

**Abnormes Mikromilieu und gestörte Thymopoese  
in Thymomen als Grundlage  
der Autoimmunisierung im peripheren Immunsystem**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Viola Josefa Maria Hoffacker  
aus Langenfeld/Rhld.**

**Würzburg, 2001**

Eingereicht am: 7. März 2001

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender : Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. H.-K. Müller-Hermelink

Gutachter: PD Dr. G. Pflugfelder

Tag des Promotionskolloquiums: 27.06.2001

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

## **Danksagung**

Diese Arbeit entstand am Institut für Pathologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-K. Müller-Hermelink. Ihm danke ich für die Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn PD Dr. G. Pflugfelder danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alexander Marx, der die wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Arbeit übernommen hat. Ihm möchte ich für die zahlreichen Anregungen und seine stete Diskussionsbereitschaft danken.

Bei Frau Dr. Anja Schultz möchte ich mich ganz besonders herzlich für die intensive Einarbeitung in das Reich der Thymome bedanken sowie für die zahlreichen anregenden Diskussionen. Durch ihre nette und aufmunternde Art hat sie sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Andrea Homburger möchte ich für ihre Geduld bei den zahlreichen FACS-Färbungen und beim Korrekturlesen der Arbeit danken sowie Elke Oswald für die sorgfältige Einführung in die Zellkultur. Dr. Annette Wilisch-Neumann und Dr. Constanze Knörr sei für die guten Tipps bei der Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und Cornelia Heitzig für ihren „Rotstift-Einsatz“ bei der Durchsicht des Manuskripts gedankt. Außerdem möchte ich mich bei Christel Kohaut für die immunhistochemischen Färbungen bedanken. Dank auch an unseren Fotografen Herrn Schmitt für seine Geduld und die hervorragenden Bilder.

Allen Mitarbeitern des Pathologischen Institutes sei für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft gedankt. Insbesondere danke ich den bisher nicht genannten Mitarbeitern der AG Greiner (Dr. Harald Seeberger, Maria Reichert und Christa Amrehn) für die gute Kooperation.

Abschließend möchte ich besonders meinen Familienangehörigen und Freunden für ihr Interesse und die vielfältige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit danken.

---

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1	T-Zell-Reifung	6
2.2	T-Zell-Toleranz	7
2.3	Myasthenia gravis	9
2.4	Thymome	10
2.4.1	Mikromilieu in Thymomen	12
2.5	Modellvorstellungen zur Entstehung der Myasthenia gravis	14
2.5.1	Pathogenese der Myasthenia gravis bei Thymitis	14
2.5.2	Pathogenese der Myasthenia gravis bei epithelialen Thymustumoren	15
2.6	Aufgabenstellung	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
3.1	Material	19
3.1.1	Arbeitsgeräte und Hilfsmittel	19
3.1.2	Chemikalien	19
3.1.3	Häufig-verwendete Puffer und Lösungen	20
3.1.4	Enzyme und Antikörper	20
3.1.5	Plasmide und Oligonukleotide	21
3.1.6	Bakterienstämme und Medien	22
3.1.7	Eukaryontische Zellen und Medien	22
3.1.8	Patienten und Gewebe	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1.1	Kultivierung prokaryontischer Zellen	23
3.2.1.1.1	Fest- und Flüssigkultur von Bakterienstämmen	23
3.2.1.1.2	Dauerkultur von Bakterien	23
3.2.1.1.3	Herstellung kompetenter Bakterien	23
3.2.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i>	24
3.2.1.3	Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	24

3.2.1.4	DNA-Fällung	26
3.2.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	26
3.2.1.6	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
3.2.1.7	Restriktionsverdau	27
3.2.1.8	Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese	27
3.2.1.9	Cyclesequencing von DNA und Auswertung über ABI373	27
3.2.1.10	RNA-Isolation aus gefrorenem Gewebe (Chomczynski and Sacchi, 1987)	28
3.2.1.11	RNA-Isolation aus Zellen	29
3.2.1.12	Konzentrationsbestimmung der RNA	29
3.2.1.13	RNA-Gel	29
3.2.1.14	DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA	29
3.2.1.15	cDNA-Synthese	30
3.2.1.16	Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit cDNA als Template	31
3.2.1.17	Prinzip der Optimierung einer PCR	32
3.2.1.18	GAPDH-PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese	32
3.2.1.19	Quantifizierung der cDNA-Menge anhand einer GAPDH-PCR	32
3.2.1.20	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel	33
3.2.1.20.1	Aufreinigung über GenElute™ Minus EtBr (Supelco, Bellefonte, USA)	33
3.2.1.20.2	Aufreinigung mittels Gelase (Biozym, Ohlendorf)	33
3.2.1.21	Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.2.1.22	Atlas™ Human Cancer cDNA-Expression-Array (Clontech, Heidelberg)	34
<b>3.2.2</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>35</b>
3.2.2.1	Isolation von Zytoskelettproteinen	35
3.2.2.2	Expression rekombinanter Proteine	36
3.2.2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	37
3.2.2.4	SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970)	37
3.2.2.5	Western-Blot	38
3.2.2.6	Peptid-Spotting	39
<b>3.2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>40</b>
3.2.3.1	Einfrieren von eukaryontischen Zellen	40
3.2.3.2	Auftauen von eukaryontischen Zellen	40
3.2.3.3	Zellzahlbestimmung nach Neubauer	40
3.2.3.4	Isolation von Lymphozyten aus Frischgewebe	40
3.2.3.5	Gewinnung von Primärzellen aus Vollblut mittels Ficollgradient	41
3.2.3.6	Bestimmung der absoluten Zellzahl der PBL im Blut	41
3.2.3.7	Stimulation von PBL mit Ionomycin und TPA	41
3.2.3.8	Kultivierung der Zell-Linien	41
3.2.3.9	T-Zell-Proliferationstest	41
3.2.3.10	FACS-Analyse	42
3.2.3.11	Immunhistochemische Färbung	43
<b>3.2.4</b>	<b>Statistische Auswertung der Daten</b>	<b>43</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung intratumoröser Autoantigene und ihr Einfluß auf die Thymopoese in Thymomen</b>	<b>44</b>
4.1.1	Identifizierung des Proteins p153	44
4.1.2	Expression bisher nicht verfügbarer rekombinanter Proteine	47
4.1.2.1	Konstruktion der Expressionsklone	47
4.1.2.1.1	Klone pGex-NF-M(1-465) (NF-M-A) und pGex-NF-M(736-916) (NF-M-C)	48
4.1.2.1.2	Klone pGex- $\delta$ AChR (313-450) ( $\Delta^{\text{zyt}}$ ) und pGex- $\delta$ AChR (430-496) ( $\Delta^{\text{Cterm}}$ )	49
4.1.2.2	Bakterielle Proteinexpression	51
4.1.3	T-Zell-Proliferationstests mit rekombinanten Autoantigenen	56
4.1.3.1	Nachweis NF-M-B-spezifischer T-Zellen	56
4.1.3.2	Nachweis autoreaktiver T-Zellen in Thymompatienten gegen bisher nicht verfügbare Autoantigene	62
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung von Mikromilieufaktoren in Thymomen und Thymusgewebe</b>	<b>66</b>
4.2.1	Atlas <sup>TM</sup> Human Cancer cDNA-Expression-Array (Clontech, Heidelberg)	66
4.2.2	Untersuchung der Expression mittels RT-PCR	69
<b>4.3</b>	<b>Einfluß des Thymoms auf die Zusammensetzung und Funktion des peripheren T-Zell Repertoires</b>	<b>76</b>
4.3.1	FACS-Analysen	76
4.3.1.1	Untersuchung des Anteils an CD45RA <sup>+</sup> T-Zellen im Blut	76
4.3.1.2	Untersuchung des Anteils an CD4 <sup>+</sup> bzw. CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Blut	79
4.3.1.3	Ermittlung des CD4/CD8-Verhältnisses unter den reifen T-Zellen in Thymomen und im Thymusgewebe	81
4.3.1.4	Untersuchung des Anteils an peripheren CD45RA <sup>+</sup> Zellen nach der Thymektomie	83
4.3.2	Funktionelle Analysen (Proliferationstests)	85
4.3.2.1	Ermittlung Autoantigen-spezifischer T-Zellen im Blut und Thymom	85
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung des Chemokin-Profiles in Thymom- bzw. Thymusgewebe</b>	<b>87</b>
4.4.1	RT-PCR-Analysen der Chemokinexpression	87
4.4.2	Immunhistochemische Färbungen	92

