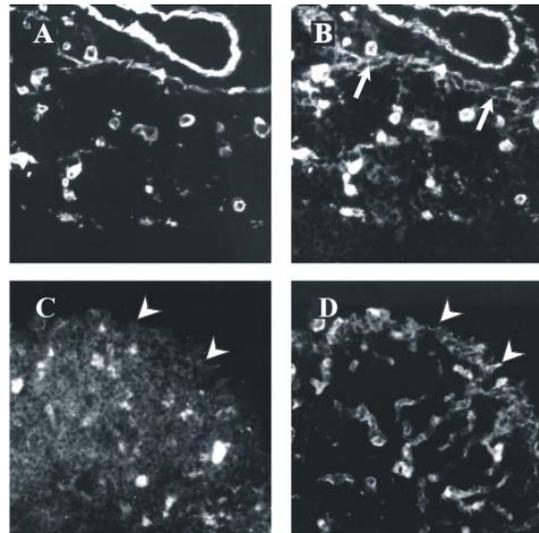


Abbildung 3-7: Doppelimmunfluoreszenzfarbungen mit dem Antikörper 4C7 gegen die Laminin- α 5-Kette (A) und mit dem Antikörper GoH3 gegen die Integrin- α 6-Kette (B, D). Die Expression der Laminin- α 5-Kette und der Integrin- α 6-Kette zeigen eine Überlappung im subkapsulären Thymusbereich (A, B, mit dem Pfeil gezeigt). Die Integrin- α 6-Kette-Expression (D) ko-lokalisiert mit den DN Thymozyten (C). Die Lokalisierung der DN Thymozyten im subkapsulären Thymusbereich konnte mit dem anti-CD3 Antikörper insofern bestätigt werden, weil es sich keine Immunreaktion in dem entsprechenden Thymusbereich zeigte (C, mit den Pfeilspitzen gezeigt). Vergrößerung $\times 160$

3.3 Funktionelle Analysen zur Rolle der Laminine in der Thymozyten-Entwicklung

3.3.1 Zell-Matrix-Interaktionen von Laminin-Isoformen mit reifenden Thymozyten

Interaktionen verschiedener Laminin-Isoformen wurden mit Thymozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien beobachtet. Laminine können Zelladhäsion vermitteln. Deshalb wurde mit Hilfe eines Zelladhäsionstests die adhäsive Funktion von LN-1, von LN-2/4, von LN-5 und LN-10/11 Isoformen zunächst mit unfraktionierten Thymozyten untersucht. Der Adhäsionstest mit den unfraktionierten Thymozyten zeigte eine deutliche adhäsive Funktion von LN-10/11, während LN-1 und LN-2/4 keinerlei adhäsive Wirkungen auf Thymozyten ausüben (Abb.3-8). Für die Untersuchungen der einzelnen Reifestadien der Thymozyten wurden die unfraktionierten Thymozyten durch magnetische Isolierung in vier verschiedene Thymozytensubpopulationen aufgetrennt. Die Reinheit der MACS-isolierten DN, DP, SP $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozytensubpopulationen wurde mittels Durchflußzytometrie geprüft und ergab eine $>95\%$ Anreicherung. Die unterschiedlichen Thymozytensubpopulationen wurden

anhand eines Adhäsionstests an LN-5 und LN-10/11 analysiert (Abb. 3-9). Die DN Thymozyten adhäreren an LN-10/11 und einfach positive CD8⁺ Thymozyten an LN-5. Die DP und einfach positive CD4⁺ Thymozyten zeigten keinerlei Adhäsion an die untersuchten Laminin-Isoformen. Andererseits zeigte auch LN-5 keinerlei adhäsive Eigenschaften für DN Thymozyten und LN-10/11 keine Bindung an SP CD8⁺ Thymozyten, was für die Spezifität der analysierten Bindungen spricht.

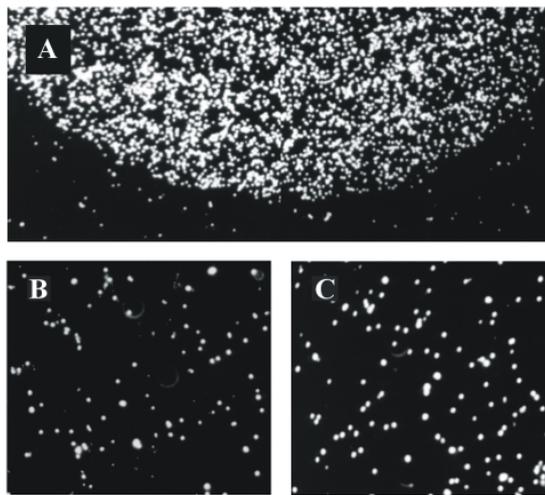


Abbildung 3-8: Adhäsionstest unterschiedlicher Laminin-Isoformen mit unfraktionierten Thymozyten. Der Test wurde mit unfraktionierten Thymozyten und LN-1, LN-2/4 und LN-10/11 (20 µg/ml), welches auf Plastik einer Petrischale immobilisiert wurde, durchgeführt. Die Thymozyten wurden in RPMI 1460 Medium, das mit 50 µM Mn²⁺ angereichert war, aufgenommen und eine Stunde mit der Laminin-Präparationen inkubiert. Die unfraktionierten Thymozyten zeigen eine starke Adhäsion an LN-10/11 (A), welche als dichte nebeneinander sitzende weiße Pünktchen im Laminin-immobilisierten Bereich der Petrischale vor dem dunkleren Hintergrund sichtbar sind. Die unfraktionierten Thymozyten zeigen aber keine Adhäsion an LN-1 (B) oder LN-2/4 (C). Vergrößerung x100.

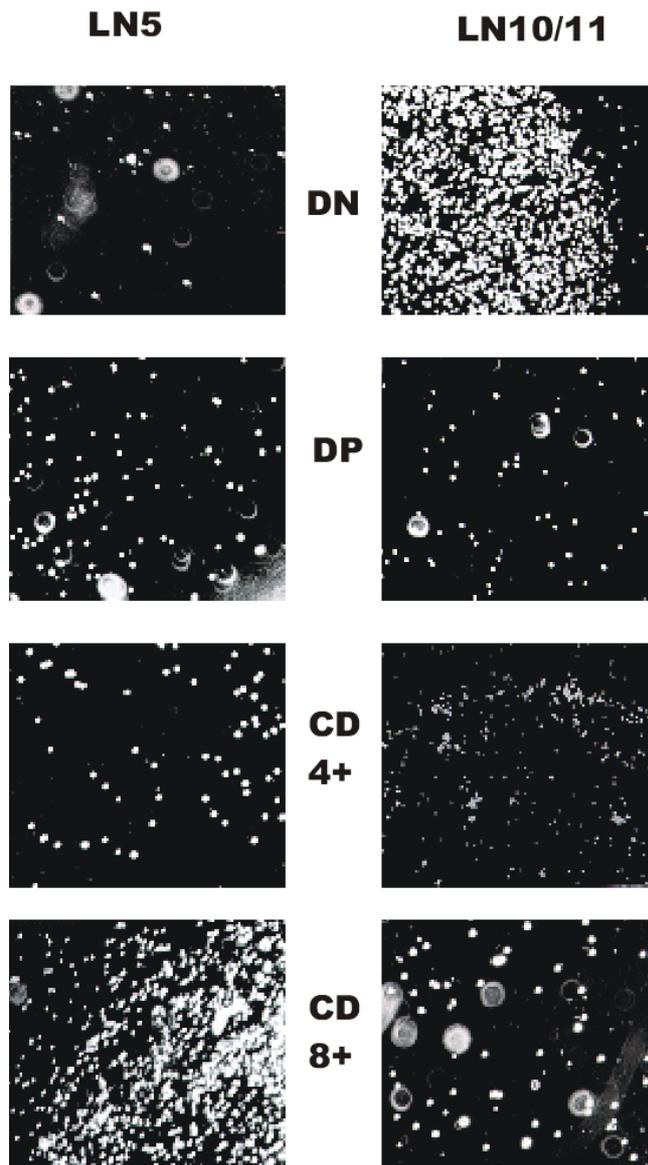


Abbildung 3-9: Adhäsionstest von LN-5 und LN-10/11 mit unterschiedlichen Thymozytensubpopulationen.

LN-5 wurde in einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ und LN-10/11 in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ auf dem Plastik immobilisiert. MACS-isolierte Thymozytensubpopulationen zeigen unterschiedliche Adhäsionsergebnisse. An LN-5 adhäreren nur SP CD8^+ Thymozyten. LN-10/11 kann nur die Adhäsion von DN Thymozyten vermitteln. DP und SP CD4^+ Thymozyten adhäreren nicht an LN-5 und LN-10/11.

(Die adhäreren Thymozyten sind als dicht nebeneinander sitzende weiße Pünktchen vor dem dunklerem Hintergrund dargestellt.)

Vergrößerung $\times 100$.

3.3.2 Funktionelle Charakterisierung von Laminin-Rezeptoren an unterschiedliche Thymozytensubpopulationen

Anhand von Inhibitionsanalysen wurden die beteiligten Laminin-Rezeptoren der adhäreren Thymozytensubpopulationen bestimmt. Auf Grund vorliegender Durchflußzytometrie-Ergebnisse war bekannt, dass die DN Thymozyten den Integrin- $\alpha 6\beta 1$ -Rezeptor und die einfach positiven CD8^+ Thymozyten die Integrin- $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ -Rezeptoren exprimieren können. Um zu bestätigen, dass die Adhäsion von DN Thymozyten durch exprimiertes Integrin- $\alpha 6\beta 1$ vermittelt wird, wurden die DN Thymozyten mit dem GoH3-Antikörper gegen die Integrin- $\alpha 6$ -Kette und mit dem 4B4-Antikörper gegen die Integrin- $\beta 1$ -Kette vorinkubiert (Abb. 3-10). Andererseits wurde das immobilisierte LN-10/11

mit einem polyklonalen Serum gegen LN-10/11 vorinkubiert. Danach zeigen die DN Thymozyten keinerlei Adhäsion mehr, was die Spezifität der Interaktion belegt (Abb. 3-10D). Die DN Thymozyten, welche mit den Integrin-Ketten-Antikörpern vorinkubiert wurden, adhären ebenfalls nicht mehr an LN-10/11 (Abb. 3-10B, C).

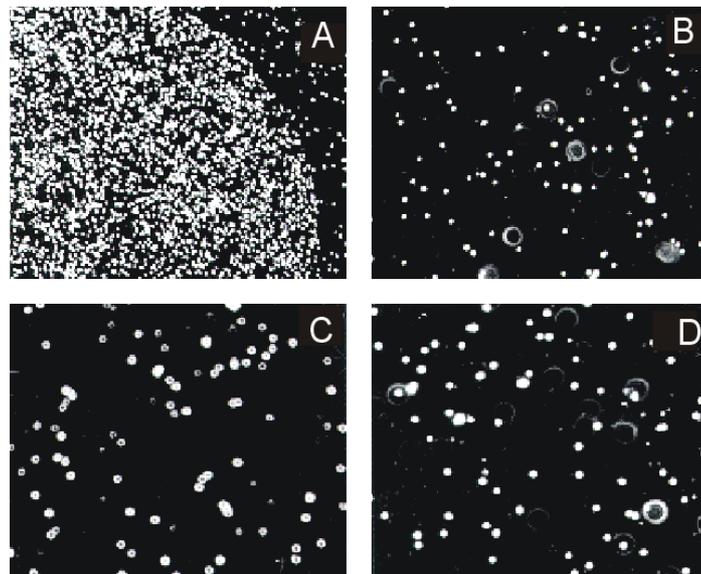


Abbildung 3-10: Adhäsionstest von DN Thymozyten mit funktionsblockierenden Antikörpern. Durch MACS gewonnene DN Thymozyten wurden mit dem GoH3-Antikörper gegen die Integrin- α 6-Kette (B) und dem 4B4-Antikörper gegen die Integrin- β 1-Kette (C) vorinkubiert. Diese Vorinkubationen hemmen die Thymozytenadhäsion an LN-10/11 (20 μ g/ml). Die Vorinkubation mit dem polyklonalen Serum gegen LN-10/11 blockiert ebenso die Thymozytenadhäsion (D). Die Ergebnisse belegen, dass die Adhäsion durch den Integrin- α 6 β 1-Rezeptor erfolgt. Abb. A zeigt die Adhäsion von DN Thymozyten an LN-10/11 ohne Vorinkubation mit Antikörpern. Vergrößerung x100

Um den verantwortlichen Integrin-Rezeptor für LN-5, welcher die Adhäsion der einfach positiven CD8⁺ Thymozyten vermittelt, zu bestimmen, wurden die SP CD8⁺ Thymozyten mit Antikörpern gegen die exprimierten Integrin-Ketten α 3, α 6, β 1 und β 4 vorinkubiert (Abb. 3-11). Der P1B5-Antikörper gegen Integrin- α 3-Kette (Abb. 3-11B), sowie der 4B4-Antikörper gegen Integrin- β 1-Kette (Abb. 3-11C) konnten die Thymozytenadhäsion nicht blockieren. Eine partielle Adhäsion der SP CD8⁺ Thymozyten zeigte sich nach Vorinkubation mit dem GoH3-Antikörper, welcher gegen die Integrin- α 6-Kette gerichtet ist (Abb. 3-11D), während sich eine vollständige Blockierung der Adhäsion nur bei gleichzeitiger Vorinkubation mit dem GoH3-Antikörper und dem 439-9B-Antikörper gegen Integrin- β 4-Kette zeigte (Abb. 3-

11E). Daraus ist abzuleiten, dass die Adhäsion der SP CD8⁺ Thymozyten an LN-5 durch den Integrin- $\alpha\beta$ 4-Rezeptor vermittelt wird.

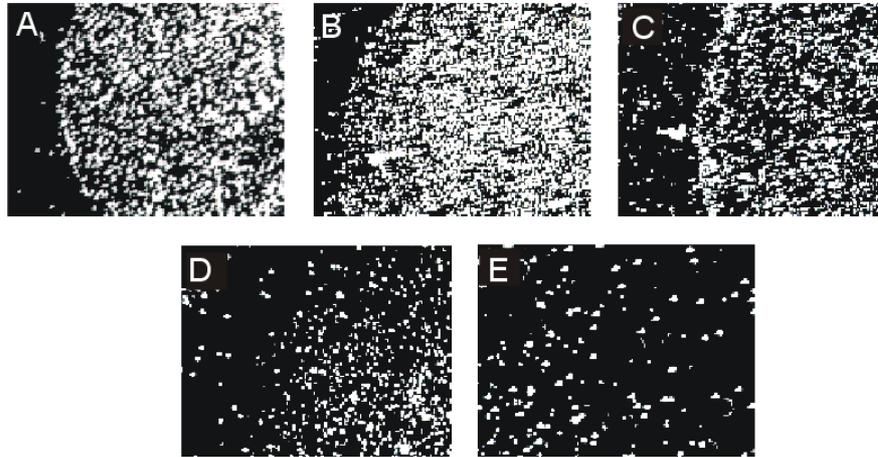


Abbildung 3-11: Adhäsionstest SP CD8⁺ Thymozyten in Gegenwart funktionsblockierender Antikörper. Die Vorinkubation der MACS-isolierten SP CD8⁺ Thymozyten mit dem P1B5-Antikörper gegen die Integrin- α 3-Kette verhindert nicht die Adhäsion an LN-5 (25 μ g/ml) (B), ebenso wenig wie die Vorinkubation mit dem 4B4-Antikörper gegen die Integrin- β 1-Kette (C). Eine partielle adhäsive Hemmung der SP CD8⁺ Thymozyten zeigt sich mit dem GoH3-Antikörper, der gegen die Integrin- α 6-Kette gerichtet ist (D). Die gleichzeitige Vorinkubation mit dem GoH3-Antikörper und dem 439-9B-Antikörper gegen die Integrin- β 4-Kette kann die Zelladhäsion vollständig hemmen (E). Daraus lässt sich ableiten, dass die Adhäsion durch den Integrin- $\alpha\beta$ 4-Rezeptor vermittelt wird. (A) zeigt die Adhäsion einfach positiver CD8⁺ Thymozyten an LN-5 ohne Vorinkubation mit Antikörpern. Vergrößerung x85.

3.3.3 Die Beteiligung von LN-5 und LN-10/11 an der Zellproliferation reiferer Thymozyten

Für Laminin-10/11 konnte eine adhäsive Wirkung sowie ein mitogener Effekt auf frisch isolierte CD34⁺ hämatopoetische Progenitorzellen nachgewiesen werden (Siler et al., 2000). Weil in den vorausgegangenen Untersuchungen Wechselwirkungen von DN Thymozyten mit LN-10/11 und der SP CD8⁺ Thymozyten mit LN-5 detektiert werden konnten, wurden die adhärierenden Thymozytensubpopulationen für weitere funktionelle Studien herangezogen. Anhand eines Proliferationstests wurde die mitogene Eigenschaft von LN-5 und LN-10/11 bei Thymozyten analysiert. DN Thymozyten wurden mit löslichen LN-10/11-Präparation und SP CD8⁺ Thymozyten mit löslichen LN-5-Präparation stimuliert (Abb. 3-12). Nach einer viertägigen Stimulation wurde allerdings kein Einfluss von LN-5 sowie von LN-10/11 auf

die Zellproliferation der untersuchten Thymozytensubpopulationen bemerkt (Abb. 3-12). Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz, in welchem die SP CD8⁺ Thymozyten mit PHA/IL-2 stimuliert wurden, durchgeführt. Der Ansatz mit Zugabe von LN-5 zeigt, dass das LN-5 keinen inhibitorischen Effekt auf die mit PHA und IL-2 induzierte Zellproliferation hatte (Abb. 3-12). Als Negativkontrolle wurden die untersuchten Thymozytensubpopulationen mit löslichem LN-2/4 stimuliert, da die vorausgegangenen Ergebnisse gezeigt hatten, dass das LN-2/4 keine adhäsive Funktion auf DN und SP CD8⁺ Thymozyten ausüben konnte.

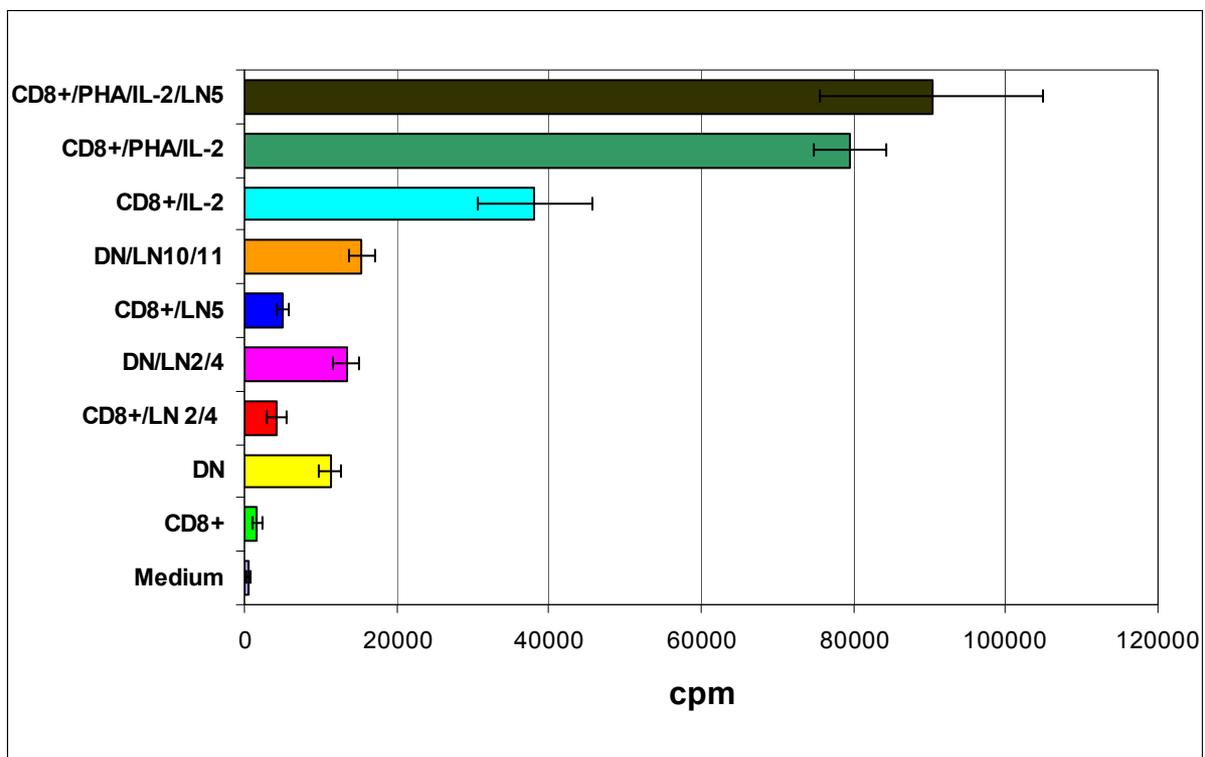


Abbildung 3-12: Proliferationstest von SP CD8⁺ Thymozyten mit LN-5 (10µg/ml) und von DN Thymozyten mit LN-10/11 (10µg/ml).