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>95</b>
5.1	Identifikation des NF-M-Proteins in Thymomen und Zusammenhang mit der paraneoplastischen MG	95
5.2	Ermittlung autoreaktiver T-Zellen gegen weitere NF-M-Fragmente und gegen Fragmente der Delta-Untereinheit des AChR	98
5.3	Untersuchung verschiedener Mikromilieufaktoren in Thymomen und nicht-neoplastischen Thymi	100
5.4	Einfluß des Thymoms auf die Zusammensetzung und Funktion des peripheren T-Zell Repertoires	105
5.5	Untersuchung der Expression ausgewählter Chemokine in Thymomen und nicht-neoplastischen Thymi	110
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>133</b>
6.1	Verwendete Oligonukleotide	133
6.2	PCR-Bedingungen	133
6.3	Patientendaten	135
6.4	Übersicht über Struktur und Funktion der Genprodukte der mittels Expressionsarray ermittelten Gene	143
6.5	Lebenslauf	149
6.6	Publikationen	150

---

## Abkürzungsverzeichnis

3‘	downstream
5‘	upstream
A	Adenin
AChR	Azetylcholinrezeptor
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5‘-triphosphat
BLC	B-lymphocyte chemoattractant (=B-cell attracting chemokine [BCA-1])
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CT	kortikales Thymom (WHO-Typ B)
d	2‘Desoxy
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2‘-Desoxynukleosid-5‘phosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
d(T)15	Oligonukleotid aus 15 Thymidinresten
EAMG	experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (Tiermodell für MG)
ECL	verstärkte Chemilumineszenz

E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cellsorter
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOR	steht für FORWARD im Zusammenhang mit der Orientierung eines Primers bei der PCR
g	Erdbeschleunigung ( $g = 9.81 \text{ m/s}^2$ ) oder Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
gRNA	Gesamt-RNA
h	Stunde
HE	Hämatoxylineosin
HLA	humanes Leukozytenantigen (humaner MHC)
hu	human
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
k	kilo ( $\times 10^3$ )
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria-Broth
LK	Lymphknoten

---

LMP	low melting point
m	milli
MCS	multiple cloning site
MDC	Macrophage-derived chemokine
MED	medulläres Thymom (WHO-Typ A)
Med	Mediastinum (im Zusammenhang mit T-LBL)
MG	Myasthenia gravis
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIG	Monokine induced by interferon- $\gamma$
min	Minute
MOPS	3-(n-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht
MXT	gemischtes Thymom (WHO-Typ AB)
$\mu$	Mikro ( $\times 10^{-6}$ )
n	Nano ( $\times 10^{-9}$ )
NaAc	Natriumacetat
NF-M	Neurofilament mittleren Molekulargewichts
nt	Nukleotid
NT	Normalthymus
ODx	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
p	Piko ( $\times 10^{-12}$ )
p	Plasmid
p153	Protein, exprimiert in Thymomen, mit einem Molekulargewicht von 153 kD
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffprotonenkonzentration

PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
REV	steht für REVERSE im Zusammenhang mit der Orientierung eines Primers bei der PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR (reverse transcribed PCR)
SI	Stimulationsindex
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
t	Zeit (t)
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris-EDTA
TECK	Thymus-expressed chemokine
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFH	Thymitis
T-LBL	T-Zell lymphoblastisches Lymphom
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRI	Tricolor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT	Tetanus Toxoid
U	Einheit der enzymatischen Aktivität (unit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen

WDTC	gut ausdifferenziertes thymisches Karzinom (WHO-Typ B3)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent)

### Genetischer Code

TTT	F	Phe	TCT	S	Ser	TAT	Y	Tyr	TGT	C	Cys
TTC	F	Phe	TCC	S	Ser	TAC	Y	Tyr	TGC	C	Cys
TTA	L	Leu	TCA	S	Ser	TAA	*	Stop	TGA	C	Cys
TTG	L	Leu	TCG	S	Ser	TAG	*	Stop	TGG	W	Trp
CTT	L	Leu	CCT	P	Pro	CAT	H	His	CGT	R	Arg
CTC	L	Leu	CCC	P	Pro	CAC	H	His	CGC	R	Arg
CTA	L	Leu	CCA	P	Pro	CAA	Q	Gln	CGA	R	Arg
CTG	L	Leu	CCG	P	Pro	CAG	Q	Gln	CGG	R	Arg
ATT	I	Ile	ACT	T	Thr	AAT	N	Asn	AGT	S	Ser
ATC	I	Ile	ACC	T	Thr	AAC	N	Asn	AGC	S	Ser
ATA	I	Ile	ACA	T	Thr	AAA	K	Lys	AGA	R	Arg
ATG	M	Met	ACG	T	Thr	AAG	K	Lys	AGG	R	Arg
GTT	V	Val	GCT	A	Ala	GAT	D	Asp	GGT	G	Gly
GTC	V	Val	GCC	A	Ala	GAC	D	Asp	GGC	G	Gly
GTA	V	Val	GCA	A	Ala	GAA	E	Glu	GGA	G	Gly
GTG	V	Val	GCG	A	Ala	GAG	E	Glu	GGG	G	Gly

### Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabencode

A =	Ala (Alanin)	M =	Met (Methionin)
C =	Cys (Cystein)	N =	Asn (Asparagin)
D =	Asp (Asparaginsäure)	P =	Pro (Prolin)
E =	Glu (Glutaminsäure)	Q =	Gln (Glutamin)
F =	Phe (Phenylalanin)	R =	Arg (Arginin)
G =	Gly (Glycin)	S =	Ser (Serin)
H =	His (Histidin)	T =	Thr (Threonin)
I =	Ile (Isoleucin)	V =	Val (Valin)
K =	Lys (Lysin)	W =	Trp (Tryptophan)
L =	Leu (Leucin)	Y =	Tyr (Tyrosin)



## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Thymome sind die einzigen Tumoren, die reife T-Zellen aus unreifen Vorläuferzellen generieren, wobei die unreifen Thymozytenpopulationen in Thymomen im Vergleich zum Thymus abnorm vermehrt und die reifen Populationen vermindert sind. Zusätzlich weist das Thymomgewebe im Vergleich zum Thymus weniger B-Zellen und Effektor-T-Zellen auf. Bisher ist unbekannt, welche Faktoren die veränderte intratumoröse Zusammensetzung der Zellpopulationen bedingen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Mikromilieufaktoren in Thymomen mit möglichen Auswirkungen auf die intratumoröse Thymopoese zu identifizieren und deren Einfluß auf das periphere Immunsystem zu untersuchen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde nach Ursachen für die abnorme Thymozytenreife und die Generierung autoreaktiver T-Zellen in Thymomen gesucht. Als potentielles Autoantigen, das die positive Selektion in Thymomen beeinflussen könnte, wurde das in Thymomen exprimierte Protein p153 als Neurofilament mittleren Molekulargewichtes (NF-M) identifiziert. Mittels T-Zell-Proliferationstests konnte gezeigt werden, daß intratumoröse T-Zellen von Thymompatienten mit Myasthenia gravis (MG) nach Stimulation mit dem mittleren Fragment dieses Proteins (NF-M-B) signifikant höhere Antworten aufwiesen als Thymozyten von Thymitispatienten oder Thymompatienten ohne MG. NF-M-B-reaktive T-Zellen waren charakteristisch für die paraneoplastische MG, wohingegen T-Zell-Antworten gegen ein Azetylcholinrezeptor (AChR)-Fragment bei allen MG-Patienten (Thymitis und Thymom) erhöht waren. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, daß intratumoröses NF-M eine autoantigene Determinante speziell für die paraneoplastische MG darstellt.