Die Zellen wurden für vier Tage im Zellkulturmedium (RPMI 1640) in Gegenwart von LN-2/4 (10µg/ml), LN-5 und LN-10/11 inkubiert. Der Ansatz mit PHA/IL-2-Stimulation wurde als Positivkontrolle eingesetzt, während der Ansatz mit LN-2/4-Stimulation als Negativkontrolle verwendet wurde. LN-5 und LN-10/11 zeigen keinen mitogenen Effekt auf die untersuchten Thymozytensubpopulationen. LN-5 konnte die induzierte Proliferation mit PHA und IL-2 nicht inhibieren.

3.4 Bedeutung von E-Cadherin in der Thymozyten-Entwicklung

3.4.1 Untersuchung der Cadherin- und Catenin-Expression im humanen Thymus

Cadherine und ihre assoziierten zytoplasmatischen Proteine α -, β - und γ -Catenin spielen eine wichtige Rolle bei Zell-Adhäsionsmechanismen und sind auch bei der Aufrechterhaltung der Gewebsintegrität beteiligt. Für ihre funktionelle biologische Aktivität benötigen Cadherine die Assoziation mit zytoplasmatischen Cateninen. E-Cadherin vermittelt hauptsächlich Calcium-abhängige homotypisch-homophile Zell-Zell-Interaktionen und ist in fast jedem epithelialen Gewebe exprimiert.

Die Expression von E- und P-Cadherin sowie der beteiligten Catenine im humanen Thymus wurde in Western Blot-Analysen und in Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Die Lokalisierung von E-Cadherin wurde mit dem Antikörper 67A4, welcher im Labor von Dr. Bühring (Medizinische Klinik II, Universität Tübingen) hergestellt wurde, untersucht (Abb. 3-13). E-Cadherin zeigt eine starke Expression im medullären Thymusbereich (Abb. 3-13A). Die Ko-Lokalisierung von E-Cadherin mit der Expression des TE4-Antikörpers (Abb. 3-13C), welcher ausschließlich medulläre Thymus-Epithelzellen erkennt (Abb. 3-13B), bestätigte, dass E-Cadherin im Thymus auf den Epithelzellen der Medulla gefunden werden kann. In Western Blot-Analysen wurde die E-Cadherin-spezifische Bande bei 120 kDa nachgewiesen (Abb.3-15, Spur-A).

Immunfluoreszenzfärbungen von Thymusschnitten mit dem Antikörper NCC-CAD 299 gegen P-Cadherin, welchen wir von Dr. Hirohashi (National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan) erhielten, zeigte die Expression von P-Cadherin im kortikalen Thymusbereich (Abb. 3-14A). Kortikale und medulläre Thymus-Epithelzellen exprimieren α - und β -Catenin (Abb. 3-14B, C), während γ -Catenin hauptsächlich von medullären Epithelzellen exprimiert zu werden scheint (Abb. 3-14D).

Abbildung 3-15 zeigt Western Blot-Analysen von Proteinextrakten aus homogenisiertem Thymusgewebe, das auf ein 10% SDS-Acrylamid-Gel aufgetragen wurde. Spezifische Banden mit entsprechenden Proteingrößen konnten für P-Cadherin bei 120 kDa (Spur-2), für α -Catenin bei 102 kDa (Spur-3), für β -Catenin bei 94 kDa (Spur-4) und für γ -Catenin bei 85 kDa (Spur-5) detektiert werden. In diesen Analysen zeigte sich eine partielle Proteindegradation des analysierten Proteinextraktes beim Nachweis von E-Cadherin (Abb. 3-15, Spur-1) und β -Catenin (Abb. 3-15, Spur-4).

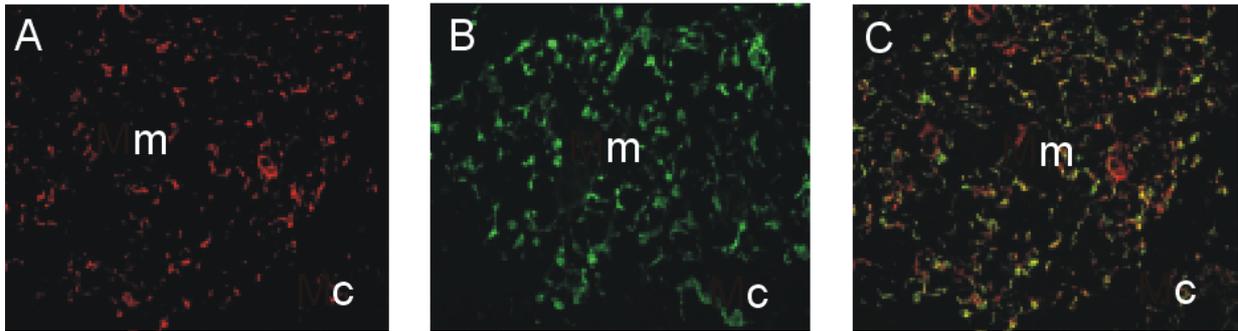


Abbildung 3-13: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin und einem medullären Epithelzellmarker im Thymus. Die Färbungen wurden mit dem Antikörper 67A4 gegen E-Cadherin (A) und TE4-Antikörper (Marker für medulläre Thymus-Epithelzellen) (B) durchgeführt. Abbildung C zeigt die Überlappung der Expression beider Antigene auf medullären Epithelzellen.

Legende: mit „m“ ist die medulläre und mit „c“ die kortikale Thymusregion bezeichnet. Vergrößerung x55

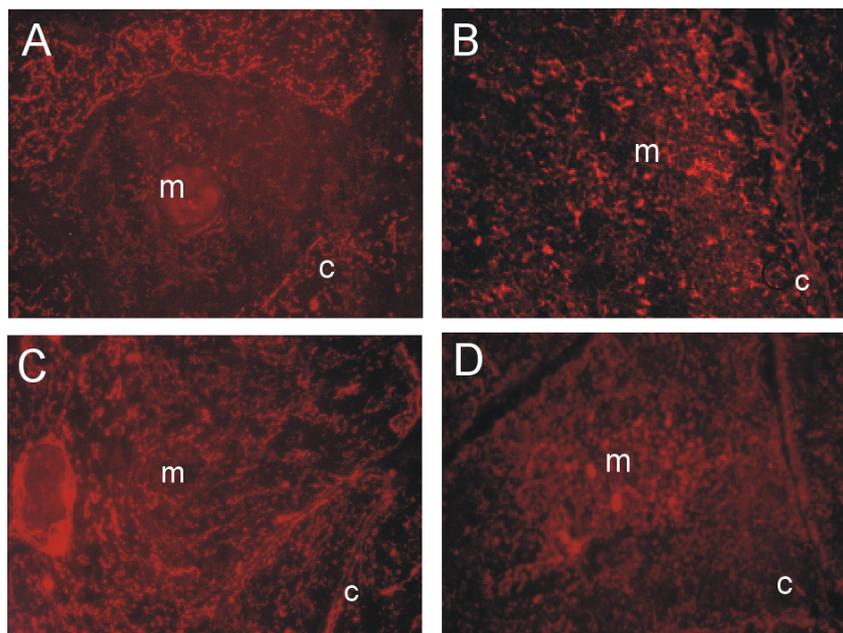


Abbildung 3-14: Immunfluoreszenz-Analyse von P-Cadherin und Cateninen auf Thymusschnitten. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Antikörper NCC-CAD 299 gegen P-Cadherin (unverdünnter Zellkultur-Überstand) sowie monoklonalen Antikörpern gegen α -, β - und γ -Catenin (1:100) und einem Cy³-gekoppelten Zweitantikörper (1:500) durchgeführt. Die Expression von P-Cadherin ist deutlich im kortikalen Thymusbereich zu erkennen (A). Kortikale und medulläre Thymus-Epithelzellen exprimieren α -Catenin (B) ebenso wie β -Catenin (C). Die Expression von γ -Catenin ist hauptsächlich auf medullären Thymus-Epithelzellen begrenzt (D).

Legende: „m“ bezeichnet den medullären Thymusbereich und „c“ den kortikalen Thymusbereich. Vergrößerung x100.

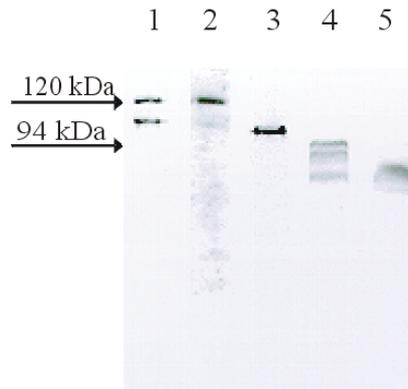


Abbildung 3-15: Nachweis von Cadherinen und Cateninen im Western Blot. Thymusextrakt wurde in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 67A4 (1:100, gegen E-Cadherin), dem monoklonalen Antikörper NCC-CAD 299 (unverdünnter Zellkultur-Überstand) gegen P-Cadherin, den monoklonalen Antikörpern gegen α -, β - und γ -Catenin wurden die gebundenen Antikörper mit einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper (1:400) detektiert. Nach BCIP/NBT-Entwicklung konnten spezifische Signale für E- (Spur-1) und P-Cadherin (Spur-2) bei 120 kDa, für α -Catenin bei 102 kDa (Spur-3), für β -Catenin bei 94 kDa (Spur-4) und bei γ -Catenin bei 85 kDa (Spur-5) detektiert werden.

Cadherine können Zell-Zell-Adhäsion nur dann vermitteln, wenn sie durch Assoziation mit intrazellulären Cateninen mit dem Zytoskelett verbunden sind. Diese notwendige Interaktion von Cadherinen mit Cateninen wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation untersucht. Die Ko-Immunpräzipitation-Methode ermöglicht, dass der Antikörper an das native Antigen mit assoziierten Proteinen binden kann und diese kopräzipitiert. In einer nachfolgenden Western Blot-Analyse kann mit einem Antikörper gegen das assoziierte Protein diese Cadherin-Catenin-Verknüpfung nachgewiesen werden. Hierfür wurden Proteinlysate vom Thymusgewebe mit den monoklonalen Antikörpern gegen E-Cadherin (HECD-1) und γ -Catenin sowie mit polyklonalen Seren gegen α - und β -Catenin immunpräzipitiert. Die gewonnenen Immunpräzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und einem Western Blot mit einem anti-E-Cadherin-Antikörper (67A4) und einem monoklonalen anti- β -Catenin-Antikörper unterzogen. Die nicht-radioaktive Immunpräzipitation mit α -, β - und γ -Catenin und die anschließende Western Blot-Analyse mit dem verwendeten anti-E-Cadherin-Antikörper zeigt die Proteinbanden bei 120 kDa (Abb. 3-16, Spur-2,-3,-4) und damit eine funktionelle Assoziation von E-Cadherin mit α -, β - und γ -Catenin. Eine deutliche Assoziation von β -Catenin mit E-Cadherin (Abb. 3-16, Spur-6) und α -Catenin (Abb. 3-16, Spur-7) ist durch die Banden bei 94 kDa zu erkennen. Dass β -Catenin mit γ -Catenin keine Komplexe bindet, konnte in diesen Immunpräzipitationen ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 3-16, Spur-9).

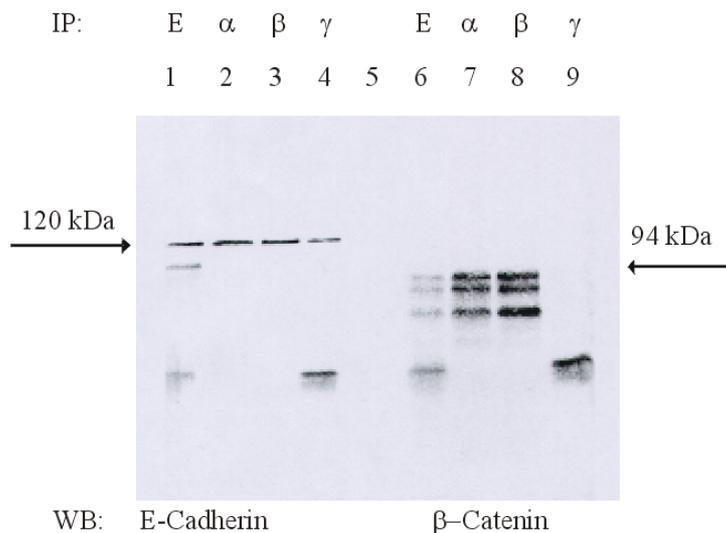


Abbildung 3-16: Immunpräzipitation von Thymusextrakten. Proteinlysate aus Thymusgewebe wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen E-Cadherin und γ -Catenin sowie mit polyklonalen Seren gegen α - und β -Catenin immunpräzipitiert. Nach einer einstündigen Präzipitation mit Protein-G-Sepharose wurde das Protein-G-Antikörper-Antigen-Präzipitat einer Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen E-Cadherin und β -Catenin unterzogen und mit BCIP/NBT entwickelt. Die Spuren -2, -3 und -4 zeigen eine Verbindung von E-Cadherin mit α -, β - und γ -Catenin und die Spuren -6 und -7 belegen eine direkte Interaktion von β -Catenin mit E-Cadherin und α -Catenin. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne kopräzipitierenden Antikörper verwendet (Spur-5).

Legende: IP: Immunpräzipitation; WB: Western Blot

Ob die E-Cadherin-Expression unabhängig vom Thymusalter gleich stark vorhanden war, wurde an Hand von Thymusgefrierschnitten unterschiedlichen Alters in Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Gleichzeitig wurde auch die Expression eines weiteren klassischen Cadherins, des N-Cadherins, über dessen Expression im humanen Thymus einige präliminare Daten vorlagen, einer altersabhängigen Untersuchung unterzogen. Abbildung 3-17 zeigt eine veränderte Expression von E-Cadherin während der Entwicklung. Eine starke Expression ist bei einem 3 Tage alten Thymus in medullären Epithelzellen und eine schwächere Expression in kortikalen Epithelzellen zu sehen (Abb. 3-17A). Schon im achtmonatigen Thymus ist die E-Cadherin-Expression auf den medullären Thymusbereich restringiert (Abb. 3-17B). Im neunjährigen Thymus ist nur noch eine ziemlich schwache Expression in der Medulla zu beobachten (Abb. 3-17C). Demgegenüber ist die Expression von N-Cadherin bei einem drei Tage und einem achtmonatigen alten Thymus nicht zu detektieren (Abb. 3-17D, E). Im neunjährigen Thymus lässt sich eine Expression von N-Cadherin im kortikalen und eine schwächere Expression im medullären Thymusbereich nachweisen (Abb. 3-17F). Diese Expressionsanalysen zeigen, dass im Laufe der Entwicklung

im Thymus die E-Cadherin-Expression herunter- und die N-Cadherin-Expression hochreguliert werden kann.

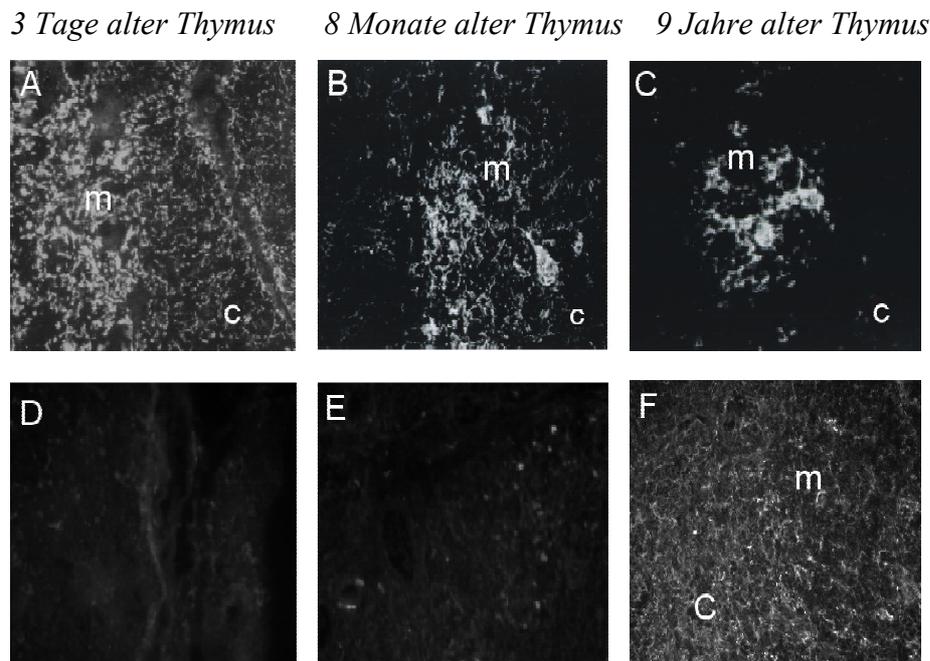


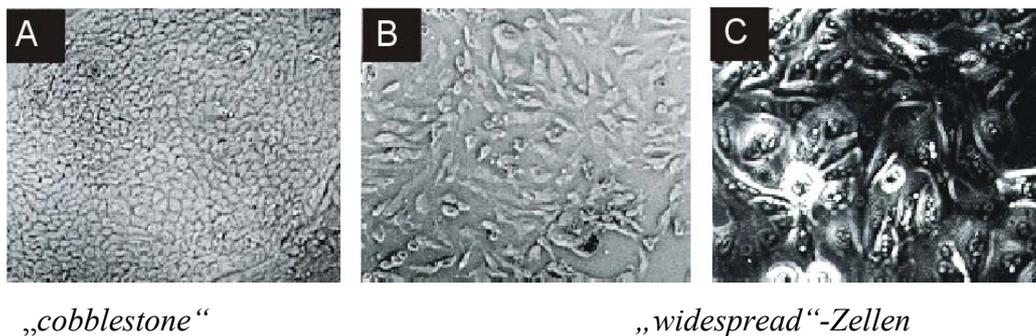
Abbildung 3-17: Expressionsanalyse von E- und N-Cadherin in Thymusschnitten unterschiedlichen Alters. Die Aceton-fixierten Thymusschnitte wurden mit dem Antikörper gegen E-Cadherin (67A4, 1:100) und dem Antikörper 8C11 gegen N-Cadherin (1:100) und einem Cy³-gekoppelten Zweitantikörper (1:500) inkubiert. E-Cadherin ist stark im medullären und schwächer im kortikalen Thymusbereich bei einem 3 Tage altem Thymus exprimiert (A). Die E-Cadherin-Expression wird mit dem Thymusalter herunterreguliert und begrenzt sich schließlich auf die medulläre Thymusregion (B und C), während N-Cadherin im Laufe der Entwicklung hochreguliert wird (D-E-F). Vergrößerung x50

3.4.2 Expressionsanalyse primärer Thymus-Epithelzellen

Der Thymus bietet für die T-Zell-Entwicklung ein strukturell organisiertes Mikromilieu, in welchem die T-Zellen eine Reihe von Reifungsstadien durchlaufen. Für ihre Entwicklung benötigen sie direkte Interaktionen mit unterschiedlichen Stromazellen. Zu diesen Stromazellen zählen kortikale und medulläre Epithelzellen des Thymus. Um Interaktionen reifender Thymozyten mit Epithelzellen genauer untersuchen zu können, wurden primäre Thymus-Epithelzellen isoliert und kultiviert. Die Kultur primärer Thymus-Epithelzellen wurde morphologisch verfolgt. Die Phänotypisierung erfolgt in Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot-Analysen. Abbildung 3-18 zeigt die Morphologie kultivierter primären Thymus-Epithelzellschichten im Phasenkontrast. Hierbei kann man zwischen „cobblestone“

(A) und sogenannte „widespread“-Zellen (B, C) mit längeren zytoplasmatischen Ausläufern unterscheiden (Röpke, 1997).

Mit spezifischen Antikörpern gegen kortikale (TE3) und medulläre (TE4) Thymus-Epithelzellen wurden isolierte Thymus-Epithelzellen analysiert. Die kultivierten Epithelzellen zeigen eindeutige Immunreaktionen mit dem TE3 und dem TE4 Antikörper. Die gleichzeitige positive Immunreaktion mit den verwendeten Markern weist auf eine heterogene Natur primärer Thymus-Epithelzellen hin (Abb. 3-19).



„cobblestone“

„widespread“-Zellen

Abbildung 3-18: Morphologie primärer Thymus-Epithelzellen. A zeigt die Phasenkontrastaufnahme kultivierter Epithelzellen als „cobblestone“. In B/C sind „widespread“-Zellen, welche miteinander durch ihre langen zytoplasmatischen Ausläufer verbunden sind, zu erkennen. Vergrößerung A/B- x175, C-x350

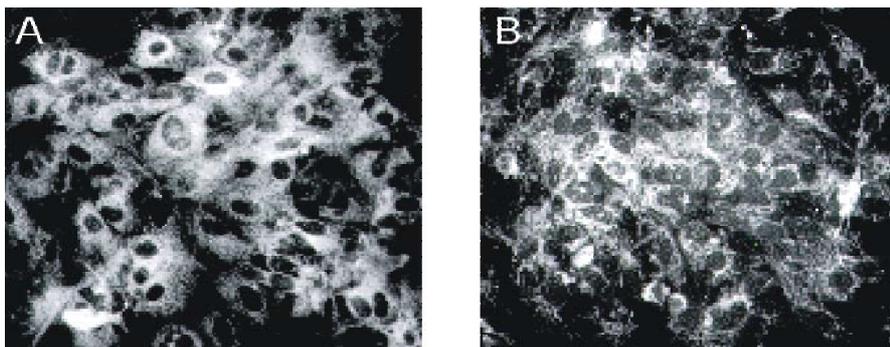


Abbildung 3-19 zeigt indirekte Immunfluoreszenzfärbungen kultivierter Thymus-Epithelzellen. In „8-Well Chamber CultureSlides“ wurden die Zellen mit dem Antikörper TE3 (unverdünnter Hybridoma-Überstand) und mit einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper (1:500) sowie mit dem Antikörper TE4 (unverdünnter Hybridoma-Überstand) und einem spezifischen Cy2-gekoppelten Zweitantikörper (1:200) inkubiert. Die Epithelzellen zeigen eine positive Immunreaktion gegen TE3, welcher kortikale Thymus-Epithelzellen erkennen kann (A) und gegen TE4 (B), welcher medulläre Thymus-Epithelzellen erkennt. Vergrößerung x 175

Da eine E-Cadherin-Expression für Epithelien charakteristisch ist und die vorausgegangene Analysen gezeigt hatten, dass im Thymus neben E-Cadherin- auch noch die P-Cadherin-Expression nachzuweisen war, wurden die kultivierten Epithelzellen auch auf die Expression von klassischen Typ I Cadherinen und zusätzlich von Cateninen untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbungen primärer Thymus-Epithelzellen (Abb. 3-20) zeigen eine deutliche Expression von E- und P-Cadherin, ebenso von zytoplasmatischen α -, β - und γ -Catenin. Die Cadherine und Catenine sind hierbei an der Zelloberfläche in Zell-Zell-Kontakt lokalisiert. Western Blot-Analysen wurden mit Gesamtproteinextrakt von primären Thymus-Epithelzellen durchgeführt (Abb. 3-21). E- und P-Cadherin konnten durch Proteinbanden bei 120 kDa (Spur-1,-2), α -Catenin bei 102 kDa (Spur-3), β -Catenin bei 94 kDa (Spur-4) und γ -Catenin bei 85 kDa (Spur-5) nachgewiesen werden.

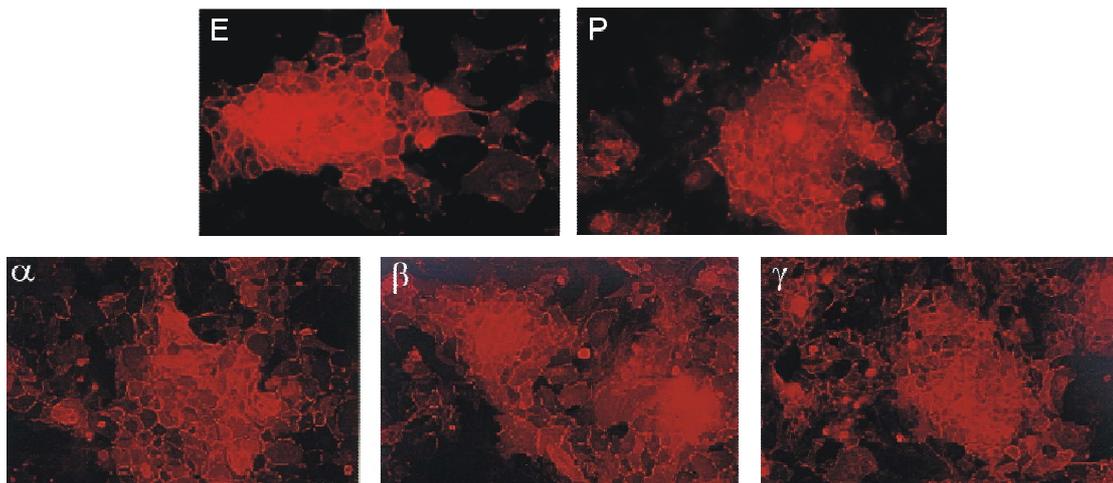


Abbildung 3-20: Immunfluoreszenzfärbungen kultivierter primärer Thymus-Epithelzellen in „8-Well Chamber CultureSlides“ beschichtet mit Kollagen Typ I. Die Epithelzellen wurden mit Methanol fixiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen γ -Catenin, gegen E-Cadherin sowie mit P-Cadherin und mit polyklonalen Antiseren gegen α - und β -Catenin inkubiert. Nach nachfolgender einstündiger Inkubation mit einem Cy³-gekoppelten Zweitantikörper konnten eindeutig positive Immunreaktionen an Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden. Vergrößerung x 100

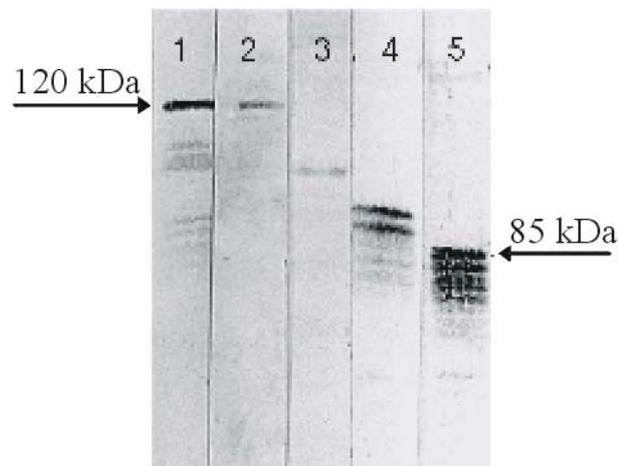


Abbildung 3-21: Western Blot-Analyse der E-, P-Cadherin-, α -, β - und γ -Catenin-Expression von primären Thymus-Epithelzellen. Primäre Thymus-Epithelzellen wurden mit CAM-Puffer lysiert. Der Gesamtproteinextrakt wurde in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach einer einstündigen Inkubation mit den polyklonalen Antisera gegen α - und β -Catenin (1:100), mit dem monoklonalen Antikörper gegen γ -Catenin (1:100), mit Antikörper HECD-1 gegen E-Cadherin (1:100), sowie mit dem Antikörper NCC-CAD 299 gegen P-Cadherin (unverdünnter Zellkultur-Überstand) und einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper (1:400), konnten spezifische Signale für E- (Spur-1) und P-Cadherin (Spur-2) bei 120 kDa, für α -Catenin bei 102 kDa (Spur-3), für β -Catenin bei 94 kDa (Spur-4) und bei γ -Catenin bei 85 kDa (Spur-5) detektiert werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurde beobachtet, dass der Phänotyp der isolierten primären Thymus-Epithelzellen durch unterschiedliche Kulturbedingungen entscheidend beeinflusst werden kann. Primäre Thymus-Epithelzellen, die gleichzeitig E- und P-Cadherin exprimieren, wurden in OPTIMEM I serumfreiem Medium ohne Zusätze auf Kollagen Typ I oder auf Kollagen Typ IV beschichteten Petrischalen kultiviert (Abb. 3-22A). Wurden die Epithelzellen allerdings auf Kollagen Typ I beschichtete Petrischalen in einem mit D-Valin angereichertem Medium mit 5% FCS kultiviert, zeigen sie ausschließlich eine N-Cadherin-Expression (Abb. 3-22B). Unter solchen Kulturbedingungen konnte keine Expression von E-Cadherin in primären Epithelzellen nachgewiesen werden. Wenn die Epithelzellen im D-Valin angereichten Medium aber auf Kollagen Typ IV beschichteten Petrischalen kultiviert wurden, exprimieren sie erneut E-Cadherin, aber kein N-Cadherin (Abb. 3-22C). Primäre Thymus-Epithelzellen zeigen keine Heterogenität, sie exprimieren entweder E- oder N-Cadherin.

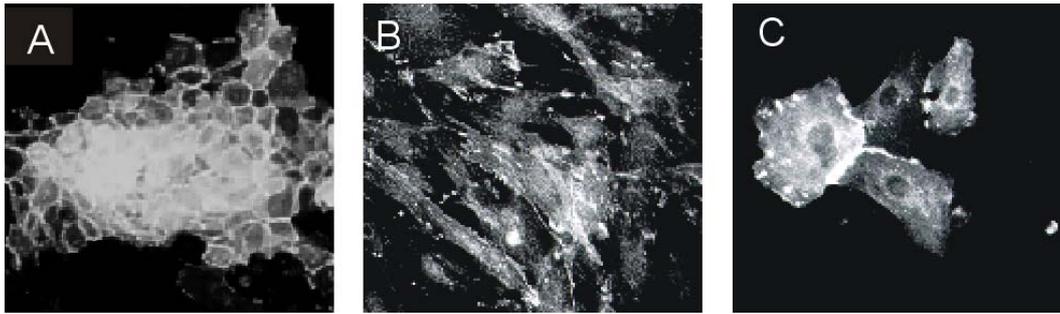


Abbildung 3-22: Charakterisierung des Phänotyps primärer Thymus-Epithelzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen. Im OPTIMEM I Medium auf Kollagen Typ I beschichteten Petrischalen sind die kultivierten Epithelzellen E-Cadherin positiv (A). Die im D-Valin Medium mit 5 % FCS auf Kollagen Typ IV kultivierten Epithelzellen zeigen auch eine Expression von E-Cadherin (C). Wurden die Epithelzellen allerdings im D-Valin Medium auf Kollagen Typ I kultiviert, ließ sich mit dem Antikörper 8C11 eine Expression von N-Cadherin nachweisen (B). Vergrößerung x 175.

3.4.3 Expressionsanalyse der Integrin- α E-Kette (CD103) auf reifenden Thymozyten

Epithelzellen, die E-Cadherin exprimieren, können durch homophile Interaktionen aneinander adhären. E-Cadherin kann aber auch heterophile Zellbindungen vermitteln. Als erstes Beispiel wurde die Interaktion von E-Cadherin auf Darmepithelzellen und Integrin- α E β 7 auf intraepithelialen Lymphozyten von Cepek und Mitarbeiter beobachtet (1994). Bislang ist E-Cadherin der einzige bekannte Ligand für Integrin- α E β 7. Um nachzuweisen, ob E-Cadherin eine homophil-heterotypische oder eine heterophil-heterotypische Interaktionen von humanen Thymozyten mit Thymus-Epithelzellen vermittelt, wurden die Thymozyten einer Durchflußzytometrie unterzogen. In diesen Analysen wurde die Expression von E- und P-Cadherin sowie der Integrin- α E-Kette auf unfraktionierten Thymozyten untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 3-23 belegen, dass keine Expression von E- und P-Cadherin auf unfraktionierten humanen Thymozyten gefunden werden kann.

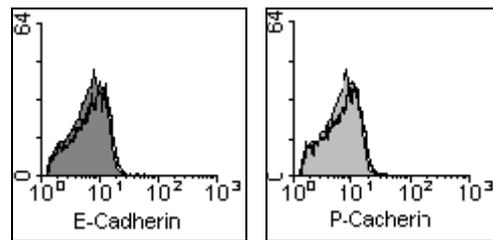


Abbildung 3-23: Durchflußzytometrische Analyse unfractionierter Thymozyten auf E- und P-Cadherin. Die Thymozyten wurden mit dem Antikörper 67A4 gegen E-Cadherin und mit dem Antikörper NCC-CAD 299 gegen P-Cadherin inkubiert. Humane Thymozyten zeigen keine Expression von E- und P-Cadherin.

Legende: Die gefüllte Fläche repräsentiert die Negativkontrolle, die dunkel schwarze Linie repräsentiert die zu untersuchende Probe.

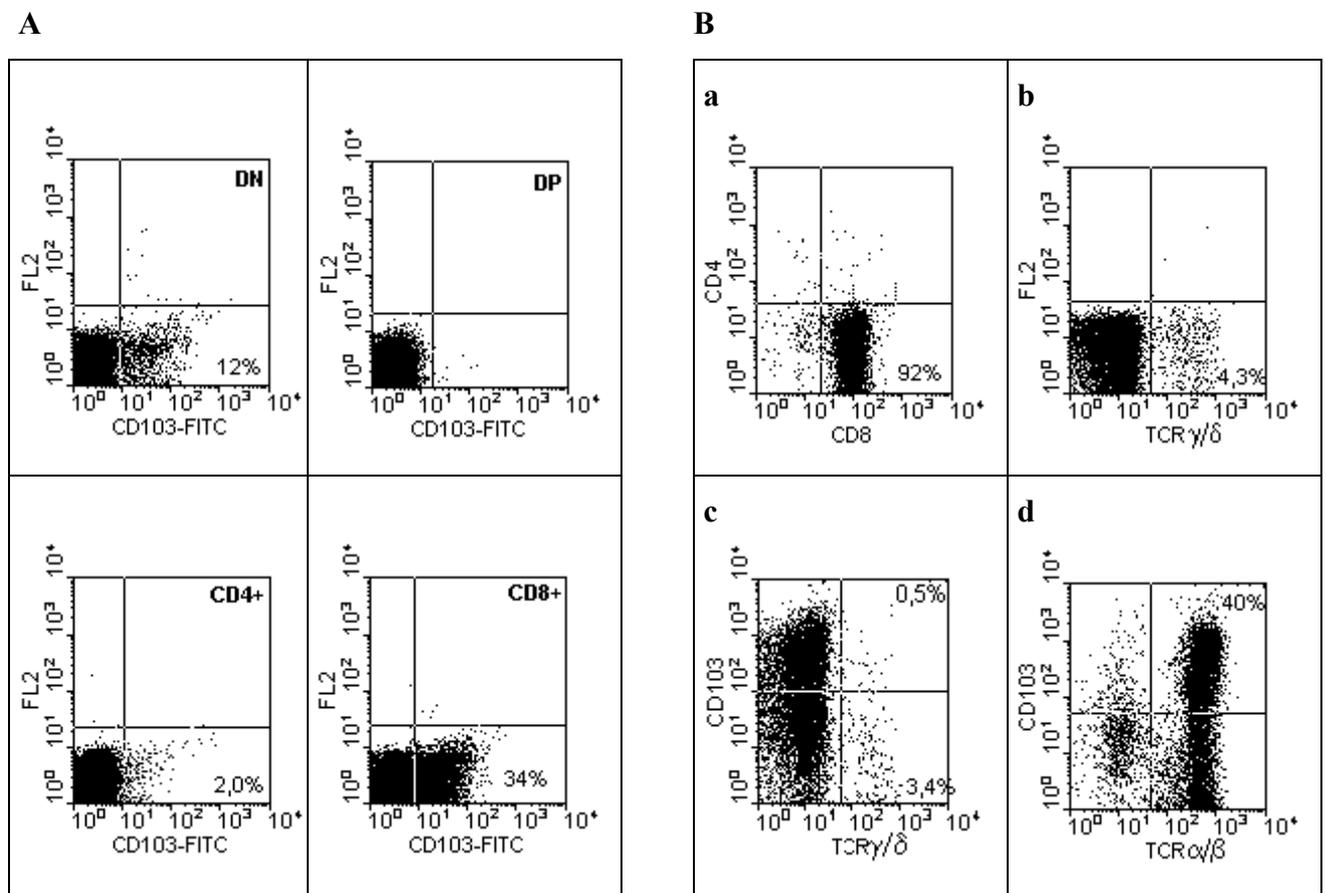


Abbildung 3-24A: Verteilung die CD103-Expression auf verschiedenen Thymozytensubpopulationen. 12% der DN Thymozyten exprimieren CD103, während die DP Thymozyten keine Expression von CD103 zeigen. Die SP CD4⁺ exprimieren kaum CD103 (0-2%). Dagegen zeigen SP CD8⁺ die höchste Expression von CD103 (34%).

Abb. 3-24Ba belegt die Sauberkeit der isolierten einfach positiven CD8⁺ Zellen. Die CD8⁺/CD103⁺ Thymozyten sind TCR α/β positiv (3-24Bd) und TCR γ/δ negativ (3-24Bc). Nur ca. 4% aller einfach positiven CD8⁺ Thymozyten sind TCR γ/δ positiv (3-24Bb).

Die unfraktionierten Thymozyten zeigen aber eine Expression der Integrin- α E-Kette. Um die genaue Verteilung der Integrin- α E-Kette auf verschiedenen Thymozytensubpopulationen bestimmen zu können, wurden Thymozytensubpopulationen unterschiedlicher Reifungsstadien durch MACS isoliert. Die isolierten SP CD8⁺ und DN Thymozyten zeigen eine Expression von Integrin- α E, wobei die Expression von CD103 in den SP CD8⁺ Thymozyten mit 34% am höchsten ist. Nur 12% der DN Thymozyten exprimieren CD103. SP CD4⁺ Thymozyten exprimieren kaum CD103 (0-2%), DP Thymozyten zeigen keinerlei Expression von CD103 (Abb. 3-24A). Um zu untersuchen, welchen T-Zell-Rezeptor die einfach positiven CD8⁺/CD103⁺ Thymozyten exprimieren, wurden Doppelfärbungen durchgeführt (Abb. 3-24B). Dabei wurde auch die Sauberkeit der isolierten einfach positive CD8⁺ Thymozyten überprüft. Durch MACS-Isolierung wurde eine >92% reine SP CD8⁺ Population erhalten (Abb. 3-24Ba). Fast alle CD103⁺ exprimierenden Thymozyten sind auch T-Zell-Rezeptor α/β positiv (Abb. 3-24Bd) und zeigen nur eine äußerst geringe Expression des T-Zell-Rezeptors γ/δ (Abb. 3-24Bc). Diesen Rezeptor exprimiert nur eine kleine Subpopulation der einfach positiven Thymozyten CD8⁺ (Abb. 3-24Bb).

Altersabhängige Studien im Thymus hatten gezeigt, dass die E-Cadherin-Expression im Laufe der Entwicklung herunterreguliert wird. Bei den Untersuchungen der CD103-Expression auf DN und SP CD8⁺ Thymozyten unterschiedlichen Thymusalters wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet. Die CD103-Expression wird in älteren Thymi deutlich herunterreguliert (Abb. 3-25). Die Verringerung beginnt nach dem ersten Lebensjahr.

Um die Lokalisierung der CD103-Expression *in situ* genauer zu analysieren, wurde eine immunhistochemische Peroxidase-DAB-Färbung durchgeführt. Die Thymusschnitten wurden mit einem Antikörper gegen CD103 und mit einem spezifischen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, welcher an ein Dextran-Rückgrat gekoppelt war, inkubiert. Nach der DAB-Entwicklung konnten braun gefärbte Zelloberflächen im medullären Thymus detektiert werden, die auf CD103⁺ positive medulläre Thymozyten hinweisen (Abb. 3-26).