Das Mikromilieu von Thymomen wurde außerdem mittels cDNA-Arrays und RT-PCR analysiert. Als differentiell exprimierte Gene sind besonders das „Heparin-binding growth-associated molecule“ (HB-GAM) und der „B-cell growth factor 1“ (BCGF 1) hervorzuheben. Die Expression von HB-GAM zeigte sowohl eine Abhängigkeit vom histologischen Thymomtyp (kortikal > gemischt / medullär) als auch vom MG-Status der Patienten (MG+ > MG-). Aufgrund seiner beschriebenen angiogenetischen Eigenschaften könnte HB-GAM am Aufbau der thymomtypischen „perivaskulären Räume“ beteiligt sein. Umgekehrt wurde für den Faktor BCGF 1 eine signifikante Erhöhung in Thymomen ohne MG gefunden und keine Abhängigkeit vom histologischen Thymomtyp. Die Expression des Chemokins „Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant“ (I-TAC) war ebenfalls mit dem MG (+)-Status von Thymompatienten signifikant assoziiert. Diese Befunde machen eine Beteiligung von HB-GAM, BCGF 1 und I-TAC an der Pathogenese der paraneoplastischen MG wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu fand sich für das Chemokin „Makrophage-derived chemokine“ (MDC)

eine Abhängigkeit der Expression vom histologischen Thymomtyp (kortikal/gemischt > medullär), aber keine MG-Assoziation. Die Expression von „Thymus-expressed chemokine“ (TECK) wurde schließlich weder durch den histologischen Thymomtyp noch durch den MG-Status der Patienten beeinflusst. TECK ist vermutlich auch in Thymomen dafür verantwortlich, daß unreife Thymozyten nicht ins Blut gelangen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von FACS-Analysen und T-Zell-Proliferationsassays der Einfluß von Thymomen auf das periphere Immunsystem untersucht. Es zeigte sich, daß die veränderte Thymopoese und autoreaktive T-Zell-Funktion in Thymomen mit immunologischen Veränderungen im Blut korreliert waren. Der Anteil zirkulierender CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen war bei Thymompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht, in Übereinstimmung mit einer intratumorösen T-Zell-Reifung, die in Richtung der CD8<sup>+</sup>-Linie verschoben war. Dementsprechend nahm vor allem der Anteil dieser zirkulierenden CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Thymektomie ab. Auf funktioneller Ebene war die intratumorös nachweisbare, thymomtypische T-Zell-Autoreaktivität gegen NF-M-B und  $\alpha$ AChR (301-398) gleichermaßen im Thymom und Blut zu finden. Diese funktionellen Studien unterstützen die Hypothese, daß die in Thymomen stattfindende Thymopoese das periphere T-Zell-Repertoire verändert. Hinsichtlich des Importes von T-Zellen aus der Peripherie in das Thymom ergaben die funktionellen Assays dagegen, daß T-Zellen, die auf ein fremdes Antigen (Tetanus Toxoid) reagierten, nur innerhalb zirkulierender T-Zellen, nicht aber innerhalb intratumoröser Thymozyten nachweisbar waren. Ebenso fanden sich erhöhte autoreaktive T-Zell-Antworten gegen andere Fragmente des NF-M-Proteins (NF-M-A und NF-M-C) sowie für ein Fragment der  $\delta$ -Untereinheit des AChR nur im Blut von Thymompatienten. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Migration von Effektor-T-Zellen aus der Peripherie ins Thymom vermindert ist. Während die Mechanismen für diese gestörte T-Zell-Rezirkulation ins Thymom ungeklärt sind, bestand eine Korrelation zwischen der Expression des B-Zell-spezifischen Chemokins BLC (B-Lymphocyte chemoattractant) und der Anzahl der B-Zellen, die immunhistochemisch in den entsprechenden Geweben dargestellt wurden. Dieser Befund kann auf eine Rolle von BLC bei der Migration reifer B-Zellen in Thymus- bzw. Thymomgewebe hinweisen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Mikromilieufaktoren benannt werden, die von potentieller pathogenetischer Relevanz für die gestörte, nicht-tolerogene Thymopoese innerhalb von Thymomen sind. Zweitens konnte eindeutig gezeigt werden, daß die intratumoröse Thymopoese das periphere Immunsystem beeinflusst und bei MG-assoziierten Thymomen in Richtung auf ein höheres autoreaktives Potential verändert.

## SUMMARY

Thymomas are the only tumors that generate mature T cells from immature precursors. In particular, the precursor subsets are increased inside thymomas while the mature T-cell subsets are decreased compared with normal thymus. Moreover, the number of B cells and effector T-cells are diminished in thymomas. It is unknown, which kind of intratumorous factors are responsible for the abnormal thymopoiesis and abnormal thymocyte subset composition in these tumors. The aim of this study was therefore to investigate micromilieu factors inside thymomas which have an impact on the abnormal thymopoiesis and on the extrathymic immune system.

In the first part of the study, the molecular basis of the abnormal thymopoiesis and the generation of autoreactive T cells inside thymomas were investigated. It was shown, that the previously described thymoma protein p153 and the midsize-neurofilament (NF-M) are the same molecule. This potential autoantigen could have an impact on the generation of autoreactive T cells by influencing the positive selection inside thymomas. Using T-cell proliferation assays, intratumorous T cells showed significantly increased responses to one fragment of this protein (NF-M-B) in thymoma patients with myasthenia gravis (MG), in contrast to MG patients with thymitis or thymoma patients without MG. NF-M-B reactive T cells were characteristic for paraneoplastic MG while anti-AChR responses were increased in MG patients in general. These results offer further evidence that intratumorous NF-M is an autoantigenic determinant in paraneoplastic MG.

Further investigations concerning the micromilieu inside thymomas were performed, using cDNA array technology and RT-PCR analysis. Among the differentially expressed genes were „heparin-binding growth-associated molecule“ (HB-GAM) and the „B-cell growth factor“ (BCGF 1). The expression of HB-GAM depended on the histological thymoma subtype (cortical > mixed/medullar) and on the MG association of the thymomas (MG+ > MG-). HB-GAM was described as an angiogenic factor and has therefore perhaps an influence on the generation of „perivascular spaces“ that are characteristic for thymomas. By contrast, BCGF 1 was significantly increased in thymomas of patients without MG, irrespective of the histological thymoma subtype. Furthermore, there was a significant association between the expression of the chemokine „Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant“ (I-TAC) and the occurrence of MG. These results could be a hint at an influence of HB-GAM, BCGF 1 or I-TAC on the pathogenesis of MG. By contrast, expression of the „Makrophage-derived chemokine“ MDC depended on the histological

thymoma subtype (cortical/mixed > medullar) but not on MG status. The expression of „thymus-expressed chemokine“ (TECK) was normal irrespective of the histological thymoma subtype and the MG association. Therefore, this chemokine probably acts as a "thymocyte retention factor" inside thymomas as previously described for non-neoplastic thymus.

In the second part of this work, the impact of thymomas on the peripheral immune system was investigated, using FACS analysis and T-cell proliferation assays. The results showed, that abnormal thymopoiesis and autoreactive T-cell function in thymomas correspond with immunologic alterations in the blood. Specifically, the proportion of circulating CD45RA+ CD8+ T cells was significantly increased in patients with thymoma compared with normal controls, in accordance with intratumorous T-cell development that is abnormally skewed toward the CD8+ phenotype. Moreover, it was primarily the proportion of circulating CD45RA+ CD8+ T cells that decreases after thymectomy. On the functional level, the intratumous thymoma-specific T-cell responses to NF-M-B and  $\alpha$ AChR (310-398) were equally distributed between thymomas and blood. These functional studies support the hypothesis that thymopoiesis occurring within thymomas alters the peripheral T-cell repertoire. Concerning T-cell import from the periphery into thymomas, the functional studies demonstrate that T-cell responses to foreign antigen (ie, tetanus toxoid) were seen only among circulating T cells and not among thymoma-derived T cells. Moreover, increased autoreactive T-cell responses towards other fragments of the NF-M protein (NF-M-A, NF-M-C) or toward a fragment of the AChR  $\delta$ -subunit could be detected only in the blood of thymoma patients. These results demonstrate a diminished migration of effector T-cells from the periphery into thymomas. While the mechanisms for this altered T-cell recirculation are still unknown, the results of this study could show a correlation between the expression of the B-cell chemokine „B-lymphocyte chemoattractant“ (BLC) and the number of B cells as determined by immunohistochemistry. This is a hint at a role of BLC in the migration of mature B cells into thymus or thymoma tissue.

In summary, the present study could identify micromilieu factors with potential relevance for the pathogenesis of the disturbed, non-tolerogenic thymopoiesis occurring inside thymomas. Furthermore, it could be shown unequivocally that intratumorous thymopoiesis has an impact on the peripheral immune system of virtually all thymoma patients but contributes to its increased autoreactive potential specifically in thymoma patients with myasthenia gravis.

## 2 EINLEITUNG

Das menschliche Immunsystem ist ein Abwehrsystem, bestehend aus spezialisierten Zellen und Molekülen, welches den Körper aktiv vor Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Parasiten und anderen Fremdanthigenen schützt.

Es werden zwei fundamental unterschiedliche Arten von Antworten gegen das Eindringen von Krankheitserregern unterschieden. Erstens die natürliche oder inerte Immunantwort, die unabhängig von der Häufigkeit, mit der ein bestimmtes infektiöses Agent in den Körper gelangt, gleichbleibend ist. Zweitens die erworbene oder adaptive Immunantwort, welche sich nach wiederholter Begegnung mit demselben Krankheitserreger verbessert.

Die *natürliche Immunantwort* wird durch phagozytierende Zellen (Neutrophile, Monozyten und Makrophagen), inflammatorische Zellen (Basophile, Mastzellen und Eosinophile), welche entsprechende Mediatoren entlassen, und natürliche Killerzellen aufgebaut. Zu den molekularen Vermittlern gehören Komplement, Akute-Phase-Proteine und Zytokine.

Die *adaptive Immunantwort* wird durch die Proliferation Antigen-spezifischer B- und T-Zellen vermittelt, wobei ihnen das Antigen durch spezialisierte, sogenannte Antigen-präsentierende Zellen, präsentiert wird. Die B-Zellen sekretieren Immunglobuline, Antigen-spezifische Antikörper, durch die extrazelluläre Mikroorganismen eliminiert werden können.

Die T-Zellen können je nach Subpopulation verschiedene Funktionen ausüben. Bei den zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen richtet sich die T-Zell-Antwort direkt gegen infizierte Zellen und tötet diese ab. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden in Abhängigkeit von den Zytokinen, welche sie ausschütten, in inflammatorische TH1-Zellen und Helfer-TH2-Zellen eingeteilt (Janeway, 1999). Inflammatorische T-Zellen aktivieren Makrophagen und tragen dazu bei, daß diese intrazelluläre Krankheitserreger effektiver zerstören können. Helfer-T-Zellen dagegen regen B-Lymphozyten zur Differenzierung und Sekretion von Antikörpern an.

Aus der adaptiven Immunantwort ergeben sich die drei Haupteigenschaften des menschlichen Immunsystems. Die erste Eigenschaft ist die *immunologische Toleranz*, durch die das Immunsystem in der Lage ist, als fremd erkannte Antigene zu „bekämpfen“, gegenüber körpereigenen Strukturen jedoch tolerant zu sein, also keine Immunreaktion zu entwickeln. Die zweite wesentliche Eigenschaft ist die *Spezifität* der Immunreaktion, d.h., daß durch ein Fremdanthigen nur bestimmte, zu diesem Antigen passende Lymphozyten aktiviert werden. Die dritte Eigenschaft ist die Fähigkeit, ein *immunologisches Gedächtnis* aufzubauen, das bei erneutem Kontakt mit dem jeweiligen Antigen zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort führt.

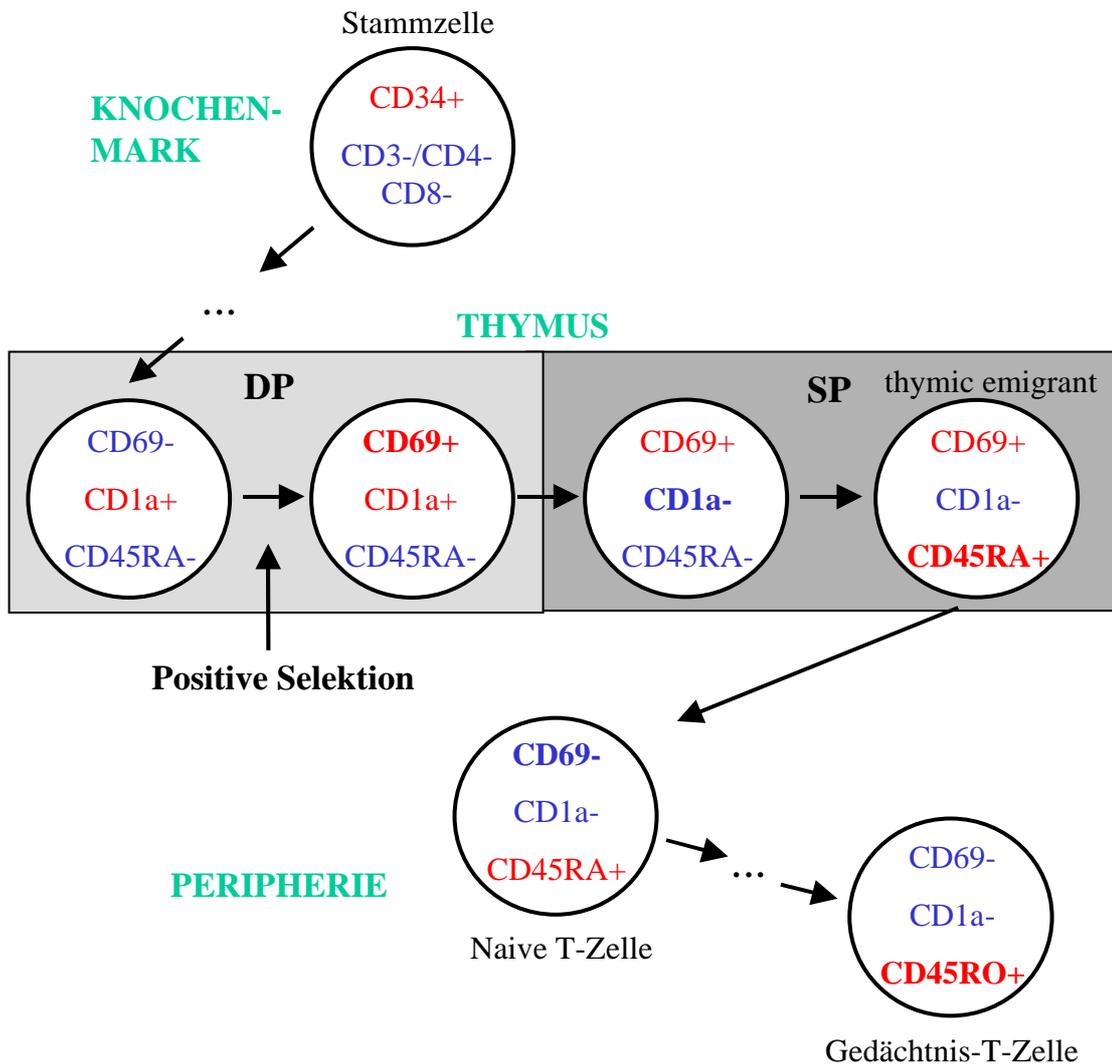
Treten Funktionsstörungen des Immunsystems auf, so können diese Haupteigenschaften nicht mehr erfüllt werden. So ist z. B. bei Autoimmunitätskrankungen, wie die in dieser Arbeit untersuchte *Myasthenia gravis (MG)*, die immunologische Toleranz gestört und es kommt zu einem Angriff des Immunsystems auf körpereigene Strukturen.