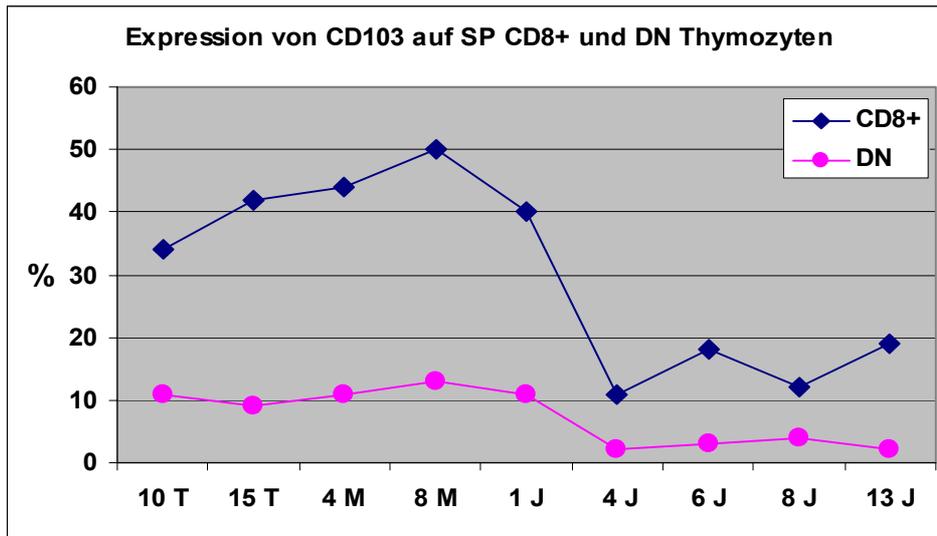


Abbildung 3-25: CD103-Expressionsanalyse auf DN und SP CD8⁺ Thymozyten. Frisch isolierte DN und SP CD8⁺ Thymozyten wurden in der Durchflußzytometrie auf CD103-Expression analysiert. Das Diagramm zeigt die CD103-Expression, die mit zunehmender Entwicklung im postnatalen Thymus herunterreguliert wird.

Legende : „T“ bezeichnet die Tage, „M“ die Monate, „J“ die Jahre.

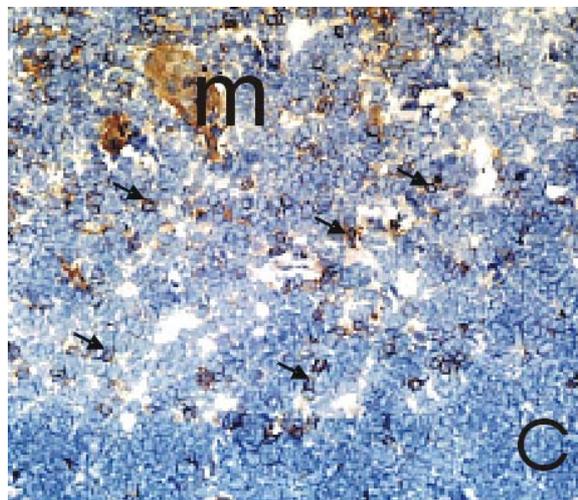


Abbildung 3-26: Analyse der CD103-Expression in einem 3 Tage alten Thymus mittels Peroxidase-DAB-Färbung. Der Aceton-fixierte Thymusschnitt wurde mit einem Antikörper gegen CD103 und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert und mit DAB entwickelt. Die braun gefärbte Zelloberfläche der medullären Zellen (mit den Pfeilen gezeigt) weist auf CD103⁺ positive Zellen hin. Vergrößerung x65

3.4.4 Funktionelle Untersuchungen zur Beteiligung von E-Cadherin und CD103

3.4.4.1 E-Cadherin-vermittelte Adhäsion reifender Thymozyten

Die vorausgegangenen Analyse hatten gezeigt, dass primäre Thymus-Epithelzellen auf der Zelloberfläche an Zell-Zell-Kontakten E-Cadherin exprimieren, während eine E-Cadherin-Expression auf Thymozyten nicht gefunden werden konnte. DN und SP CD8⁺ Thymozyten zeigten eine Expression von Integrin- α E (CD103), welches als Integrin-Rezeptor an E-Cadherin binden kann. Daraus wurde gefolgert, dass E-Cadherin eine heterophil-heterotypische Interaktion mit CD103-exprimierenden Thymozyten im humanen Thymus vermitteln könnte. Diese Arbeitshypothese wurde im Zellbindungstest mit E-Cadherin-positiven primären Thymus-Epithelzellen und isolierten einfach positiven CD8⁺ Thymozyten analysiert. Primäre Thymus-Epithelzellen wurden in 24-Well-Platten kultiviert. Zu den gebildeten Epithelzellschichten wurden SP CD8⁺ Thymozyten zugegeben. Die CD8⁺ Thymozyten wurden auch in Gegenwart von 50 μ g/ml anti-CD103-Antikörper inkubiert. Die Adhäsion der SP CD8⁺ Zellen wurde mikroskopisch nach Kristallviolett-Färbung ausgewertet (Abb. 3-27). Die adhärierenden Thymozyten sind als kleine, stark dunkel gefärbte Objekte vor einem wesentlichen helleren Hintergrund, den die Epithelzellen darstellen, zu erkennen. Während die Thymozyten ohne Antikörper-Zugabe stark an die Epithelzellen adhärieren, konnte eine Inkubation mit dem Antikörper gegen CD103 die Adhäsion von Thymozyten an kultivierte Thymus-Epithelzellen fast vollständig verhindern (Abb. 3-27B).

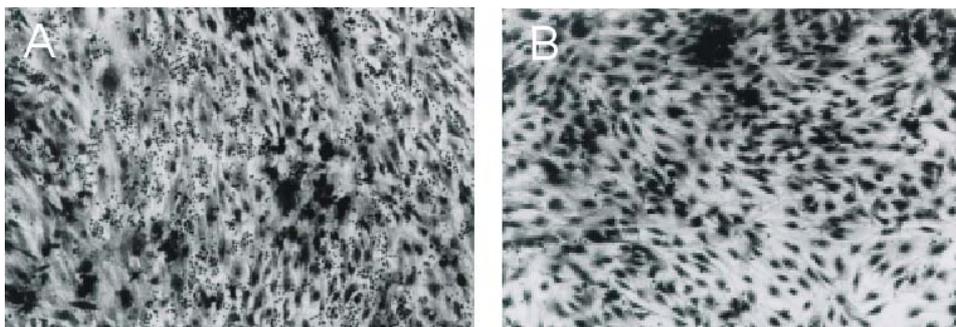


Abbildung 3-27: Zellbindungstest der SP CD8⁺ Thymozyten an E-Cadherin positive primären Thymus-Epithelzellen. Nach einstündiger Inkubation der SP CD8⁺ Thymozyten auf der konfluenten Epithelzellschicht wurden die nicht adhärierende Thymozyten gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit Kristallviolett gefärbt und unter einem Durchlichtmikroskop analysiert. Die an Epithelzellen gebundenen Thymozyten sind als kleine dunkel schwarze Objekte vor dem helleren Hintergrund der Epithelzellen zu erkennen (A). Die Inkubation mit dem Antikörper gegen CD103 konnte die Adhäsion der Thymozyten verhindern (B). Vergrößerung x100.

Dieser Bindungstest wurde durch Markierung von Thymozyten mit dem Fluorochrom BCECF-AM quantifiziert. Nach Zugabe von anti-CD103 Antikörper oder dem funktionsblockierenden Antikörper HECD-1 gegen E-Cadherin konnte die Bindung der einfach positiven $CD103^+/CD8^+$ Thymozyten um 70% reduziert werden (Abb. 3-28B). Die gemeinsame Zugabe beider Antikörper hatte keine additive Wirkung. Für die eingesetzten Antikörper wurde als Kontrolle der Antikörper W6/32.HL (50 $\mu\text{g/ml}$) des IgG2a Subtyps verwendet. Dieser Antikörper erkennt HLA-A, -B und -C Moleküle und bindet wie der Antikörper gegen CD103 auf der Zelloberfläche von Thymozyten. Die Zusatz von W6/32.HL inhibiert die Adhäsion die Thymozyten in keiner Weise (Abb. 3-28A). Etwa 45% aller eingesetzten $CD8^+$ Thymozyten adhärten an Thymus-Epithelzellen. Dieser Prozentsatz korreliert mit dem Zahl der $CD103$ -exprimierenden $CD8^+$ Thymozyten.

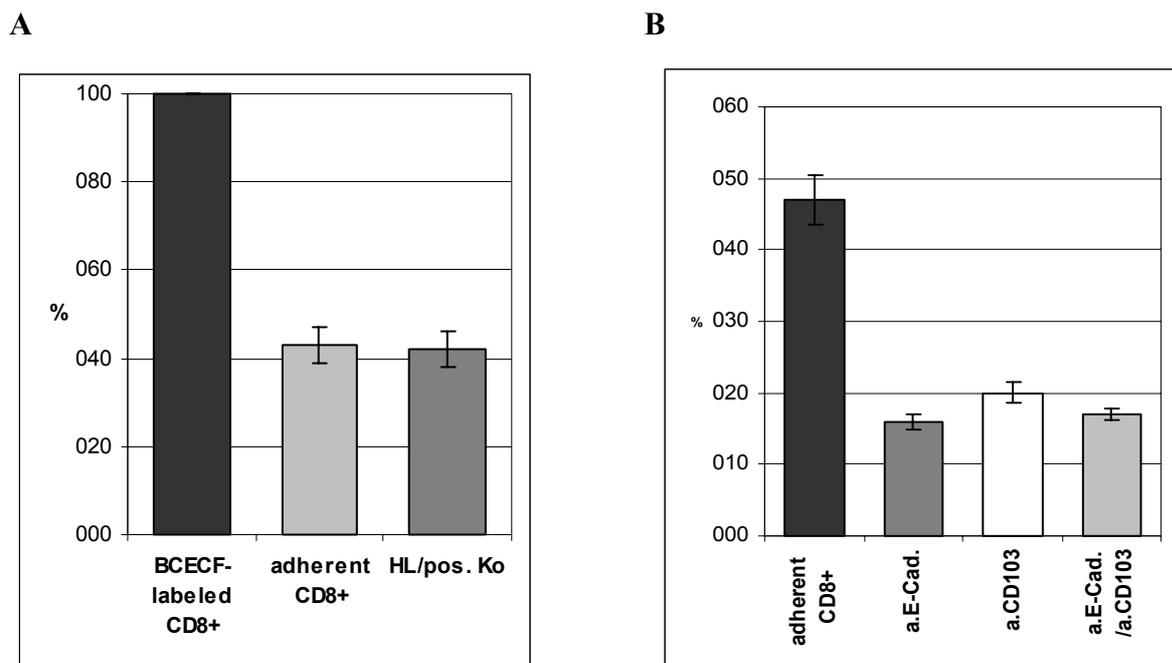
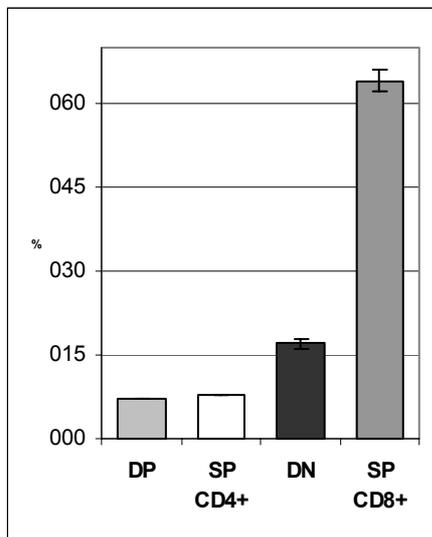


Abbildung 3-28: Quantifizierung des Zellbindungstests. Die SP $CD8^+$ Thymozyten wurden mit dem fluorochromen Farbstoff BCECF-AM, der in die Zellmembran integriert wird, markiert. Nach einer einstündigen Inkubation mit den kultivierten Epithelzellen wurde die Fluoreszenz der eingesetzten Zellen und der adhärierenden Thymozyten gemessen. Die Ergebnisse sind nach der in Kapitel 2.7.3 beschriebenen Formel berechnet und als Prozentsatz der adhärierenden Thymozyten angegeben, wobei die eingesetzten Thymozyten als 100% angegeben wurden. Die Inkubation mit dem Antikörper W6/32. zeigte keinen Effekt auf die Thymozytenadhäsion (A). Etwa 45% der eingesetzten SP $CD8^+$ Thymozyten adhärten an Thymusepithel. Die Antikörpern gegen $CD103$ (50 $\mu\text{g/ml}$) und gegen E-Cadherin (10 $\mu\text{g/ml}$) konnten die Thymozytenadhäsion um ca. 70% inhibieren (B). Der gemeinsame Zusatz beider Antikörper zeigte keinen additiven Effekt (B).

Ob E-Cadherin auf den primären Thymus-Epithelzellen für die Bindung der CD103⁺ Thymozyten verantwortlich war, wurde überprüft, indem die Thymus-Epithelzellen durch die E-Cadherin-positive Karzinom-Zelllinie A431 ersetzt wurden. Die verschiedenen Thymozytensubpopulationen (DN, DP, SP CD4⁺ und SP CD8⁺ Thymozyten) wurden mit einer konfluenten Zellschicht von A431-Zellen inkubiert und nach einer Stunde analysiert (Abb. 3-29A). Die Thymozytensubpopulationen DN und SP CD8⁺, die CD103 exprimieren, zeigten eine deutliche Adhäsion an die Zelllinie A431. Diese Adhäsion konnte mit den funktionsblockierenden Antikörpern gegen E-Cadherin (HECD-1) und CD103 um etwa 70% gehemmt werden (Abb. 3-29B).

A



B

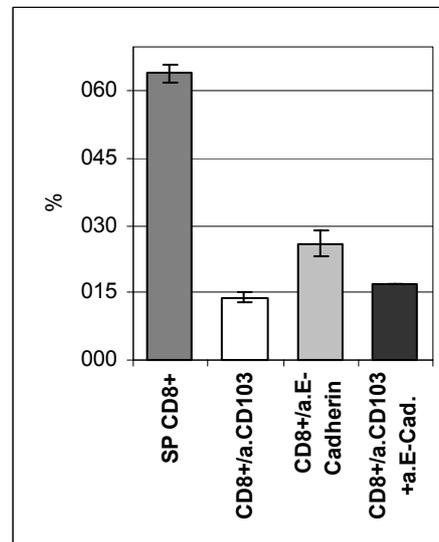


Abbildung 3-29: Zellbindungstest der reifenden Thymozytensubpopulationen an die E-Cadherin-positive Zelllinie A431. DN, DP, SP CD4⁺ und CD8⁺ Thymozyten wurden mit BCECF-AM markiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Fluoreszenz der eingesetzten und der gebundenen Thymozyten gemessen und der Prozentsatz % der adhärenierenden Thymozyten entsprechend der angegebenen Formel berechnet. DP und SP CD4⁺ zeigen keine nennenswerte Adhäsion an die E-Cadherin-positive Zelllinie A431, während DN und SP CD8⁺ Thymozyten eine Adhäsion zeigen. Der Prozentsatz der Adhäsion von DN (ca. 15-18 %) und SP CD8⁺ Thymozyten (ca. 45%) korreliert mit der Zahl der CD103-Expression (A). Die Adhäsion der SP CD8⁺ Thymozyten konnte mit den funktionsblockierenden Antikörpern gegen CD103 und E-Cadherin um ca. 70% inhibiert werden (B).

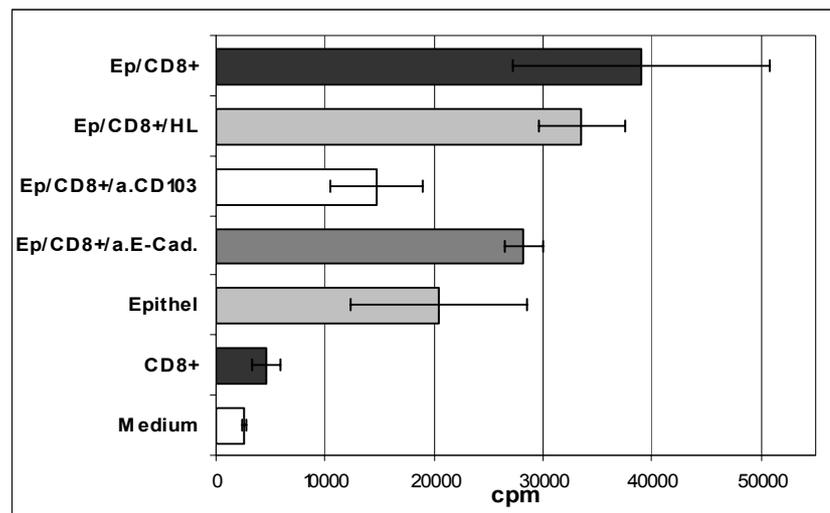
3.4.4.2 *CD103-vermittelte Zellproliferation*

Die Adhäsion der CD103⁺ Thymozyten an Thymus-Epithelzellen könnte eine Proliferation der adhärierenden Thymozyten auslösen. Um dies zu analysieren, wurden die SP CD8⁺ Thymozyten in MEM D-Valin Medium, das humanes AB Serum enthielt, mit einer einschichtigen Thymus-Epithelzellkultur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Proliferation der Ko-Kultur aus eingesetzten Thymozyten und Epithelzellen nach Thymidin-Einbau gemessen (Abb. 3-30A). Die Ko-Kultur aus SP CD8⁺ und primären Thymus-Epithelzellen induzierte eine deutliche Proliferation. Die Proliferation dieser Ko-Kulturen konnte in Gegenwart von anti-CD103-Antikörper (50µg/ml) und anti-E-Cadherin-Antikörper (10 µg/ml) signifikant inhibiert werden. Als Kontroll-Antikörper wurde auch für diesen Test der Antikörper W6/32.HL (50 µg/ml) verwendet. Aus SP CD8⁺ Thymozyten wurde eine CD103⁻/CD8⁺ Subpopulation mittels MACS-Methode isoliert und ebenso mit kultivierten Thymus-Epithelzellen inkubiert. Diese Ko-Kultur sollte einen Hinweis liefern, ob die beobachtete Proliferation der Ko-Kulturen mit SP CD8⁺ Thymozyten durch die Integrin- α E β 7-E-Cadherin-Interaktion vermittelt ist. Eine Proliferation der Ko-Kultur aus CD103⁻/CD8⁺ Thymozyten und primärer Thymus-Epithelzellen wurde nicht beobachtet (Abb. 3-30B). Eine direkte Analyse mit isolierten CD103⁺/CD8⁺ Thymozyten konnte nicht durchgeführt werden, da zur Isolierung dieser Zellpopulation bereits der anti-CD103-Antikörper verwendet werden musste und somit das Antigen bereits belegt war.

Durch Ko-Kulturen von kultivierten Thymus-Epithelzellen und CD103-exprimierenden SP CD8⁺ Thymozyten konnte eine Induktion der Zellproliferation nachgewiesen werden. Um nun zu untersuchen, ob die beobachtete Proliferation dieser Ko-Kultur nur durch die Integrin- α E β 7-E-Cadherin-Interaktion induziert wird oder ob diese Proliferation durch zusätzliche Signale auf den Thymus-Epithelzellen ausgelöst wird, wurden frisch isolierte SP CD8⁺ Thymozyten mit der Karzinom-Zelllinie A431 inkubiert. Diese Ko-Kulturen, bei denen die eingesetzten SP CD8⁺ Thymozyten an die E-Cadherin-positive A431 Zelllinie über Integrin- α E β 7-E-Cadherin-Interaktion adhärieren konnten, zeigten keine nennenswerte Steigerung der Proliferation (Abb. 3-31). Dieses Ergebnis belegt, dass die induzierte Proliferation der Ko-Kulturen aus Thymus-Epithelzellen und CD103-exprimierenden SP CD8⁺ Thymozyten nicht nur durch die Integrin- α E β 7-E-Cadherin-Interaktion vermittelt ist, sondern dass für die beobachtete Zellproliferation zusätzliche Signale der Thymus-Epithelzellen benötigt werden. Welcher Art diese Signale sind, die von primären Thymus-Epithelzellen für die Proliferation bereitgestellt werden, wurde innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht. Eine funktionelle

Analyse von Ko-Kulturen aus primären Thymus-Epithelzellen und DN Thymozyten, bei denen auch etwa 10% CD103 exprimieren, wurde wegen der geringen Zellzahl der isolierten DN Thymozyten bislang nicht untersucht.