T-Zellen nehmen bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz eine wichtige Rolle ein. Es ist deshalb von zentraler Bedeutung, daß bei der T-Zell-Reifung, welche im Thymus geschieht, T-Zellen eliminiert werden, welche Selbstantigene erkennen.

## 2.1 T-Zell-Reifung

Alle Immunzellen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen in der fetalen Leber bzw. im Knochenmark. B-Zellen reifen im Knochenmark aus, wohingegen T-Zellen die endgültige Reife im Thymus erlangen (Delves and Roitt, 2000). Obwohl der Thymus im Laufe des Lebens atrophiert (sog. Thymusinvolution), scheinen dennoch bis ans Lebensende T-Zellen im Thymus zu reifen (Jamieson *et al.*, 1999). Während der Reifung im Thymus durchlaufen die T-Zellen verschiedene Entwicklungsstadien, welche sich durch die Expression bzw. Nicht-Expression verschiedener T-Zell-Oberflächenmarker unterscheiden lassen.

In der folgenden Abb. 1 sind an Hand der T-Zell-Marker CD69, CD1a und CD45RA einige CD3<sup>+</sup> Thymozytenstadien charakterisiert. Die Vorläuferzellen wandern als „triple negative“ (CD3-CD4-CD8-) Stammzellen aus dem Knochenmark in den Thymus ein. Nach der Expression des T-Zell-Markers CD3, wird die Expression von CD69 auf humanen Thymozyten in einem frühen Stadium der positiven Selektion (siehe 2.2) induziert (Vanhecke *et al.*, 1995a). Reife CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die den Thymus in die Peripherie verlassen („*thymic emigrants*“), sind dadurch charakterisiert, daß sie für den Marker CD1a negativ sind und die T-Zell-Marker CD69 und CD45RA exprimieren. Beim Austritt aus dem Thymus wird die Expression des Markers CD69 herunterreguliert (*naive T-Zelle*). Nach Antigenkontakt durchlaufen die T-Zellen verschiedene Stadien, die in Ausbildung einer *T-Zell-Gedächtniszelle* enden können. Dabei wird die Isoform CD45RA durch CD45RO ersetzt (Bell *et al.*, 1998).



**Abb. 1 : Reifung humaner CD3+ T-Zellen im Thymus.** Charakterisierung thymischer Entwicklungsstadien mittels der T-Zell-Marker CD69, CD1a und CD45RA. Exprimierte Marker sind in rot, nicht exprimierte in blau dargestellt. Der sich von einem zum nächsten Stadium verändernde Marker wurde jeweils **fett** markiert. DP: doppelt-positive T-Zellen ( $CD3+CD4+CD8+$ ), SP: einfach-positive T-Zellen ( $CD3+CD4+$  bzw.  $CD3+CD8+$ ). Darstellung verändert nach (Vanhecke *et al.*, 1995a).

## 2.2 T-Zell-Toleranz

T-Zellen sind Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-restringiert, d.h. sie erkennen ein fremdes Antigen nur, wenn ein Peptid-Fragment dieses Antigens gebunden an ein eigenes MHC-Molekül an der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle präsentiert wird. Dabei erkennt ein Teil des T-Zell-Antigen-Rezeptors (TCR) das fremde Peptid und ein anderer das körpereigene MHC-Molekül. Hieraus ergeben sich zwei Eigenschaften für alle T-Zellen. Zum

einen sind sie *selbst-MHC-restringiert*, d.h. ein fremdes Peptid wird nur erkannt, wenn es von einem MHC-Molekül des eigenen Körpers präsentiert wird. Zum anderen sind sie *selbst-tolerant*, d.h. Peptide körpereigener Moleküle, welche von eigenen MHC-Molekülen präsentiert werden, werden nicht erkannt.

T-Zellen erwerben diese beiden Eigenschaften während ihrer Reifung im Thymus bei der sogenannten positiven und negativen Selektion (Fink and Bevan, 1995; Kruisbeek and Amsen, 1996; Rathmell and Thompson, 1999; Sebзда *et al.*, 1999).

Bei der *positiven Selektion* wird die Selbst-MHC-Restriktion überprüft. Es werden nur die T-Zellen positiv selektioniert, die einen T-Zell-Rezeptor exprimieren, der mit dem MHC-Komplex der Epithelzellen im thymischen Kortex interagieren kann. Durch die positive Selektion wird das Signal zur spontanen Apoptose abgeschaltet, welches in allen sich entwickelnden Thymozyten zuvor aktiviert ist. Mehr als 95 % der T-Zellen werden nicht selektioniert und sterben zu diesem Zeitpunkt im Thymus (Delves and Roitt, 2000; von Boehmer, 1992).

Im Gegensatz dazu werden bei der *negativen Selektion* Zellen eliminiert, welche Selbst-Antigene im Zusammenhang mit eigenen MHC-Molekülen erkennen. In jedem T-Lymphozyten, welcher einen T-Zell-Rezeptor exprimiert, der mit einer hohen Affinität an ein Selbst-Peptid in einem MHC-Komplex auf dendritischen Zellen bzw. Makrophagen in der thymischen Medulla bindet, wird Apoptose induziert (Delves and Roitt, 2000). Durch diese Selektion soll verhindert werden, daß autoreaktive T-Zellen den Thymus verlassen.

Bei beiden Selektionsprozessen ist die Avidität zwischen dem jeweiligen TCR und dem Peptid-MHC-Komplex entscheidend für das Schicksal der T-Zellen (Jameson and Bevan, 1998). T-Zellen mit einer geringen Avidität erhalten ein Überlebenssignal (positive Selektion), die mit einer hohen Avidität erhalten das Signal für den apoptotischen Zelltod (negative Selektion). (Klein and Kyewski, 2000).

Neben dieser sogenannten *zentralen Toleranz*, welche im Thymus abläuft, sind außerdem periphere Mechanismen nötig, um Autoimmunität zu verhindern, da viele gewebsspezifische Autoantigene nicht oder in zu geringen Konzentrationen im Thymus vorhanden sind, um Toleranz zu induzieren (Delves and Roitt, 2000). Die *periphere Toleranz* kann durch ein fehlendes zweites T-Zell-Aktivierungssignal bei Kontakt mit einem Selbst-Antigen hervorgerufen werden. Naive T-Zellen benötigen für eine Aktivierung zwei voneinander unabhängige Signale: Zum einen ein Signal über ihren TCR und zum anderen ein kostimulatorisches Signal durch die Anlagerung von CD80 bzw. CD86 auf der Antigen-präsentierenden Zelle an CD28 auf der T-Zelle (Lenschow *et al.*, 1996). Fehlt das kostimulatorische Signal, führt dies zu spezifischer Anergie oder Apoptose der entsprechenden T-Zelle (Van Parijs and Abbas, 1998).

Außerdem wird regulatorischen CD4+ T-Zellen eine Rolle bei der peripheren Toleranz zugesprochen (Hoyne *et al.*, 2000; Mason and Powrie, 1998).

### 2.3 Myasthenia gravis

Das klassische Beispiel für eine organspezifische Autoimmunerkrankung, bei der die Selbsttoleranz des Immunsystems gebrochen ist, ist die *Myasthenia gravis*. Diese Erkrankung wird durch eine Störung der neuromuskulären Übertragung hervorgerufen, die sich als schnellere Muskelermüdbarkeit und Muskelschwäche manifestiert.

Die Myasthenia gravis ist eine der am besten verstandenen Autoimmunerkrankungen des Menschen und bietet daher ein gutes Modell, um die Auslösung der Autoimmunisierung (Ätiologie) humaner Autoimmunerkrankungen zu verstehen.

Die MG wurde 1893 von Goldflam als ein eigenständiges Krankheitsbild beschrieben (Goldflam, 1893). 1895 definierte Jolly als wesentliches Merkmal der MG die rasche elektrische Erschöpfbarkeit der Muskulatur (Jolly, 1895).

Durch die Untersuchungen von Lindstrom *et al.*, der in den Seren der Patienten Azetylcholinrezeptor-spezifische Antikörper nachweisen konnte, wurde gezeigt, daß es sich bei der MG um eine Autoimmunerkrankung handelt, die gegen den Azetylcholinrezeptor an der neuromuskulären Endplatte des Muskels gerichtet ist (Lindstrom *et al.*, 1988). Durch die Übertragbarkeit des Krankheitsbildes auf Tiere mit Hilfe von Patientenserum konnte insbesondere die zentrale Rolle der Autoantikörper bei der Auslösung der Symptome nachgewiesen werden (Toyka *et al.*, 1975; Toyka *et al.*, 1977).

Die Autoantikörperproduktion bei der MG ist ein T-Zell-abhängiger Prozeß (Hohlfeld *et al.*, 1986), der zu einer polyklonalen humoralen Immunreaktion führt (Tesch *et al.*, 1989), welche sich überwiegend gegen die „Main Immunogenic Region“ (MIR) richtet, einem Epitop der  $\alpha$ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors (DeBeats and Vincent, 1993). Die Antikörper führen a) über die Blockierung des Ionenkanals bzw. der Azetylcholinbindungsstelle des Rezeptors (Lang *et al.*, 1988), b) die Vernetzung und anschließende Internalisierung der Antikörper/Antigen-Komplexe (Drachman *et al.*, 1978) und c) durch eine Antikörpervermittelte Komplementaktivierung zu einer Reduktion funktioneller Rezeptoren auf der Muskelmembran (Engel *et al.*, 1977). Diese elektrophysiologischen Veränderungen führen zur Muskelschwäche und können durch die Gabe von Azetylcholinesterasehemmern vermindert werden.

Bei fast allen Myasthenie-Patienten (90%) treten Thymusveränderungen auf, wobei die Art der Veränderungen mit klinischen, epidemiologischen und genetischen Befunden assoziiert ist. Es werden folgende Thymusveränderungen unterschieden:

- 1) Atrophie: Rückbildung des Thymus
- 2) Thymitis: entzündlich veränderter Thymus
- 3) Thymom: epithelialer Thymustumor.

Die Charakteristika der drei verschiedenen Gruppen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 1: Assoziation zwischen Thymusveränderungen und MG**

Thymusver- änderung	Häufigkeit inner- halb der MG Pati- enten [%]	Geschlecht/Alter	Assoziation mit MHC- Allel	Literatur
Atrophie	10-20%	Überwiegend Männer, >40 Jahre	HLA-A3 HLA-B7	1, 7
Thymitis	Ca. 70 %	Überwiegend Frauen, bis 40 Jahre	HLA-DR3 HLA-B8	1, 2, 3,4
Thymom	Ca. 10 %	Ohne Geschlechts- prävalenz, 30 bis 70 Jahre	Keine ein- deutige Kor- relation	5, 6, 7

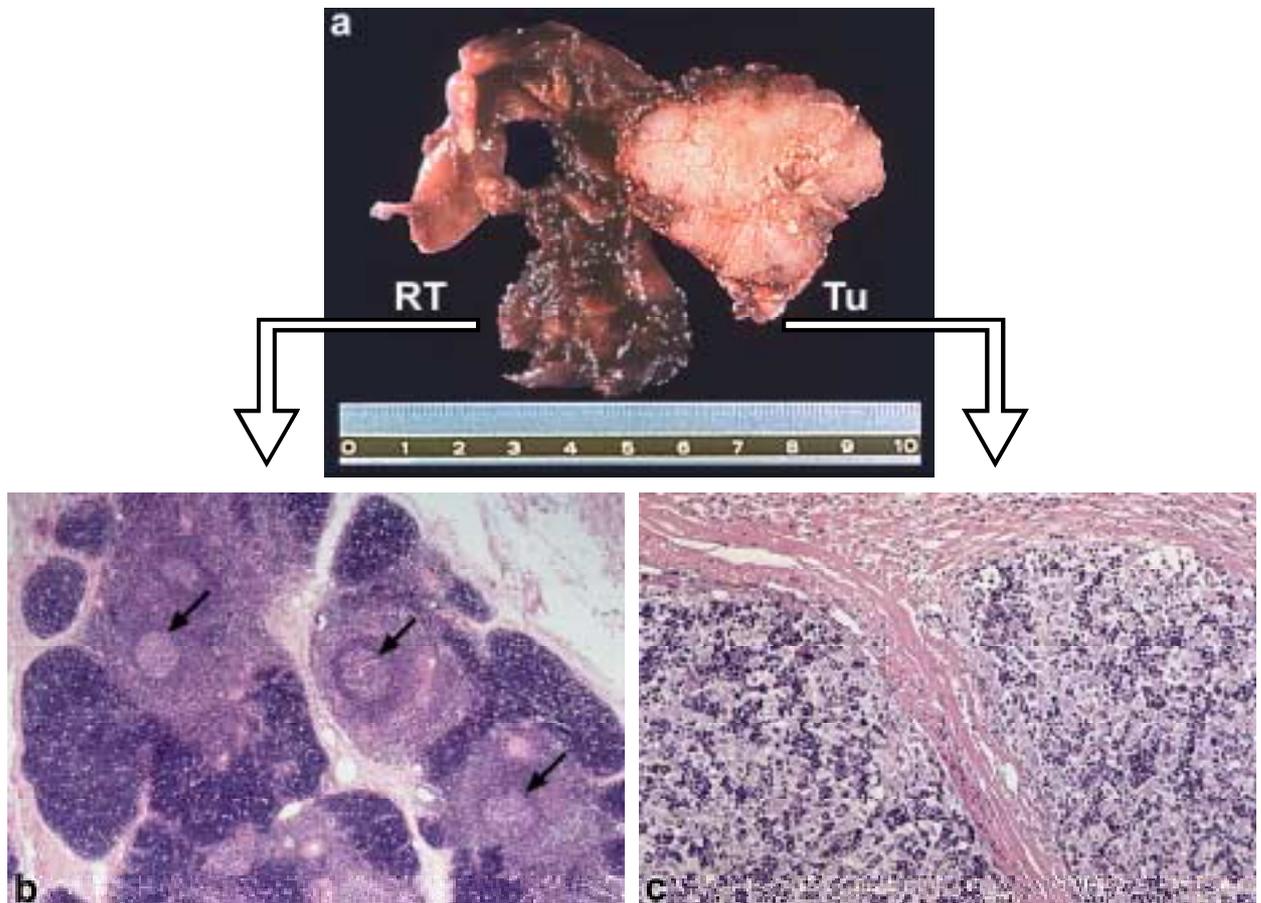
1: (Levine and Rosai, 1978); 2: (Müller-Hermelink *et al.*, 1993); 3: (Müller-Hermelink, 1986); 4: (Carlsson *et al.*, 1990); 5: (Thomas *et al.*, 1999); 6: (Müller-Hermelink and Marx, 2000); 7:(Machens *et al.*, 1999).