A



B

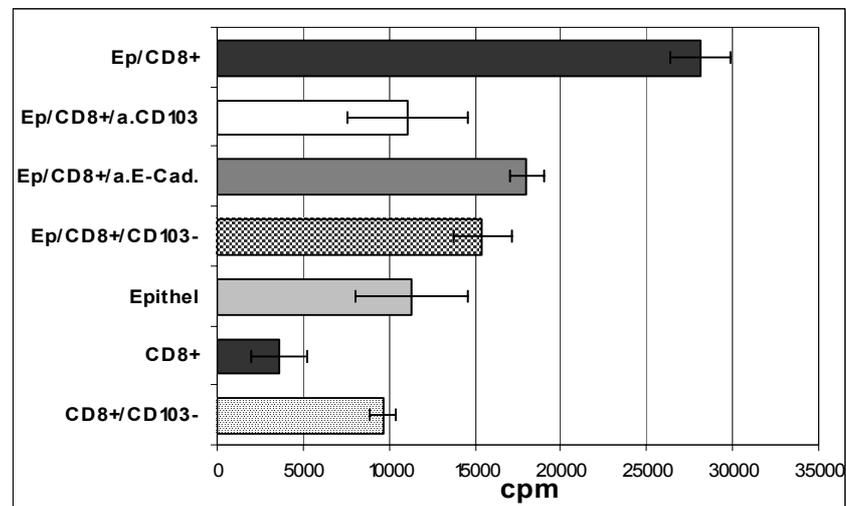


Abbildung 3-30: Proliferationstest der Ko-Kulturen aus Thymus-Epithelzellen mit SP CD8⁺ bzw. CD103⁻/CD8⁺ Thymozyten. Nach der zweitägigen Inkubation wurde der Thymidin-Einbau gemessen. Die Ko-Kultur der SP CD8⁺ Thymozyten mit den Epithelzellen konnte eine signifikante Proliferation induzieren (A), während eine Ko-Kultur der SP CD103⁻/CD8⁺ Thymozyten mit den Epithelzellen keine Steigerung der Proliferation zeigte (B). In Gegenwart von anti-CD103 und anti-E-Cadherin (HECD-1) Antikörpern wurde die Proliferation der Ko-Kulturen gehemmt (A, B). Die Inkubation mit dem Antikörper W6/32. zeigte keinen Effekt auf die Proliferation der Ko-Kulturen. Die Proliferation ist als cpm (counts per min) angegeben.

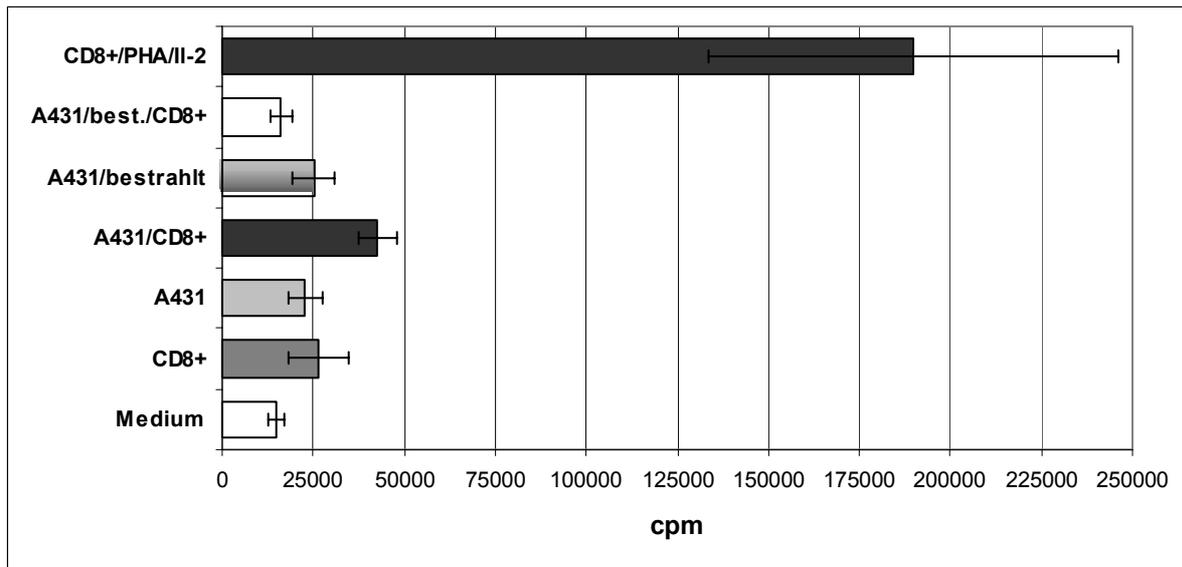


Abbildung 3-31: Proliferationstest von SP CD8⁺ Thymozyten und A431 Zellen. Frisch isolierte SP CD8⁺ Zellen wurden mit A431 Zellen, ebenso mit bestrahlten (30 Gy) A431 Zellen für zwei Tage inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Thymidin-Einbau gemessen. Als Positivkontrolle für die Proliferation der Zellen wurden die Thymozyten mit PHA (2%) und IL-2 (10 U/ml) stimuliert. Die Ko-Kultur aus SP CD8⁺ Thymozyten und nicht bestrahlten, aber auch der bestrahlten A431 Zellen zeigte keinerlei Proliferation. Die Proliferation ist als cpm (counts per min.) angegeben.

Die beobachtete Proliferation der Ko-Kulturen wurde ohne Zugabe von Zytokinen oder anderen Wachstumsfaktoren analysiert. CD103⁺ Zellen können bei Autoimmunerkrankungen apoptotisch wirken (Baumgart et al., 1996; Fujihara et al., 1999). Um eine apoptotische Wirkung der CD103⁺-exprimierenden SP CD8⁺ Thymozyten auszuschließen, wurde ein Apoptose-TUNEL-Assay unter gleichen Kulturbedingungen wie bei dem Proliferationstest durchgeführt (Abb. 3-32). Die in der Positivkontrolle durch eine DNase I Behandlung entstandene DNA-Bruchstücke konnten durch eine Reaktion mit biotinylierten Antikörpern und Avidin-FITC sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich eine Überlappung der visualisierten DNA-Bruchstücke (FITC) mit dem Zellkern, der mit DAPI gefärbt wurde (Abb. 3-32A). Nach zweitägiger Inkubation ist keine apoptotische Wirkung der CD103-exprimierenden SP CD8⁺ Thymozyten an kultivierten Thymus-Epithelzellen zu sehen (Abb. 3-32C).

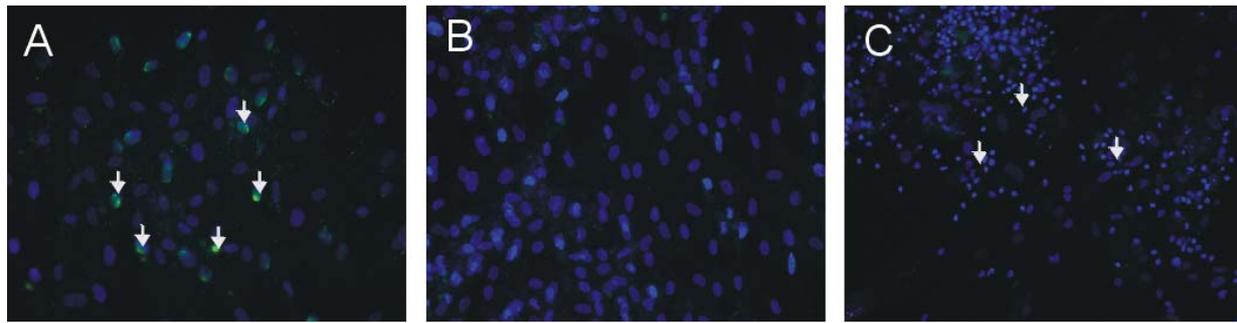


Abbildung 3-32: Apoptose-Test der $CD103^+$ -exprimierenden SP $CD8^+$ Thymozyten. Primäre Thymus-Epithelzellen wurden in „8-Well Chamber CulturSlides“ kultiviert, bis es sich ein konfluenter Epithelzellrasen gebildet hatte. Frisch isolierte SP $CD8^+$ wurden mit den kultivierten Epithelzellen für zwei Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden mit DNase I behandelte Epithelzellen verwendet (A). In den Zellkernen, welche mit DAPI gefärbt wurden, sind DNA-Bruchstücke durch FITC-Färbung zu sehen (A). Unbehandelte Epithelzellen wurden als Negativkontrolle verwendet (B). Eine Auslösung der Apoptose von $CD103$ -exprimierenden SP $CD8^+$ Thymozyten wurde nicht beobachtet (die Pfeile zeigen auf nicht apoptotische Thymozyten) (C). (Die adhärierenden Thymozyten sind als hellere Objekte vor einem dunkleren Hintergrund, welcher die Thymus-Epithelzellen repräsentiert, dargestellt.) Vergrößerung x55.

3.5 Analyse der Syndecan-1 (CD138)-Expression im humanen Thymus

Expression von Syndecan-1 ist für epitheliales Gewebe charakteristisch. In Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Expression von Syndecan-1 im Thymusgewebe und in primären Thymus-Epithelzellen untersucht (Abb. 3-33). Syndecan-1 zeigt in Thymusgefrierschnitten eine starke Expression in der kortiko-medullären Grenzschicht und im medullären Thymusbereich (Abb. 3-33A). Eine starke Expression von Syndecan-1 auf kultivierten Thymus-Epithelzellen, welche bevorzugt an Zell-Zell-Kontakten detektiert werden kann, zeigt, dass *in situ* die medullären Thymus-Epithelzellen die Syndecan-1-positive Zelltypen der Medulla darstellen (Abb. 3-33B). Mit dem Antikörper B-B4 gegen Syndecan-1 wurde in der Durchflußzytometrie die Expression dieses zellulären Heparansulfat-Proteoglykans auf Thymozyten nachgewiesen (Abb. 3-34). Um genauer diese Expression zu untersuchen, wurden die DN Thymozyten durch MACS-Sortierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ positiven Thymozyten getrennt und auf die Expression von Syndecan-1 analysiert. Expression von Syndecan-1 wurde ausschließlich auf 2-4% der DP Thymozyten gefunden, während eine Expression auf DN Thymozyten nicht gefunden werden konnte (Abb. 3-35A). Diese Anzahl der Syndecan-1-positiven Thymozyten zeigte keine Abhängigkeit vom Thymusalter (D).

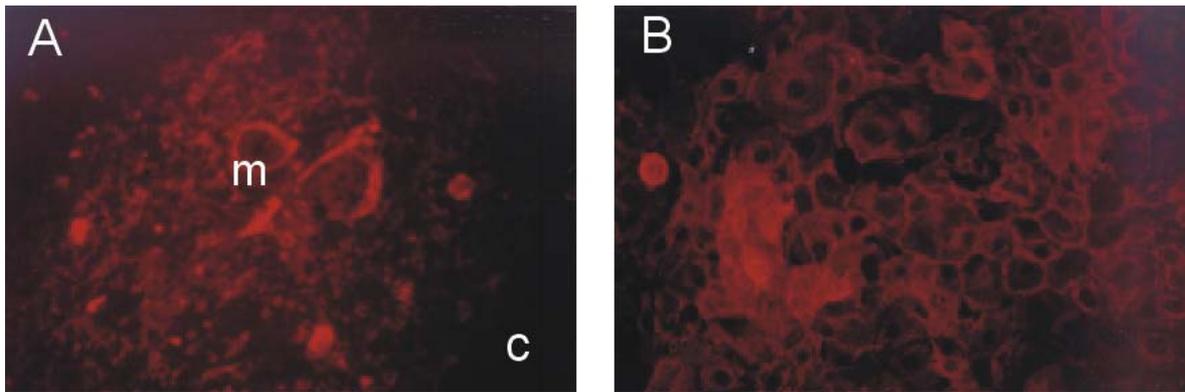
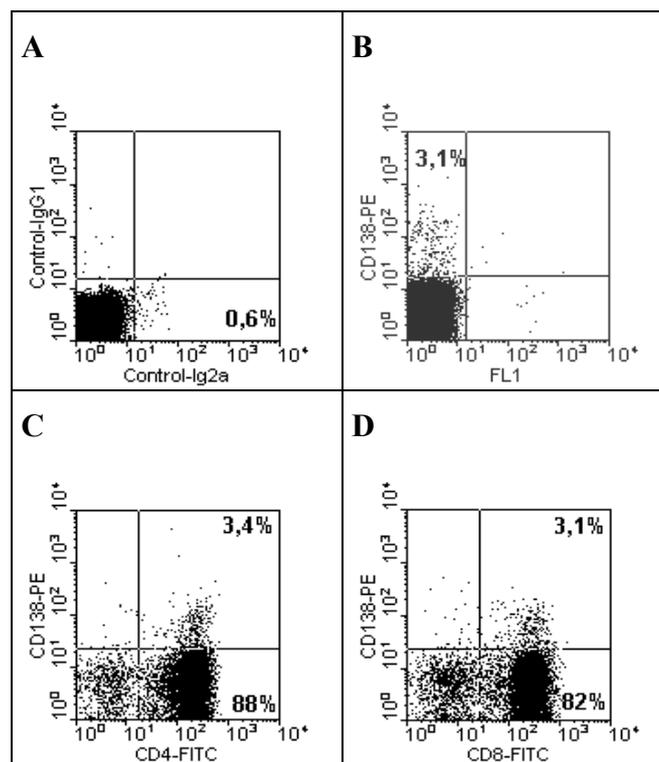


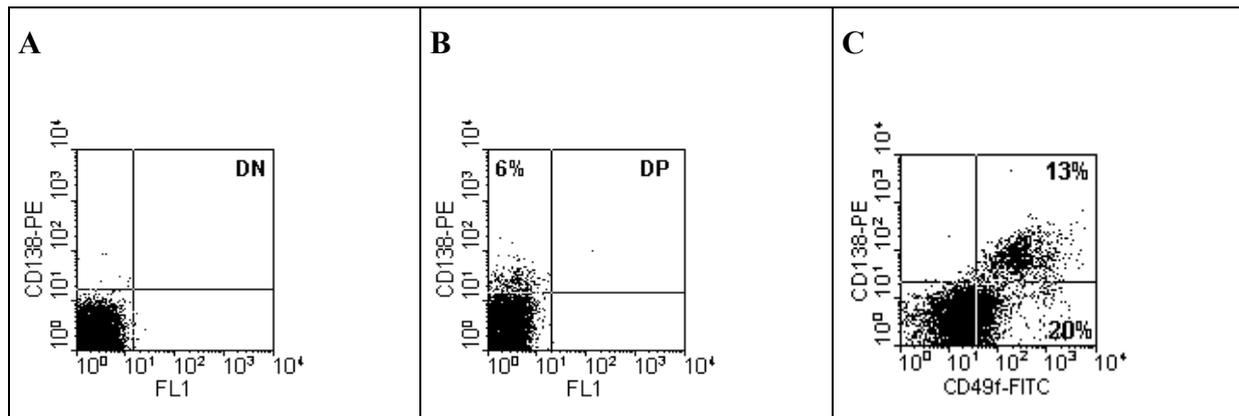
Abbildung 3-33: Immunfluoreszenzfärbungen von Syndecan-1 im humanen Thymus und auf primären Thymus-Epithelzellen. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde mit dem monoklonalen Antikörper B-B4 gegen Syndecan-1 (1:100) und einem Cy³-gekoppelten Zweitantikörper (1:500) durchgeführt. Man sieht eine deutliche Expression von Syndecan-1 im medullären Thymusbereich und eine schwächere Expression in der kortiko-medullären Grenzschicht (A). Eine starke Expression zeigen auch kultivierte Thymus-Epithelzellen an Zell-Zell-Kontakten (B). Vergrößerung x100.

Legende: mit „m“ ist der medulläre Thymusbereich bezeichnet und mit „c“ der kortikale Thymusbereich.



Durchflußzytometrische Analyse von Syndecan-1 (CD138) auf nicht separierten Thymozyten. Thymozyten wurden mit dem direkt PE-gekoppelten Antikörper B-B4 gegen Syndecan-1 inkubiert. Etwa 3% der Thymozyten exprimieren CD138 (B) und diese CD138-Expression ist auf DP Thymozyten (CD4⁺/CD8⁺) lokalisiert (C,D). Als Kontrolle wurde eine direkt PE/FITC-gekoppelte Isotypkontrolle verwendet (A).

Syndecan-1 definiert eine neue Subpopulation von DP Thymozyten, welche einer weiteren durchflußzytometrischen Analyse unterzogen wurde. Syndecane können als Ko-Rezeptoren von Integrinen Zell-Matrix-Interaktionen modulieren. Die vorausgegangenen Studien hatten gezeigt, dass die Integrin- $\alpha 6$ -Kette auf DP Thymozyten exprimiert wird. Die Doppelfärbungen zeigen nun, dass die Integrin- $\alpha 6$ -Kette-exprimierenden Thymozyten auch Syndecan-1 exprimieren können (Abb. 3-35C).



D

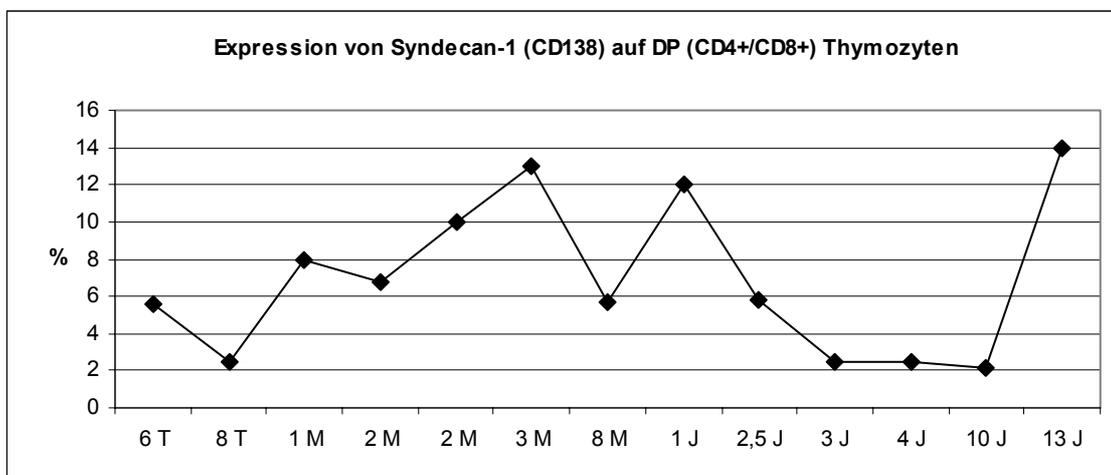


Abbildung 3-35: Durchflußzytometrische Analyse von Syndecan-1 auf DN und CD4⁺ und CD8⁺ DP Thymozyten. Durch MACS gewonnene DN Thymozyten zeigen keine Expression von CD138 (A), während die CD4⁺ und CD8⁺ DP Thymozyten auf ihre Oberfläche CD138 exprimieren (B). Eine Doppelfärbung ergab eine Ko-Expression aller Syndecan-1-positiven DP Thymozyten mit der Integrin- $\alpha 6$ -Kette (CD49f) (C). Abbildung D zeigt ein Diagramm der Syndecan-1-Expression auf MACS-isolierten DP Thymozyten unterschiedliches Alters. Die Anzahl der Syndecan-1 positiven Thymozyten variiert zwischen 2-14%.

Legende : „T“ bezeichnet die Tage, „M“ die Monate, „J“ die Jahre.

Durch MACS-Sortierung wurden Syndecan-1-positive Thymozyten isoliert und nach Giemsa-Färbung als kleinere Thymozyten mit größerem Kern und dunkelblau gefärbten Zytoplasma mikroskopisch detektiert (Abb. 3-36A). Abbildung 3-36B zeigt die Reinheit der gewonnenen CD138 positiven Thymozyten.

Eine funktionelle Analyse der Syndecan-1 positiven Thymozyten konnte bislang noch nicht durchgeführt werden, weil bei der Isolierung dieser Subpopulation Syndecan-1 mit dem monoklonalen Antikörper B-B4 belegt wurde. Damit können keine Matrixkomponenten, an welche diese Thymozyten eventuell über Syndecan-1 als Ko-Rezeptor binden könnten, bestimmt werden.