Patienten mit einer Thymusatrophie profitieren von einer Thymektomie hinsichtlich der Verbesserung der Myasthenie-Symptome nicht oder nur langsam. Im Gegensatz dazu führt die Thymektomie bei Thymitisfällen oft und rasch zu einer deutlichen Verbesserung der Autoimmunphänomene, einschließlich der klinischen Symptome. Bei Thymompatienten führt die Tumorentfernung unter Einschluß des Restthymus unmittelbar postoperativ meist zu einer Verschlechterung der klinischen MG-Symptome, die sich höchstens langfristig und in einer Minderheit der Fälle leichtgradig bessern können (Vincent and Willcox, 1999).

## 2.4 Thymome

Thymome sind epitheliale Tumoren des Thymus (Rosai and Sobin, 1999). Diese Definition unterscheidet Thymome von thymischen Lymphomen sowie neuroendokrinen Tumoren und Keimzellneoplasien des Thymus. Der Begriff „Thymom“ impliziert, daß die neoplastischen Zellen morphologische Eigenschaften normaler thymischer Epithelzellen zeigen (Müller-Hermelink and Marx, 2000). Für die in dieser Arbeit vorgestellten Analysen besonders wich-

tig war die Tatsache, daß in der unmittelbaren Nachbarschaft von Thymomen häufig Restthymusgewebe erhalten ist. Die folgende Abb. 2 zeigt ein Thymom mit Restthymus nach der Tumorresektion:



**Abb. 2: Thymom- und Restthymusgewebe nach der Tumorresektion.** Es handelt sich um ein Thymom vom kortikalen Typ eines Patienten mit MG. (a) Typische anatomische Situation der hier untersuchten Fälle von MG-assoziierten Thymomen mit Vorkommen von Restthymusgewebe (RT) in unmittelbarer Nachbarschaft des Tumors (Tu). (b) Für eine paraneoplastische MG charakteristische lymphofollikuläre Thymitis mit aktivierten Follikeln (→) in der Thymusmedulla. (Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, 40-fache Vergrößerung). (c) Charakteristische Histologie eines kortikalen Thymoms mit läppchenartigem Aufbau und hohem Gehalt interepithelialer Lymphozyten. (HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit erfolgte die Einteilung der Thymome nach der Klassifikation von Müller-Hermelink (Müller-Hermelink *et al.*, 1986) bzw. der neuen WHO-Klassifikation (Müller-Hermelink and Marx, 2000; Rosai and Sobin, 1999). Der Zusammenhang zwischen den beiden Klassifikationen ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 2: Vergleich der neuen WHO-Klassifikation und der Einteilung nach Müller-Hermelink (Müller-Hermelink and Marx, 2000).**

<b>WHO Typ</b>	<b>Histogenetische Einteilung thymischer epithelialer Tumoren</b> (nach Müller-Hermelink)	<b>Klinisch-Pathologische Einteilung</b>
A	Medulläres Thymom	Gutartiges Thymom 1
AB	Gemischtes Thymom	
B1	Prädominant kortikales Thymom	Maligne Thymome, Kategorie I
B2	Kortikales Thymom	
B3	Gut ausdifferenziertes thymisches Karzinom	
C	Epidermoid keratinisierendes Karzinom Epidermatoid nicht-keratinisierendes Karzinom Lymphoepitheliom-ähnliches Karzinom Sarcomatoides Karzinom u. a.	Maligne Thymome, Kategorie II

Nach der histogenetischen Einteilung werden medulläre (WHO-Typ A) und gemischte (WHO-Typ AB) Thymome und die verschiedenen Subtypen des kortikalen Thymoms (WHO-Typen B1, B2, B3) als *organotypische* (Thymus-ähnliche) Thymome den *nicht-organotypischen* thymischen Karzinomen (WHO-Typ C) gegenübergestellt (Müller-Hermelink and Marx, 2000).

Thymome aus der Gruppe der organotypischen Tumoren zeigen trotz der Neoplasie noch grundlegende Eigenschaften des Thymus und waren deshalb Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 2.4.1 Mikromilieu in Thymomen

Thymome weisen bezüglich der Zusammensetzung der Zellpopulationen und ihres Mikromilieus Unterschiede zum nicht-neoplastischen Thymus auf. In Thymomen lassen sich z.B. weniger B-Zellen detektieren als im normalen Thymus (Fend *et al.*, 1993). Die Thymozytenreife in Thymomen ist quantitativ gestört in dem Sinne, daß anteilig mehr unreife Stadien und weniger reife CD4<sup>+</sup> T-Zellen gebildet werden als in einem normalen Thymus (Nenninger *et al.*, 1998). Außerdem ist die MHC II-Expression der Epithelzellen in Thymomen im Vergleich zum nicht-neoplastischen Thymus erniedrigt (Chilosi *et al.*, 1986; Ströbel *et al.*, 2000; van der Kwast *et al.*, 1985). Die Ursache dieses Befundes ist bislang ungeklärt, aber mögli-

cherweise auf eine verminderte Produktion von IFN- $\gamma$  in den Thymomen zurückzuführen (A. Marx, persönliche Mitteilung). Das Mikromilieu in Thymomen ist von wesentlicher Bedeutung, da es die T-Zell-Reifung entscheidend beeinflusst und somit auch die Bildung autoreaktiver T-Zellen verursachen kann. Außerdem wird das Wachstum der neoplastisch veränderten Epithelzellen in Thymomen durch Mikromilieu-faktoren mitbestimmt.

Um Faktoren, die das Mikromilieu in Thymomen prägen, zu ermitteln, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine RNA-Expressionsanalyse für Thymome vergleichend mit entsprechendem Restthymusgewebe durchgeführt. Insbesondere interessierten dabei Gene für Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Apoptosefaktoren.