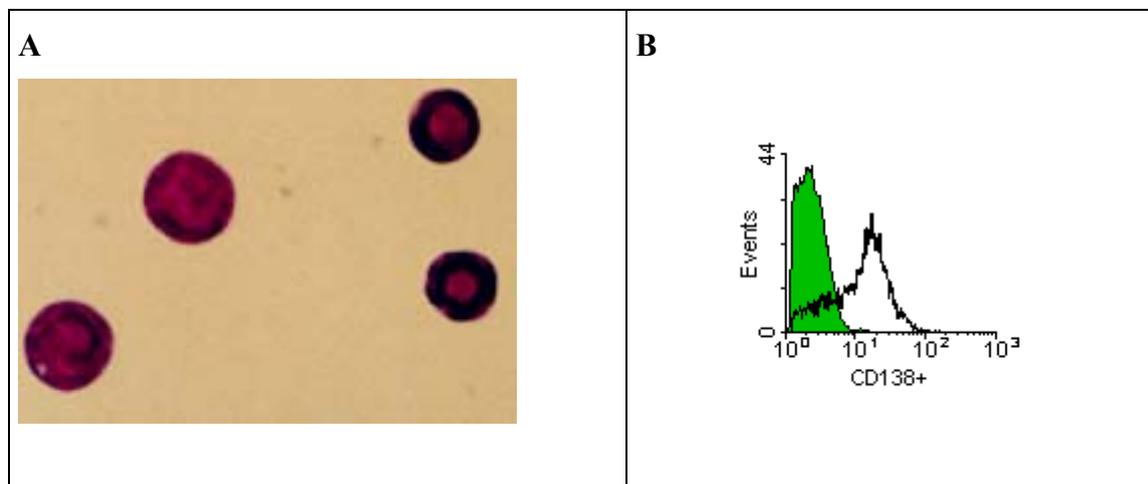


Abbildung 3-36: Giemsa-Färbung der MACS-isolierten Syndecan-1 positiven Thymozyten. Nach Giemsa-Färbung wurden Syndecan-1 positive Thymozyten als kleinere Zellen mit größerem Kern und dunkelblau gefärbten Zytoplasma detektiert (A). Ein Histogramm zeigt die Reinheit der MACS-isolierten Thymozytenpopulation (B). Vergrößerung x350.

Legende: Die gefüllte Fläche repräsentiert die CD138-negative Thymozyten, die weiße Fläche repräsentiert die CD138-positive Thymozyten.

4 Diskussion

Die Entwicklung der T-Zellen im humanen Thymus setzt streng kontrollierte Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsprozesse voraus, in denen adhäsive Interaktionen zur Freisetzung der reifen T-Zellen in die Peripherie führen können. Verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix wie die Laminin-Familie, aber auch Zelladhäsionsmoleküle der Integrin- und Cadherin-Familie sind an diesen Prozessen beteiligt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Mitglieder der Laminin-Familie die T-Zell-Entwicklung beeinflussen können. Es konnte gezeigt werden, dass Thymozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien entsprechend ihrer Lokalisation im humanen Thymus mit unterschiedlichen Laminin-Isoformen in Wechselwirkung treten. Funktionelle Untersuchungen des E-Cadherins zeigen eine direkte Beteiligung der klassischen Cadherine vom Typ I bei der Entwicklung der reifenden Thymozyten und weisen auf eine wichtige Rolle von E-Cadherin in der humanen T-Zell-Entwicklung hin.

Die Expression verschiedener Laminin-Ketten im humanen Thymus wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot- sowie RT-PCR-Analysen untersucht.

In der extrazellulären Matrix war Laminin nur mit einem polyklonalen Serum gegen EHS-Laminin untersucht worden (Lannes-Vieira et al., 1991). Deshalb war die Lokalisation der einzelnen Isoformen weitgehend unbekannt. Die Laminin- α 1-Kette wurde im humanen Thymus nachgewiesen (Virtanen et al., 1996), was 1999 angezweifelt wurde (Falk et al., 1999), da der verwendete Antikörper (Klon 4C7) nämlich nicht die humane α 1-Kette, sondern die α 5-Kette erkannte (Tiger et al., 1997). Dementsprechend konnte auch die α 1-Kette nicht nachgewiesen worden sein. Mit einem neuen, Laminin- α 1-Ketten-spezifischen Antikörper konnte in der vorliegenden Arbeit zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass die α 1-Kette im humanen Thymus nicht präsent ist. Auf Grund der jetzt vorgelegten Ergebnisse lässt sich aus der Ko-Lokalisation der einzelnen Ketten auf die Expression von Laminin-2/4 und Laminin-10/11 im subkapsulären Epithel schließen. Die Endothelzellen der Blutgefäße synthetisieren Laminin-2/4, Laminin-8/9 und Laminin-10/11. Kortikale Thymus-Epithelzellen scheinen keine Laminin-Isoformen zu synthetisieren, wohingegen die medulläre Thymus-Epithelzellen ausschließlich Laminin-5 zu exprimieren scheinen. Bezüglich der Lokalisation der Laminin- γ 2-Kette, welche für die Laminin-Isoform-5 spezifisch ist, wurde von Spezies-spezifischen Unterschieden berichtet. Im Thymus der Maus wurde eine Expression der γ 2-Kette in subkapsulären Epithelzellen nachgewiesen (Kim et al., 2000), wohingegen im humanen

Thymus neben der Lokalisation im subkapsulären Epithel eine starke Expression in der Medulla von Vivinus-Nebot et al. (1999) berichtet wurde. In unseren Untersuchungen konnte die Laminin- γ 2-Kette im humanen Thymus ausschließlich in der Medulla detektiert werden, was im Widerspruch zur Arbeit von Vivinus-Nebot et al. (1999) steht. Ansonsten stehen unsere Daten im Einklang mit früheren Berichten (Chang et al., 1993; 1995; Virtanen et al., 1996; Frieser et al., 1997; Tiger et al., 1997; Vivinus-Nebot et al., 1999; Iwao et al., 2000). Demnach stehen unterschiedlich gereiften Thymozytensubpopulationen mit ihren jeweiligen Integrin-Rezeptoren entsprechend ihrer Lokalisation im humanen Thymus unterschiedliche Laminin-Isoformen für Wechselwirkungen zur Verfügung. Abbildung 4-1 zeigt die in dieser Arbeit detektierten Laminin-Isoformen, bei welchen adhäsive Eigenschaften gegenüber Thymozyten nachgewiesen werden konnte, und deren Lokalisation im humanen Thymus, sowie die Expression der Integrin-Rezeptoren auf Thymozyten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

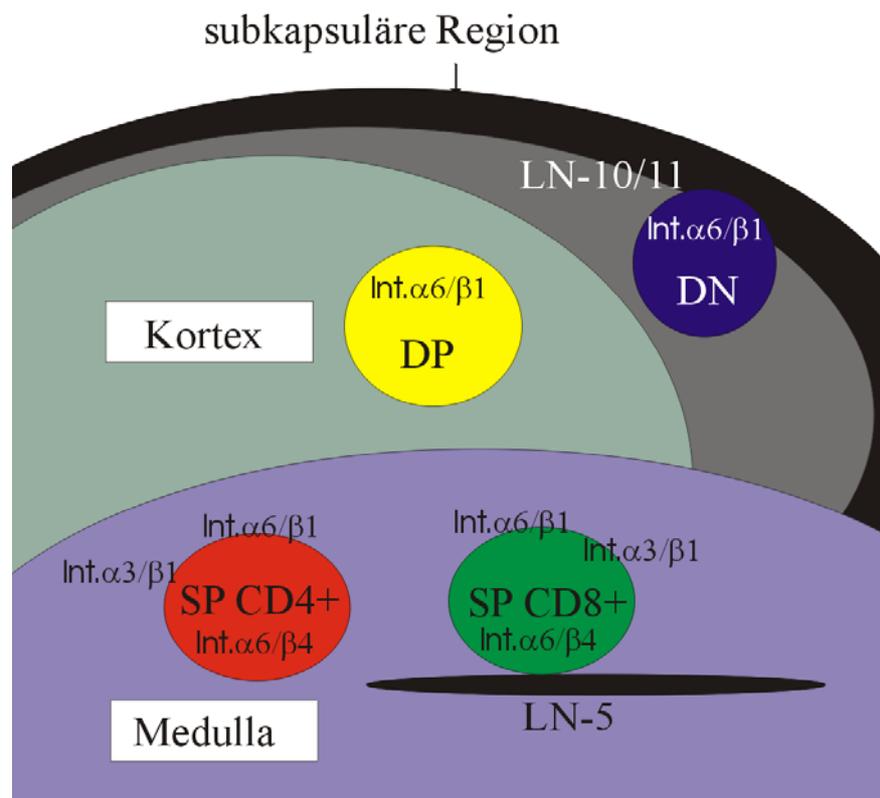


Abbildung 4-1: Ko-Lokalisation detektierter Laminin-Isoformen im Thymusläppchen und Expression der Integrin-Rezeptoren auf verschiedenen Thymozytensubpopulationen. DN Thymozyten, welche den Integrin-Rezeptor- α 6 β 1 exprimieren, ko-lokalisieren in der subkapsulären Region des Thymusläppchen mit dem detektierten LN10/11. Im Kortex sind die DP mit ihrem exprimierten Integrin-Rezeptor- α 6 β 1 lokalisiert. In der Medulla ko-lokalisieren SP CD4⁺ und SP CD8⁺ mit dem detektiertem LN-5. Die einfach positiven medullären CD4⁺ und CD8⁺ Thymozyten exprimieren die Integrin-Rezeptoren- α 3 β 1, - α 6 β 1 und - α 6 β 4.

Bei funktionellen Studien zeigte Laminin-1 keine adhäsive Wirkung auf reife Thymozytensubpopulationen. Dies war nicht verwunderlich, da die Expression von LN-1 im humanen Thymus nicht detektiert werden konnte.

Die Laminin-Isoform-2/4 konnte im subkapsulären Thymusbereich nachgewiesen werden, dennoch zeigte LN-2/4 keine adhäsive Wirkung auf Thymozyten. Die berichtete Wechselwirkung zwischen unfraktionierten Thymozyten und LN-2/4 (Chang et al., 1995) konnte hier nicht reproduziert werden. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die von Chang und Mitarbeitern benutzte Mn^{2+} -Konzentration von 500mM sein, bei der es zu unspezifischen Bindungen der Integrine- $\alpha3\beta1$ und $-\alpha6\beta1$ an LN-2/4 gekommen sein könnte. Eigentlich könnten nur DN Thymozyten in Wechselwirkung mit LN-2/4 getreten sein, weil seine Expression im subkapsulären Thymusbereich mit unreifen DN Thymozyten kolo-kalisiert. Bei einer Mn^{2+} -Konzentration von 50mM war eine Adhäsion der verschiedenen Thymozytensubpopulationen an LN-2/4 aber nicht nachweisbar, demgegenüber zeigte sich bei der zehnfachen Mn^{2+} -Konzentration eine starke, unspezifische Bindung an das Plastik der Petrischale, welche mit 5% BSA geblockt war. Im Thymus der Maus kann LN-2 die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen beeinflussen. Hierbei spielt LN-2 für die Entwicklung und das Überleben der unreifen DP Thymozyten eine wichtige Rolle. Ein Mangel an LN-2-Expression im Thymus der Maus spiegelt sich in einer Reduktion der DP Thymozyten wider (Iwao et al., 2000; Magner et al., 2000).

Laminin-5 wird hauptsächlich in der Haut exprimiert. Darüber hinaus findet man eine Laminin-5-Expression auch in der medullären Region des humanen Thymus (Vivinus-Nebot et al., 1999). Im Thymus der Maus ist LN-5 nur im subkapsulären Epithel beschrieben. Dort kann LN-5 mit DN Thymozyten in Wechselwirkung treten, wobei LN-5 die Apoptose der DN murinen Thymozyten verhindert und deren weitere Differenzierungsprozesse ermöglicht (Kim et al., 2000). Die Rezeptoren für LN-5 auf Thymozyten wurden nicht bestimmt, doch wurde 1992 eine starke Expression von Integrin- $\alpha6\beta4$ auf doppelt negativen Thymozyten der Maus beschrieben (Wadsworth et al., 1992). Im humanen Thymus wird die Expression des Laminin-5-Rezeptors Integrin- $\alpha6\beta4$ auf Thymozyten parallel zur Thymozytendifferenzierung hochreguliert (Vivinus-Nebot et al., 1999). Mit unfraktionierten Thymozyten konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung mit LN-5 die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation inhibiert. Die inhibitorische Wirkung des Laminin-5 beschränkte sich jedoch auf gelöstes LN-5; an Plastik immobilisiertes LN-5 zeigt keinerlei Effekt (Vivinus-Nebot et al., 1999). In der vorgelegten Arbeit konnte eine spezifische Adhäsion von einfach positiven medullären $CD8^+$

Thymozyten an LN-5 nachgewiesen werden. Durch Inhibitionsstudien mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen die Integrin- $\alpha 3$ -, $\alpha 6$ -, $\beta 1$ - und $\beta 4$ -Kette wurde der verantwortliche Integrin-Rezeptor- $\alpha 6\beta 4$ bestimmt, während die exprimierten Integrin-Rezeptoren- $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ die Adhäsion der SP $CD8^+$ Thymozyten an Laminin-5 nicht vermitteln konnten. Die medullären einfach positiven $CD4^+$ Thymozyten exprimieren Integrin-Rezeptoren $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$, trotzdem konnten sie nicht in Wechselwirkung mit LN-5 treten. Das weist auf einen inaktiven Zustand der Integrin-Rezeptoren bei dieser Thymozytensubpopulation hin. Ein ähnliches Phänomen wurde bei humanen Thymozyten von Salomon et al. (1994) berichtet, die zeigen konnten, dass der Fibronectin-Rezeptor Integrin- $\alpha 4\beta 1$ nur bei DP Thymozyten im aktiven Zustand vorhanden war, während er bei DN sowie bei SP $CD4^+$ und $CD8^+$ Thymozyten im inaktiven Zustand detektiert werden konnte. Damit spiegelt die Bindungsaktivität der Integrine deren Konformationszustand wider, aber nicht deren Expression (Shimizu et al., 1990). Ein möglicher Mechanismus ist die Modulation der Signaltransduktion der Integrine durch Eph-Kinasen, einer Familie von Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (Giancotti, 2000).

In vivo korreliert die Lokalisation der $\alpha 6\beta 4$ positiven medullären SP $CD8^+$ Thymozyten mit LN-5, welches durch medulläre Thymus-Epithelzellen sezerniert wird, mit der *in vitro* nachgewiesenen Adhäsion der SP $CD8^+$ Thymozyten an LN-5. Anhand eines Proliferationstests konnte gelöstes Laminin-5 aber keinen mitogenen Effekt auf isolierte SP $CD8^+$ Thymozyten ausüben. Hier wurde aber auch kein inhibitorischer Effekt von LN-5 auf die mit PHA/IL-2 induzierte Proliferation bemerkt. Dieses Ergebnis, das mit isolierten SP $CD8^+$ Thymozyten gewonnen wurde, steht im Widerspruch zu den Arbeiten von Vivinus-Nebot und Mitarbeitern (1999), die allerdings mit einer Gesamt-Population gearbeitet hatten. Ob die unterschiedlichen Zellpopulationen den Widerspruch erklären, bleibt zweifelhaft.

Laminin-8 ist im humanen Thymus nur an den Blutgefäßen exprimiert. Im peripheren Blut konnte LN-8 in Thrombozyten (Geberhiwot et al., 1999), in Monozyten (Pedraza et al., 2000) und in Lymphozyten (Geberhiwot et al., 2000) nachgewiesen werden. Pedraza et al. (2000) und Geberhiwot et al. (2000) zeigten einen Einfluss von Laminin-8 auf die Zellmigration im peripheren Blut. Diesen Berichten zufolge könnte man an eine funktionelle Beteiligung des Laminin-8 bei der Migration reifer T-Zellen aus dem Thymus durch Blutgefäße denken, wobei LN-8 durch die Förderung der erhöhten Migrationsrate eben diese Migration begünstigen könnte. Da Laminin-8 in gereinigte Form bislang noch nicht zur Verfügung stand, konnte dessen Wirkung auf humane Thymozyten noch nicht untersucht werden.

Laminin-10/11 wird im humanen Thymus von den Endothelzellen der Blutgefäße und den subkapsulären Epithelzellen synthetisiert. 1995 wurde eine Adhäsion unfraktionierter Thymozyten mit einer nicht näher charakterisierten „humanen Laminin-Fraktion“ berichtet, bei der es sich um Laminin-10/11 handeln könnte (Chang et al., 1995). In der jetzt vorgelegten Arbeit konnte eine Wechselwirkung von DN Thymozyten, die unterhalb des subkapsulären Epithels lokalisiert sind, mit LN-10/11 gezeigt werden, die durch Integrin- $\alpha 6\beta 1$ vermittelt ist. Die Spezifität der Adhäsion der DN Thymozyten konnte durch Inhibitionsversuche mit spezifischen Antikörpern gegen die Integrin- $\alpha 6$ -Kette und die Integrin- $\beta 1$ -Kette ebenso wie mit dem polyklonalen Antiserum gegen LN-10/11 belegt werden. Die DP, SP CD4⁺ sowie SP CD8⁺ Thymozyten, die das Integrin- $\alpha 6\beta 1$ exprimieren, zeigen aber keine Adhäsion an Laminin-10/11, wobei der inaktive Zustand des Integrin-Rezeptors wahrscheinlich wieder eine entscheidende Rolle in der nicht vermittelten Adhäsion der DP, SP CD4⁺ und CD8⁺ an LN-10/11 spielen könnte. Auch hier zeigt sich erneut die Korrelation einer *in vivo* Lokalisation der DN Thymozyten mit LN-10/11 im subkapsulären Bereich des humanen Thymus und einer *in vitro* nachgewiesenen Wechselwirkung der DN Thymozyten mit LN-10/11. Außer der adhäsiven Funktion konnte bei LN-10 kein weiterer Effekt auf DN Thymozyten festgestellt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hier zum ersten Mal eine funktionelle Beteiligung der Laminin-Isoform-10/11 an die T-Zell-Entwicklung im humanen Thymus beschrieben wurde. Neben dieser Wechselwirkung der unreifen DN Thymozyten mit LN-10/11 konnte aber auch eine adhäsive Interaktion der SP CD8⁺ Thymozyten mit LN-5 gezeigt werden.

Aus der Expression der Laminin- $\gamma 3$ -Kette, die mittels RT-PCR-Analysen ermittelt wurde, lässt sich schließen, dass auch andere Laminin-Isoformen (LN-12-LN-15), für welche die Laminin- $\gamma 3$ -Kette spezifisch ist, im humanen Thymus exprimiert werden können. Ob sie sich möglicherweise an der T-Zell-Entwicklung beteiligen, bleibt zu diesem Zeitpunkt offen.

Das primäre Ziel weiterführender Arbeiten wird es sein, den Einfluss der beschriebenen Wechselwirkung auf die Differenzierung der Thymozyten zu charakterisieren. Damit könnte diese Arbeit eine klinische Bedeutung haben, wobei sich hieraus *in vitro* Bedingungen für eine gezielte Expansion von T-Zellen ableiten lassen, die für eine adaptive Immuntherapie verwendet werden können.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnten verschiedene Laminin-Isoformen in Thymomschnitten vom medullären Typ A, vom kortikalen Typ B2/3 und vom gemischten

Typ AB mit und ohne Myasthenia Gravis detektiert werden. Außer den Untersuchungen von Ruco et al. (1993) über eine starke Laminin-Expression in Thymomen, die nicht zwischen einzelnen Isoformen unterschied, liegen bis heute keine Hinweise auf Expressionen von bestimmten Laminin-Isoformen vor. Die Laminin-2/4-Expression, welche in dieser Arbeit im subkapsulären Epithel und in den Endothelzellen der Blutgefäße des humanen Thymus detektiert werden konnte, wurde in den untersuchten Thymomen (Typ A ohne Myasthenia Gravis, Typ AB mit und ohne Myasthenia Gravis) nicht nachgewiesen. Im gemischten Typ AB (mit und ohne MG) konnte keine Expression von LN-5 nachgewiesen werden, während sich erstaunlicherweise nur eine sehr schwache Expression im medullären Thymom-Typ A (mit und ohne MG) zeigte. Eine sehr starke LN-5-Expression konnte im kortikalen Thymom-Typ B2/3 mit MG detektiert werden, während diese Expression im selben Typ ohne MG nicht nachgewiesen werden konnte. Welchen Einfluss in diesem Fall eine Assoziation mit der Autoimmunerkrankung Myasthenia Gravis auf die Expression von Laminin-5 ausüben könnte, ist völlig unklar. LN-10, welches ebenso wie LN-11 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$) im subkapsulären Thymusbereich detektiert wurde, zeigte eine sehr starke Expression in allen untersuchten Thymomen vom Typ A, B2/3 und AB, während sich die Expression von LN-11 auf eine sehr schwache Expression in allen untersuchten Thymomen Typen beschränkt, ausgenommen dem gemischten Typ AB mit MG, welcher keine Expression von LN-11 zeigte. Bei der berichteten starken Laminin-Expression in Thymomen von Ruco et al. (1993) könnte es sich nach diesen Ergebnissen höchstwahrscheinlich um die LN-10-Isoform handeln. Hier zeigte sich eine veränderte Laminin-Synthese in den Thymomen. Ob diese jedoch eine biologische Wirkung auf die T-Zell-Entwicklung ausüben kann und in welchem funktionellen Zusammenhang diese veränderte Laminin-Synthese mit Thymom-assoziierten Myasthenia Gravis steht, ist unbekannt und sollte weiter analysiert werden. Müller-Hermelink et al. (1997) berichteten, dass Thymome weiterhin ein Mikromilieu für die Reifung der Thymozyten mit beschränkten Funktionen bieten können. Dass Thymome mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziieren können, berichteten Vernino et al. (1999) und Vincent et al. (1999). Die Mechanismen dieser Assoziation wurden nicht beschrieben, nur dass die Assoziation individuell bei Patienten bemerkt wurde.

Die Bedeutung von E-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül wurde eingehend auf Epithelzellen analysiert. Darüber hinaus hat E-Cadherin als Tumorsuppressorgen eine Bedeutung erlangt (Takeichi, 1991, 1993). E-Cadherin spielt auch in der Hämatopoese eine Rolle, es wird in frühen Entwicklungsstadien der Erythropoese exprimiert und ist in der Entwicklung

bestimmter erythroider Vorläuferzellen involviert (Armeanu et al., 1995; Lammers et al., 2002). Die klassischen Cadherine vom Typ I wurden bislang hauptsächlich im Thymus der Maus untersucht. Lee et al. (1994) konnten mittels durchflußzytometrischer Analysen E-Cadherin auf pränatalen Thymozyten und eine geringe Expression von E-Cadherin auf postnatalen Thymozyten detektieren, während die Thymozyten eines adulten Thymus keine E-Cadherin-Expression zeigten. Eine Expression von E-Cadherin sowie die Expression von klassischen Typ II Cadherinen konnte mittels RT-PCR-Analysen auf adulten Thymozyten detektiert werden (Munro et al., 1996). Dieses Ergebnis konnte aber nicht mit anderen biochemischen oder immunologischen Methoden bestätigt werden. Auf pränatalen murinen Thymozyten konnten Müller et al. (1997) ebenfalls eine E-Cadherin-Expression detektieren. Dort vermittelt E-Cadherin homophile Interaktionen zwischen Thymozyten und Epithelzellen im Thymus. Die homophilen Interaktionen konnten mit funktionsblockierenden Antikörper gegen E-Cadherin inhibiert werden, und diese Inhibition hatte einen Einfluss auf die pränatale T-Zell-Entwicklung, während die Inhibition der heterophilen E-Cadherin-Integrin- $\alpha E\beta 7$ -Interaktionen keinen entscheidenden Einfluss auf die T-Zell-Entwicklung zeigte.

Cepek et al. (1994) und Higgins et al. (1998) berichteten über die heterophilen E-Cadherin-vermittelten Interaktionen zwischen E-Cadherin und Integrin- $\alpha E\beta 7$ und dass E-Cadherin der einzige bislang bekannte Ligand für Integrin- $\alpha E\beta 7$ ist. Andrew et al. (1996) berichteten über gleichmäßige Integrin- αE -Expression in der Maus auf SP CD4⁺ und SP CD8⁺ Thymozyten. Lefrancois et al. (1994) wiesen nach, dass die SP CD8⁺ Thymozyten die höchste Expression von CD103 zeigten. Dieses Ergebnis könnte mit den Ergebnissen der CD103-Expression im humanen Thymus korrelieren. Im humanen Thymus wurde die CD103-Expression auf SP CD8⁺ Thymozyten bei einem Median von 26% detektiert (McFarland et al., 2000). Die SP CD103⁺/CD8⁺ Thymozyten exprimieren meistens den TCR- α/β (McFarland et al., 2000). Die CD103-Expression wird in den reiferen Entwicklungsstufen der einfach positiven CD8⁺ Thymozyten hochreguliert; diese hochregulierte CD103-Expression könnte verschiedene Subpopulationen der naiven CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie definieren (McFarland et al., 2000). In der vorgelegten Arbeit konnten die Ergebnisse von McFarland et al. (2000), die an unfraktionierten Thymozyten gewonnen worden waren, bei isolierten SP CD8⁺ Thymozyten bestätigt werden. Die höchste CD103-Expression zeigte sich bei den SP CD8⁺ Thymozyten, die ebenfalls fast ausschließlich TCR- α/β positiv waren. Neu war, dass bei adulten Thymi die CD103-Expression herunterreguliert wird. Das Integrin- αE (CD103) wurde mittels durchflußzytometrischen Analysen auf DN, DP sowie einfach positiven CD4⁺ und CD8⁺ Thymozytensubpopulationen untersucht. Dabei war die Expression von CD103 in den jungen

Thymi (< 1 Jahr) mit 30-45% am höchsten. Eine kleine Population der DN Thymozyten (10-12%) exprimierte ebenfalls CD103. Dies zeigte eine entwicklungsabhängige Integrin- α E-Expression auf reifenden humanen T-Zellen. Zusätzliche durchflußzytometrische Analysen mit unfraktionierten Thymozyten zeigten keinerlei Expression von E- und P-Cadherin. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen konnte aber im humanen Thymus eine E-Cadherin-Expression in Kortex und Medulla nachgewiesen werden, die auf Thymus-Epithelzellen beschränkt blieb. Hierbei exprimieren vorwiegend die medullären Epithelzellen E-Cadherin. Isolierte Thymus-Epithelzellen zeigten in Immunfluoreszenzfärbungen eine Expression von E-Cadherin an Zell-Zell-Kontakten. Die Cadherine benötigen eine Assoziation mit den zytoplasmatischen Cateninen ($-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$), um adhäsive Funktionen auszuüben (Kemler, 1993). Ebenfalls mit Immunfluoreszenzfärbungen konnte α -Catenin im humanen Thymus im kortikalen und medullären Bereich detektiert werden ebenso wie β -Catenin, während die γ -Catenin-Expression hauptsächlich auf medullären Epithelzellen nachgewiesen werden konnte. Die isolierten Thymus-Epithelzellen exprimieren ebenfalls α -, β -, und γ -Catenin an Zell-Zell-Kontakten. Diese Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen von E-Cadherin und α -, β - und γ -Catenin konnten auch in Western Blot-Analysen mit Thymusextrakt ebenso wie mit Lysaten der primären Thymus-Epithelzellen bestätigt werden. Eine direkte Assoziation von E-Cadherin mit α -, β - und γ -Catenin konnte im Thymusgewebe durch Ko-Immunpräzipitationen nachgewiesen werden. Die Kopräzipitation belegt, dass intakte funktionelle Cadherin-Catenin-Komplexe im Thymus existieren können.

Durch ein *in vitro* System war es möglich, Zell-Zell-Interaktionen zwischen Thymozyten und E-Cadherin positiven Epithelzellen zu untersuchen. Durch MACS-Sortierung isolierte einfach positive CD8⁺ Thymozyten zeigten im Zellbindungstest eine Adhäsion an E-Cadherin-positive primäre Thymus-Epithelzellen. Inhibitionsstudien mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen E-Cadherin und CD103 belegen, dass die Adhäsion der SP CD8⁺ an Thymus-Epithelzellen durch eine E-Cadherin-Integrin- α E β 7-Interaktion vermittelt ist. Eine Quantifizierung des Zellbindungstests zeigte, dass die funktionsblockierenden Antikörpern gegen E-Cadherin und CD103 die Adhäsion der SP CD8⁺ Thymozyten an isolierte E-Cadherin-positive Thymus-Epithelzellen um ca. 70% hemmen konnte. Eine vollständige Blockade wurde nie erreicht, was auf zusätzliche Adhäsionsmechanismen schließen lässt. Die DN Thymozyten, welche auch CD103 exprimieren, zeigten ebenfalls eine Adhäsion an E-Cadherin-positive Epithelzellen. Der Prozentsatz der adhärierenden SP CD8⁺ und DN Thymozyten korrelierte jeweils mit der Zahl der CD103-exprimierenden Zellen. In einem Bindungstest, in dem die isolierten Thymus-Epithelzellen durch die E-Cadherin-positive

Karzinomzelllinie A431 ersetzt wurden, konnte belegt werden, dass die Adhäsion der SP CD8⁺ über die E-Cadherin-Integrin- α E β 7-Interaktionen erfolgt. Die Adhäsion an E-Cadherin-positive A431 Zellen zeigten nämlich nur SP CD8⁺ und DN Thymozyten, welche CD103 exprimierten, dagegen zeigten die DP und SP CD4⁺ Thymozyten keinerlei Adhäsion an A431 Zellen. Zusätzlich war die Adhäsion der SP CD8⁺ an E-Cadherin-positive A431 Zellen auch mit den funktionsblockierenden Antikörpern gegen E-Cadherin und gegen CD103 blockierbar. Dies zeigt, dass E-Cadherin heterophile-heterotypische Interaktionen zwischen Epithelzellen und CD103-exprimierenden Thymozyten vermitteln kann.

Die funktionelle Bedeutung der E-Cadherin-Integrin- α E β 7-Interaktionen für Thymozyten wurde mit Hilfe eines Proliferationstests analysiert. Nach Messung des Thymidin-Einbaus konnte eine deutliche Proliferation der Ko-Kulturen aus E-Cadherin-positiven Thymus-Epithelzellen und SP CD8⁺ Thymozyten gezeigt werden. Die Proliferation dieser Ko-Kulturen konnte in Gegenwart von funktionsblockierenden Antikörpern gegen E-Cadherin und CD103 signifikant inhibiert werden. In Ko-Kulturen von isolierten SP CD103-negativen CD8-positiven Thymozyten und E-Cadherin-positiven Thymus-Epithelzellen konnte keine Proliferation induziert werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen sind E-Cadherin-Integrin- α E β 7-Interaktionen an der Induktion der Zellproliferation in den Ko-Kulturen aus Thymus-Epithelzellen und der SP CD8⁺ Thymozyten beteiligt. Es konnte durch einen Apoptosetest nachgewiesen werden, dass in diesen Ko-Kulturen unter gleichen Kulturbedingungen keine Apoptose induziert wird. Allerdings genügen für die beobachtete Proliferation der Ko-Kulturen die E-Cadherin-Integrin- α E β 7-Interaktionen nicht. Diese Hypothese belegen die Ergebnisse des Proliferationstests, in denen die E-Cadherin-positiven Thymus-Epithelzellen durch A431 Zellen ersetzt wurden. Diese Ko-Kulturen konnten keinerlei Zellproliferation induzieren. Offensichtlich sind bei der Proliferation der Ko-Kulturen der SP CD8⁺ und der E-Cadherin-positiven Thymus-Epithelzellen zusätzliche Signale von Thymus-Epithelzellen involviert. Welcher Art diese zusätzlichen Signale sind, die für die Proliferation der Ko-Kulturen benötigt werden, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Diese Ergebnisse zeigen eine funktionelle Beteiligung von E-Cadherin-vermittelten heterophilen Interaktionen sowohl bei der Zelladhäsion als auch bei der Zellproliferation humaner Thymozyten und deuten auf eine wichtige Rolle von E-Cadherin in der humanen Thymopoese. E-Cadherin-vermittelte heterotypische-homophile Interaktionen können im postnatalen humanen Thymus ausgeschlossen werden, weil keinerlei E-Cadherin-Expression auf postnatalen Thymozyten gefunden wurde. Ob pränatale humane Thymozyten E-Cadherin

exprimieren können, wie dies im Thymus der Maus beobachtet wurde, bleibt vorerst eine offene Frage.

N-Cadherin gehört zu den klassischen Typ I Cadherinen und spielt eine bedeutende Rolle in der Morphogenese und Embryonalentwicklung. Die Expression von N-Cadherin wurde ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbungen im humanen Thymus untersucht und konnte nur in späteren Entwicklungsstadien des Thymus (> 1 Jahr) beobachtet werden. Hierbei zeigte sich eine N-Cadherin-Expression überwiegend im kortikalen Thymusbereich, während eine schwächere Expression in der Medulla detektiert wurde. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen von N- und E-Cadherin in den Thymusgefrierschnitten unterschiedlicher Thymusalter konnte beobachtet werden, dass im Laufe der Entwicklung des humanen Thymus E-Cadherin herunterreguliert werden kann, während das N-Cadherin hochreguliert werden kann. Ob mit diesem entwicklungsabhängigen Austausch der klassischen Cadherine auch funktionelle Änderungen einhergehen, ist bislang noch ungeklärt. N-Cadherin-Expression konnte auch auf den primären Thymus-Epithelzellen detektiert werden. Interessanterweise ist die Expression von N-Cadherin auf diesen Zellen von der Art der Etablierung und Kultivierung der primären Thymus-Epithelzellen abhängig. Durch definierte Kulturbedingungen war es möglich, die N-Cadherin-Expression in kultivierten Epithelzellen hochzuregulieren. Die kultivierten Thymus-Epithelzellen exprimierten entweder E-Cadherin oder N-Cadherin, eine gleichzeitige Expressionen wurde nie beobachtet. Da eine Expression von E- oder N-Cadherin durch vorgegebene Matrixkomponenten und definierte Medien bestimmt werden konnte, legt dies den Schluss nahe, dass das Expressionsmuster der Cadherine auf humanen Thymus-Epithelzellen durch das extrazelluläre Microenvironment reguliert werden kann. Im Gegensatz dazu berichteten Salomon et al. (1997), dass eine N-Cadherin-Expression im Thymus vom Zelltyp abhängt, nämlich dass N-Cadherin nur auf kortikalen isolierten Thymus-Epithelzellen exprimiert wird. Eine altersabhängige Untersuchung wurde von Salomon et al. nicht durchgeführt. Die funktionelle Rolle von N-Cadherin im humanen Thymus wurde bislang nicht analysiert. Über eine Beteiligung von N-Cadherin an der Organisation des Epithels in späteren Entwicklungsstadien des humanen Thymus lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt deshalb nur spekulieren.

P-Cadherin gehört ebenfalls zu den klassischen Typ I Cadherinen, und seine Expression begleitet oft die Expression von E-Cadherin (Shimoyama et al., 1989). In der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Expression von P-Cadherin ausschließlich im kortikalen

Thymusbereich gefunden. Auf primären Thymus-Epithelzellen konnte P-Cadherin an Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden. Die P-Cadherin-Expression konnte auch in Western Blot-Analysen im Thymusextrakt ebenso wie in Lysaten der kultivierten Thymus-Epithelzellen detektiert werden. Hierbei ließ sich die begleitende P-Cadherin-Expression von E-Cadherin bestätigen. Die funktionelle Beteiligung P-Cadherins wurde noch nicht untersucht. Bislang liegen keine Kenntnisse über die Rolle P-Cadherins in der Thymopoese vor. Welche biologischen Funktionen die P-Cadherin-Expression im humanen Thymus ausüben könnte, ist unbekannt und Gegenstand weiterer Analysen

Die Syndecan-1-Expression ist für epitheliale Gewebe charakteristisch (Couchman & Woods, 1996; Woods, 2001). Syndecan-1 (Synonym: CD138) wurde aber auch im hämatopoetischen System auf unreifen B-Lymphozyten und Plasmazellen gefunden (Woods, 2001). Seine Expression wird während der Reifungsstadien der B-Zellen herunterreguliert, die reifen zirkulierenden B-Zellen exprimieren kein Syndecan-1 mehr (Woods, 2001). Ebenso wurde eine Syndecan-1-Expression auf malignen Myelomazellen detektiert. (Seidel et al., 2000). Die Syndecan-1-Expression wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen im humanen Thymus sowie in primären Thymus-Epithelzellen untersucht. Die medullären Epithelzellen exprimieren Syndecan-1 sehr stark, während eine schwächere Expression auf der kortikomedullären Grenzschicht bemerkt wurde. Hierbei ist nicht klar, ob Syndecan-1 ausschließlich von Epithelzellen in der Medulla stark exprimiert wurde. Durch die Expression von Syndecan-1 an Zell-Zell-Kontakten von kultivierten Thymus-Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass es sich um eine Expression von Epithelzellen im medullären Thymusbereich handeln kann. Die Syndecan-1-Expression auf Thymozyten wurde in der Durchflußzytometrie analysiert. Dabei wurde Syndecan-1 auch auf einer Subpopulation der DP Thymozyten detektiert, welche normalerweise im Kortex lokalisiert sind. Diese Syndecan-1-positiven DP Thymozyten exprimieren den Integrin-Rezeptor- $\alpha 6\beta 1$. Hierbei definiert Syndecan-1 eine neue Subpopulation der DP Thymozyten, welche an der kortikomedullären Grenzschicht lokalisiert ist. Ob Syndecan-1 als Ko-Rezeptor von Integrin- $\alpha 6\beta 1$ an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sein könnte, ist bislang ungeklärt. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine neue Subpopulation von DP Thymozyten identifiziert werden, die durch eine Syndecan-1-Expression charakterisiert ist. Welche Zell-Matrix-Interaktionen durch Syndecan-1 moduliert werden, muss in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, um die Rolle von Syndecan-1 bei der Differenzierung der DP Thymozyten zu klären.

5 Zusammenfassung

T-Zellen entwickeln sich im Thymus. Die reifenden T-Lymphozyten lassen sich anhand der akzessorischen Moleküle CD4 und CD8 in die frühen DN, die intermediären DP und die in der Entwicklung am weitesten fortgeschrittenen SP Thymozyten unterteilen. Für die Reifung der T-Lymphozyten bietet der Thymus ein spezialisiertes Microenvironment, das aus zellulären und extrazellulären Komponenten besteht. Laminine sind extrazelluläre Matrixmoleküle, die funktionell an Zelladhäsionsmechanismen, Zellproliferation und –migration beteiligt sein können. Im humanen Thymus konnten unterschiedliche Laminin-Isoformen in definierten Regionen detektiert werden. Im subkapsulären Epithel der Thymusläppchen werden die Isoformen Laminin-2/4 und Laminin-10/11 exprimiert, während Laminin-5 ausschließlich im medullären Thymusbereich nachgewiesen wurde. Funktionell konnte nur Laminin-10/11, nicht aber Laminin-2/4, mit den im subkapsulären Epithel lokalisierten DN Thymozyten in Wechselwirkung treten. Im medullären Thymusbereich adhärten SP CD8⁺ Thymozyten an Laminin-5. Die Bindung der Thymozyten an die verschiedenen Laminin-Isoformen erfolgte über die Integrin-Rezeptoren $\alpha\beta1$ bzw. $\alpha\beta4$. Bei SP CD4⁺ Thymozyten konnte keinerlei adhäsive Interaktion mit Laminin-5 festgestellt werden, obwohl diese Thymozyten ebenfalls Laminin-5-Rezeptoren exprimieren. Trotz ihrer adhäsiven Funktion zeigten Laminin-Isoformen keinerlei mitogenen Effekt auf Thymozyten. Ob sie an der Regulation der Zellwanderung oder bei der Apoptose beteiligt sind, ist bislang ungeklärt. Neben der extrazellulären Matrix sind Thymus-Epithelzellen ein wichtiger Bestandteil des Microenvironment des Thymus. Auf Epithelzellen im medullären Thymusbereich wurde E-Cadherin, ein Mitglied der Cadherin-Familie, detektiert. Cadherine sind Calcium-abhängige Adhäsionsmoleküle, die in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen. Auf humanen Thymozyten wird E-Cadherin nicht exprimiert, diese Zellen exprimieren aber CD103, das heterophile Interaktionen mit E-Cadherin vermitteln kann. SP CD8⁺ Thymozyten weisen die höchste CD103 Expression auf. *In vitro* konnten heterotypische adhäsive Interaktionen zwischen CD103⁺ Thymozyten und Thymus-Epithelzellen durch Antikörper gegen E-Cadherin bzw. CD103 gehemmt werden. Ko-Kulturen aus primären Thymus-Epithelzellen und SP CD8⁺ Thymozyten zeigten eine signifikant verstärkte Proliferation. Für die beobachtete Proliferation war die CD103/E-Cadherin Interaktion notwendig, aber nicht ausreichend, denn nur E-Cadherin⁺ Thymus-Epithelzellen, nicht aber E-Cadherin⁺ Karzinomzellen waren in der Lage, eine erhöhte Proliferation auszulösen.

6 Literaturverzeichnis

Agace WW, Higgins JM, Sadasivan B, Brenner MB, Parker CM. (2000): T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol.*12: 563-568.

Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. (1996): Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol.* 14:73-99.

Anderson G, Anderson KL, Tchilian EZ, Owen JJ, Jenkinson EJ. (1997): Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25+CD44+ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. *Eur J Immunol.* 27: 1200-1206.

Anderson G, Jenkinson EJ. (2000): Thymus organ cultures and T-cell receptor repertoire development. *Immunology.* 100: 405-410.

Anderson G, Jenkinson EJ. (2001): Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev Immunol.* 1: 31-40.

Andrew DP, Rott LS, Kilshaw PJ, Butcher EC. (1996): Distribution of alpha 4 beta 7 and alpha E beta 7 integrins on thymocytes, intestinal epithelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. *Eur J Immunol.* 26: 897-905.

Armeanu S, Bühring HJ, Reuss-Borst M, Müller CA, Klein G. (1995): E-cadherin is functionally involved in the maturation of the erythroid lineage. *J Cell Biol.* 131: 243-249.

Aumailley M, Smyth N. (1998): The role of laminins in basement membrane function. *J Anat.* 193 : 1-21.

Baumgart M, Witt C, Hüge W, Müller B. (1996): Increase in the expression of alpha E beta 7, characteristic of intestinal intraepithelial lymphocytes, on T cells in the lung epithelium of patients with interstitial lung diseases and in synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Immunobiology.* 196: 415-424.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. (1992): Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* 8: 365-393.

Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. (1999): Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 68: 729-777.

Berrih S, Savino W, Cohen S. (1985): Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 33: 655-664.

Ceppek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. (1994): Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature.* 1994. 372: 190-193.

Chang AC, Wadsworth S, Coligan JE. (1993): Expression of merosin in the thymus and its interaction with thymocytes. *J Immunol.* 151: 1789-1801.

Chang AC, Salomon DR, Wadsworth S, Hong MJ, Mojcik CF, Otto S, Shevach EM, Coligan JE. (1995): Alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 1 integrins mediate laminin/merosin binding and function as costimulatory molecules for human thymocyte proliferation. *J Immunol.* 154: 500-510.

Chiquet-Ehrismann R. (1995): Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia.* 51: 853-862.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.

Colognato H, Winkelmann DA, Yurchenco PD. (1999): Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol.* 145: 619-631.

Colognato H, Yurchenco PD. (2000): Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 218: 213-234.

Colombatti A, Poletti A, Carbone A, Volpin D, Bressan GM. (1989): Extracellular matrix of lymphoid tissues in the chick. *J Histochem Cytochem.* 37: 757-763.

Couchman JR, Woods A. (1996): Syndecans, signaling, and cell adhesion. *J Cell Biochem.* 61: 578-584.

Dalmau S, Freitas CS, Savino W. (1999): Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of the thymocytes of the thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *blood.* 93: 974-990.

Engvall E, Wewer UM. (1996): Domains of laminin. *J Cell Biochem.* 61: 493-501.

Falk M, Ferletta M, Forsberg E, Ekblom P. (1999): Restricted distribution of laminin alpha1 chain in normal adult mouse tissues. *Matrix Biol.* 18: 557-568.

Fischer E, Mougenot B, Callard P, Ronco P, Rossert J. (2000): Abnormal expression of glomerular basement membrane laminins in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 15: 1956-1964.

Freitas CS, Lyra JS, Dalmau SR, Savino W. (1995): In vivo and in vitro expression of tenascin by human thymic microenvironmental cells. *Dev Immunol.* 4: 139-147.

Frieser M, Nockel H, Pausch F, Roder C, Hahn A, Deutzmann R, Sorokin LM. (1997): Cloning of the mouse laminin alpha 4 cDNA. Expression in a subset of endothelium. *Eur J Biochem.* 246: 727-735.

Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, Saito K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. (1999): Preferential localization of CD8+ alpha E beta 7+ T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol.* 163: 2226-2235.

Geberhiwot T, Ingerpuu S, Pedraza C, Neira M, Lehto U, Virtanen I, Korttesmaa J, Tryggvason K, Engvall E, Patarroyo M (1999): Blood platelets contain and secrete laminin-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) and adhere to laminin-8 via $\alpha 6\beta 1$ integrin. *Exp Cell Res.* 253: 723-732.

Geberhiwot T, Assefa D, Korttesmaa J, Ingerpuu S, Pedraza C, Wondimu Z, Charo J, Kiessling R, Virtanen I, Tryggvason K. Patarroyo M. (2000): Laminin-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) is synthesized by lymphoid cells, promotes lymphocyte migration and costimulates T cell proliferation. *J Cell Sci.* 114: 423-433.

Geiger B, Ayalon O. (1992): Cadherins. *Annu Rev Cell Biol.* 8: 307-32.

Giancotti F. (1996): Signal transduction by the $\alpha 6\beta 4$ integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J Cell Sci.* 109: 1165-1172.

Giancotti FG. (2000): Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol.* 2: E13-4.

Giltay R, Timpl R, Kostka G. (1999): Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biol.* 18: 469-480.

Guan JL, Hynes RO. (1990): Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell.* 60: 53-61.

Gumbiner BM. (2000): Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol.* 148: 399-404.

Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. (1997): N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun.* 4: 399-411.

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. (2000): Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, metastasis. *J Cell Biol.* 148: 779-90.

Henry MD, Campbell KP. (1998): A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell*. 95: 859-870.

Hemesath TJ, Stefansson K (1994): Expression of tenascin in thymus and thymic non-lymphoid cells. *J Immunol*. 152: 422-428

Higgins JM, Mandlebrot DA, Shaw SK, Russell GJ, Murphy EA, Chen YT, Nelson WJ, Parker CM, Brenner MB. (1998): Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin. *J Cell Biol*. 140: 197-210.

Hoffman MP, Engbring JA, Nielsen PK, Vargas J, Steinberg Z, Karmand AJ, Nomizu M, Yamada Y, Kleinman HK. (2001): Cell type-specific differences in glycosaminoglycans modulate the biological activity of a heparin-binding peptide (RKRLQVQLSIRT) from the G domain of the laminin alpha1 chain. *J Biol Chem*. 276: 22077-22085.

Hynes RO. (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69: 11-25.

Hynes RO. (1999): Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*. 9: 33-37.

Iwao M, Fukada S, Harada T, Tsujikawa K, Yagita H, Hiramane C, Miyagoe Y, Takeda S, Yamamoto H. (2000): Interaction of merosin (laminin 2) with very late activation antigen-6 is necessary for the survival of CD4⁺ CD8⁺ immature thymocytes. *Immunology*. 99:481-488.

Janeway CA, Travers P. (2001): Immunobiology, Garland Publishing

Juliano R.L. (2002): Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 42: 283-323.

Kemler R.(1993): From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet*. 9: 317-321.

Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A, Sekiguchi K. (2000): Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins. *J Cell Sci.* 113: 869-876.

Kilshaw PJ, Baker KC. (1988): A unique surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the mouse. *Immunol Lett.* 18: 149-154.

Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M. (1994): Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell.* 5: 797-805.

Kim MG, Lee G, Lee SK, Lolkema M, Yim J, Hong SH, Schwartz RH. (2000): Epithelial cell-specific laminin 5 is required for survival of early thymocytes. *J Immunol.* 165: 192-201.

Klass CM, Couchman JR, Woods A. (2000): Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci.* 13: 493-506.

Klein G, Conzelmann S, Beck S, Timpl R, Müller CA: (1994): Perlecan in the human bone marrow microenvironment: a growth factor presenting, but repelling extracellular component for hematopoietic cells. *Matrix Biol.* 14: 457-465.

Klein G, Müller CA, Tillet E, Chu M-L, Timpl R. (1995): Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood.* 86: 1740-1748.

Klein G, Kibler C, Schermutzki F, Brown J, Müller CA, Timpl R. (1997): Cell binding properties of collagen type XIV for hematopoietic cells. *Matrix Biol.* 16: 307-317.

Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ. (1995): Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol.* 130: 67-77.

Knudsen KA, Frankowski C, Johnson KR, Wheelock MJ. (1998): A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31: 168-176.

Kreis T, Vale R. (1999): Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. Oxford University Press

Laemmli UK. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lannes-Vieira J, Dardenne M, Savino W. (1991): Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. *J Histochem Cytochem*. 39: 1539-1546.

Lammers R, Giesert C, Grünebach F, Marxer A, Vogel W, Bühring HJ. (2002): Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. *Exp Hematol*. 30: 537-545.

Lee MG, Sharrow SO, Farr AG, Singer A, Udey MC. (1994): Expression of the homotypic adhesion molecule E-cadherin by immature murine thymocytes and thymic epithelial cells. *J Immunol*. 152: 5653-5639.

Lefrancois L, Barrett TA, Havran WL, Puddington L. (1994): Developmental expression of the alpha IEL beta 7 integrin on T cell receptor gamma delta and T cell receptor alpha beta T cells. *Eur J Immunol*. 24: 635-640.

Libby RT, Champlaud MF, Claudepierre T, Xu Y, Gibbons EP, Koch M, Burgeson RE, Hunter DD, Brunken WJ. (2000): Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neurosci*. 20: 6517-6528.

Magner WJ, Chang AC, Owens J, Hong MJ, Brooks A, Coligan JE. (2000): Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2. *Dev Immunol*. 7: 179-193.

Matsui C, Pereira P, Wang CK, Nelson CF, Kutzkey T, Lanigan C, Woodley D, Morohashi M, Welsh EA, Hoeffler WK. (1998): Extent of laminin-5 assembly and secretion effect junctional epidermolysis bullosa phenotype. *J Exp Med*. 187: 1273-1283.

McFarland RD, Douek DC, Koup RA, Picker LJ. (2000): Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 4215-4220.

Munro SB, Duclos AJ, Jackson AR, Baines MG, Blaschuk OW. (1996): Characterization of cadherins expressed by murine thymocytes. *Cell Immunol.* 169: 309-312.

Müller-Hermelink HK, Wilisch A, Schultz A, Marx A. (1997): Characterization of the human thymic microenvironment: lymphoepithelial interaction in normal thymus and thymoma. *Arch Histol Cytol.* 60: 9-28.

Müller-Hermelink HK, Marx A. (2000): Thymoma. *Curr Opin Oncol.* 12: 426-433.

Müller KM, Luedecker CJ, Udey MC, Farr AG. (1997): Involvement of E-cadherin in thymus organogenesis and thymocyte maturation. *Immunity.* 6: 257-264.

Nievers MG, Schaapveld RQ, Sonnenberg A. (1999): Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* 18: 5-17.

Ocklind G, Talts J, Fässler R, Mattsson A, Ekblom P. (1993): Expression of tenascin in developing and adult mouse lymphoid organs. *J Histochem Cytochem.* 41: 1163-1169.

Owen JJ, McLoughlin DE, Suniara RK, Jenkinson EJ. (1999): Cellular and matrix interactions during the development of T lymphocytes. *Braz J Med Biol Res.* 32: 551-555.

Pauls K, Schön M, Kubitzka RC, Homey B, Wiesenborn A, Lehmann P, Ruzicka T, Parker CM, Schön MP. (2001): Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes. *J Invest Dermatol.* 117: 569-575.

Pedraza C, Geberhiwot T, Ingerpuu S, Assefa D, Wondimu Z, Kortessmaa J, Tryggvason K, Virtanen I, Patarroyo M. (2000): Monocytic cells synthesize, adhere to, and migrate on laminin-8 (alpha 4 beta 1 gamma 1). *J Immunol.* 165: 5831-5938.

Puch S, Armeanu S, Kibler C, Johnson KR, Müller CA, Wheelock MJ, Klein G. (2001): N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation. *J Cell Sci.* 8: 1567-1577.

Ranscht B. (1994): Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. *Curr Opin Cell Biol.* 6: 740-746.

Rapraeger AC. (2000): Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol.* 149: 995-998.

Röpke C. (1997): Thymic Epithelial Cell Culture. *Microsc Res Tech.* 38: 276-286

Ruco LP, Paradiso P, Pittiglio M, Diodoro MG, Gearing AJ, Mainiero F, Gismondi A, Santoni A, Baroni CD. (1993): Tissue distribution of very late activation antigens-1/6 and very late activation antigen ligands in the normal thymus and in thymoma. *Am J Pathol.* 142: 765-772.

Salo T, Kainulainen T, Parikka M, Heikinheimo K. (1999): Expression of laminin-5 in ameloblastomas and human fetal teeth. *J Oral Pathol Med.* 28: 337-342.

Salomon DR, Mojcik CF, Chang AC, Wadsworth S, Adams DH, Coligan JE, Shevach EM. (1994): Constitutive activation of integrin $\alpha 4\beta 1$ defines a unique stage of human thymocyte development. *J Exp Med.* 179: 1573-1584

Salomon DR, Crisa L, Mojcik CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM. (1997): Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood.* 89: 2461-2471.

Savino W, Villa-Verde DM, Lannes-Vieira J. (1993): Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol Today.* 14: 158-161.

Savino W, Dalmau SR, Dealmeida VC. (2000): Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol.* 7: 279-291.

Schober S, Mielenz D, Echtermeyer F, Hapke S, Pöschl E, von der Mark H, Moch H, von der Mark K. (2000): The role of extracellular and cytoplasmic splice domains of alpha7-integrin in cell adhesion and migration on laminins. *Exp Cell Res.* 255: 303-313.

Schön MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, Marsal J, Donohue JP, Her H, Beier DR, Olson S, Lefrancois L, Brenner MB, Grusby MJ, Parker CM. (1999): Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol.* 162: 6641-6649.

Schön MP, Schön M, Warren HB, Donohue JP, Parker CM. (2000): Cutaneous inflammatory disorder in integrin alphaE (CD103)-deficient mice. *J Immunol.* 165: 6583-6589.

Schulze B, Mann K, Pöschl E, Yamada Y, Timpl R. (1996): Structural and functional analysis of the globular domain IVa of the laminin alpha 1 chain and its impact on an adjacent RGD site. *Biochem J.* 314: 847-851.

Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, Waage A, Borset M. (2000): Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood.* 95: 388-392.

Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. (1990): Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature.* 345: 250-253.

Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O. (1989): Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.* 49: 2128-2133.

Shortman K, Wu L. (1996): Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol.* 14: 29-47.

Siler U, Seiffert M, Puch S, Richards A, Torok-Storb B, Müller CA, Sorokin L, Klein G. (2000): Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood.* 96: 4194-4203.

Suzuki ST. (1996a): Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J Cell Biochem.* ; 61: 531-542.

Suzuki ST. (1996b): Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J Cell Sci.* 109: 2609-26011.

Takeichi M. (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 251: 1451-1455.

Takeichi M. (1993): Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 806-811.

Takeichi M. (1995): Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 619-627.

Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. (1993): Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature.* 361: 82-85.

Tashiro K, Monji A, Yoshida I, Hayashi Y, Matsuda K, Tashiro N, Mitsuyama Y. (1999): An IKLLI-containing peptide derived from the laminin alpha1 chain mediating heparin-binding, cell adhesion, neurite outgrowth and proliferation, represents a binding site for integrin alpha3beta1 and heparan sulphate proteoglycan. *Biochem J.* 340: 119-126.

Tiger CF, Champlaud MF, Pedrosa-Domellof F, Thornell LE, Ekblom P, Gullberg D. (1997): Presence of laminin alpha5 chain and lack of laminin alpha1 chain during human muscle development and in muscular dystrophies. *J Biol Chem.* 272: 28590-28595.

Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. (1979): Laminin-- a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* 254: 9933-9937.

Timpl R. (1989): Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem.* 180: 487-502.

Utani A, Nomizu M, Yamada Y. (1997): Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences. *J Biol Chem.* 272: 2814-2820.

Vernino S, Auger RG, Emslie-Smith AM, Harper CM, Lennon VA. (1999): Myasthenia, thymoma, presynaptic antibodies, and a continuum of neuromuscular hyperexcitability. *Neurology*. 53: 1233-1239.

Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R. (1987): Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol*. 124: 451-456.

Villa-Verde DMS, Calado TC, Ocampo JSP, Silva-Monteiro E, Savino W. (1999): The conveyer belt hypothesis for thymocyte migration: participation of adhesion and de-adhesion molecules. *Braz J Med Biol Res*. 32: 569-572.

Vincent A, Willcox N. (1999): The role of T-cells in the initiation of autoantibody responses in thymoma patients. *Pathol Res Pract*. 195 : 535-40.

Virtanen I, Lohi J, Tani T, Sariola H, Burgeson RE, Lehto VP. (1996): Laminin chains in the basement membranes of human thymus. *Histochem J*. 28: 643-650.

Vivinus-Nebot M, Ticchioni M, Mary F, Hofman P, Quaranta V, Rousselle P, Bernard A. (1999): Laminin 5 in the human thymus: control of T cell proliferation via alpha6beta4 integrins. *J Cell Biol*. 144: 563-574.

Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. (1994): Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. *Nat Genet*. 8: 297-302.

Wadsworth S, Halvorson MJ, Coligan JE. (1992): Developmentally regulated expression of the beta 4 integrin on immature mouse thymocytes. *J Immunol*. 149: 421-428.

Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. (2000): E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*. 87: 992-1005.

Woods A, Couchman JR. (1998): Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol*. 8: 189-192.

Woods A, Couchman JR. (2000): Integrin modulation by lateral association. *J Biol Chem*. 275: 24233-24236.

Woods A, Couchman JR. (2001): Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 578-583.

Woods A. (2001): Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J Clin Invest.* 107: 935-941.

Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoe K. (2001): Enhancement of stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis for CD4/8 double positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology.* 104: 43-49.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BCECF-AM	[2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxyethyl Ester
BCIP/NBT	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro blue tetrazolium
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-Propansulfonsäure
CD	Cluster of Differentiation
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt negative
DP	Doppelt positive
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Extrazelluläre Domäne
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HAV	Histidin-Alanin-Valin
Ig	Immunglobulin
k.Exp.	Keine Expression
kDa	Kilo Dalton
MACS	Magnetic activated cell sorting
MB	Magnetic beads
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
n.d.	Nicht durchgeführt

PBLC	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet-Endothelial cell adhesion molecule
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute/Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Single positive
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
xg	g-Zahl: relative Zentrifugalbeschleunigung
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Veröffentlichungen

Publikationen

Kutleša S, Siler U, Speiser A, Virtanen I, Rousselle P, Sorokin LM, Müller CA, Klein G. (2002): Developmentally-regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms. *Immunology*. 106: 1-17

Kutleša S, Wessels JT, Speiser A, Steiert I, Müller CA, Klein G. (2002): E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cell with CD103⁺ thymocytes induces cell proliferation. Submitted to *J Cell Sci*.

Kongressbeiträge

Kutleša S, Siler U, Speiser A, Virtanen I, Rousselle P, Sorokin LM, Müller CA, Klein G. Developmentally-regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms.

17th Spring Meeting of the German Society for Immunology (DGfI), Innsbruck, Feb. 2001

Kutleša S, Siler U, Speiser A, Virtanen I, Rousselle P, Sorokin LM, Müller CA, Klein G. Developmentally-regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms.

Joint Annual Meeting of the Belgian and German Connective Tissue Societies “New insights and novel aspects in Extracellular Matrix Research”, *Cologne, March 2001*

Kutleša S, Müller CA, Klein G.

E-cadherin-mediated interactions in the human thymus.

Immunobiology 204: 73-74 (E.14), 2001.

Kutleša S, Müller CA, Klein G.

Adhesion of CD103+ thymocytes to thymic epithelial cells is mediated via E-cadherin.

International Conference of the MDC-Max Delbrück Center for Molecular Medicine “cell Migration in Development and Disease”, Berlin, Germany, November 2001

Kutleša S, Müller CA, Klein G.

Role of E-cadherin in human T-cell development.

2nd Joint UK/German Adhesion Meeting, 10. Jahrestagung des Arbeitskreises Adhäsionsmoleküle (Gesellschaft für Immunologie), Berlin, July 2002