Des Weiteren wurde das Chemokinprofil in Thymomen untersucht. Chemokine beeinflussen Immunantworten und entzündliche Prozesse durch Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten und durch Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen, welche an der Leukozytenmigration beteiligt sind (Baggiolini *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1998; Rollins, 1997). Chemokine könnten deshalb eine Ursache für die unterschiedliche Zellzusammensetzung bzw. das veränderte Mikromilieu in Thymomen darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Expression solcher Chemokine untersucht, die für die B-Zell-Migration wesentlich sind (BLC), deren Expression durch IFN- $\gamma$  induzierbar ist oder die als Thymus-spezifisch gelten. Dabei wurden verschiedene Thymom- bzw. Thymusgewebe vergleichend untersucht. Die hier analysierten Chemokine und die ihnen zugeschriebenen Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

**Tabelle 3: Mittels RT-PCR untersuchte Chemokine**

<b>Chemokin (Abk.)</b>	<b>Ausführliche Bezeichnung</b>	<b>Zielzelle/Funktion (nach (Zlotnik <i>et al.</i>, 1999))</b>
BCA-1/BLC	B cell attracting chemokine B-lymphocyte chemoattractant	Migration rezirkulierender B-Zellen
TECK	Thymus-expressed chemokine	wirkt chemotaktisch auf Thymozyten; wird im Thymus von Thymusepithel- zellen exprimiert
MDC	Macrophage-derived chemokine	wirkt chemotaktisch auf Monozyten, IL-2 aktivierte NK-Zellen, aktivierte T-Zellen; höchste Expression im Thymus
I-TAC	Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant	wirkt chemotaktisch auf aktivierte T- Zellen; konstitutiv exprimiert u.a. im Thymus, in der Milz, in der Plazenta; erhöhte Expression nach Stimulation mit IFN- $\gamma$
MIG	Monokine induced by interferon $\gamma$	wirkt chemotaktisch auf aktivierte T- Zellen; konstitutive Expression in Thymus und Milz; Expression indu- zierbar durch IFN- $\gamma$ ; produziert von aktivierten Makrophagen

## 2.5 Modellvorstellungen zur Entstehung der Myasthenia gravis

Aufgrund der unterschiedlichen Thymusbefunde und der verschiedenen Auswirkungen der Thymektomie auf die MG wurden für die Thymitis-assoziierte und die paraneoplastische MG unterschiedliche Modelle zur Krankheitsentstehung entwickelt.

### 2.5.1 Pathogenese der Myasthenia gravis bei Thymitis

Bei der Thymitis im Rahmen der Myasthenia gravis scheint die Autoimmunität das Ergebnis einer klassischen „Antigen-getriebenen“ Immunreaktion zu sein. Das intakte Autoantigen, der

Azetylcholinrezeptor, wird im hyperplastischen Thymus von sogenannten Myoidzellen exprimiert (Marx *et al.*, 1997; Wekerle *et al.*, 1978). Autoantigen-spezifische T- und B-Zellen (Vincent and Willcox, 1999) sowie Antigen-präsentierende Zellen (Dendritische Zellen) (Kirchner *et al.*, 1988a) kommen im Thymus von MG Patienten vor. Die Autoantikörper sind überwiegend gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des AChR gerichtet (Vincent and Willcox, 1999). Die Verbesserung des Gesundheitszustandes nach der Thymektomie spricht ebenfalls für eine zentrale Rolle der Thymitis bei der Aufrechterhaltung der Immunreaktionen. Wie es zur Entstehung einer Thymitis im nicht-neoplastischen Thymus kommt, ist bisher völlig unklar.

### **2.5.2 Pathogenese der Myasthenia gravis bei epithelialen Thymustumoren**

Unter den soliden humanen Neoplasien sind die Thymome diejenigen mit der höchsten Frequenz von paraneoplastischen Autoimmunerkrankungen, von denen die Myasthenia gravis die häufigste ist (Müller-Hermelink and Marx, 2000). Autoantikörper von Thymompatienten mit MG sind hauptsächlich gegen Antigene des Skelettmuskels und des Nervensystems gerichtet (Vincent *et al.*, 1998a). Praktisch alle Thymompatienten mit MG besitzen Autoantikörper gegen den AChR, wobei die Mehrzahl an die immundominante  $\alpha$ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors zu binden scheint (Vincent *et al.*, 2000). Es konnten jedoch auch Antikörper gegen die Untereinheiten beta, gamma bzw. delta bei Thymompatienten mit MG detektiert werden (Jacobson *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 1987).

Während bei der Thymitis Autoantikörper überwiegend im Thymus produziert werden, findet innerhalb von Thymomen von MG-Patienten eine Produktion von Autoantikörpern nicht statt. Außerdem führt die Entfernung eines Thymoms (anders als die Thymektomie bei Thymitispatienten) nur selten zu einer Verbesserung der Autoimmunität. Diese Befunde haben dazu geführt, daß eine allgemein akzeptierte Hypothese für den Zusammenhang zwischen der Autoimmunität und dem Thymom bisher nicht aufzustellen war (Vincent and Willcox, 1999).

Das Hauptautoantigen bei der MG, der Azetylcholinrezeptor (AChR), ist in der Regel nicht komplett innerhalb des neoplastischen thymischen Milieus zu finden (Andreetta *et al.*, 1997; Wilisch *et al.*, 1999). Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der AChR-Expression und der MG bisher nicht ermittelt werden (Kornstein *et al.*, 1995). Jedoch wurde die Expression anderer Autoantigene, welche Epitope des Hauptantigens enthalten und die deshalb möglicherweise mit der Pathogenese der MG im Zusammenhang stehen, im neoplastischen Epithel nachgewiesen. Ein Beispiel dafür ist das Protein p153, welches mittels des gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des humanen Azetylcholinrezeptors gerichteten Antikörpers mAK 155 in Thymomen detektiert wurde. Dieses Protein wird in kortikalen Thymomen überexprimiert (Marx

*et al.*, 1990). Außerdem wurde die Expression des Neurofilamentproteins mittleren Molekulargewichtes (NF-M) im neoplastischen thymischen Epithel nachgewiesen (Marx *et al.*, 1996). Ob es sich bei diesen beiden Proteinen um dasselbe Molekül handelt und ob ein Zusammenhang zwischen der Expression und der assoziierten MG besteht, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Kortikale und gemischte Thymome sind außerdem die einzigen bekannten menschlichen Tumoren, welche die Fähigkeit besitzen, reife T-Zellen zu generieren (Takeuchi *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu findet in medullären Thymomen nur eine sehr geringe intratumoröse T-Zell-Reifung statt (Müller-Hermelink and Marx, 1999).

Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß die intratumoröse T-Zell-Reifung in Thymomen abnormal ist, in dem Sinne, daß der Anteil reifer naiver (CD45RA+) T-Zellen im Thymom im Vergleich zum Normalthymus erniedrigt ist (Nenninger *et al.*, 1998). Außerdem zeigen reife intratumoröse T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen aus dem nicht-neoplastischen Thymus häufig ein erhöhtes Autoantigen-spezifisches Potential gegenüber Fragmenten des Azetylcholinrezeptors (Nenninger *et al.*, 1998; Sommer *et al.*, 1990).

Basierend auf diesen Beobachtungen, wurde die Arbeitshypothese erstellt, daß Thymome Autoantigen-spezifische T-Zellen mittels abnormer positiver oder negativer T-Zell-Selektion erzeugen (Marx and Müller-Hermelink, 1999; Vincent and Willcox, 1999). Da offensichtlich keine Interaktion zwischen Autoantigen-spezifischen T-Zellen und Autoantikörperproduzierenden B-Zellen innerhalb der Thymome vorkommt (Newsom-Davis *et al.*, 1987), impliziert diese Hypothese, daß Autoantigen-spezifische T-Zellen das Thymom verlassen müssen, um pathogenetisch relevant zu werden (Müller-Hermelink and Marx, 2000). Dabei ist es jedoch schwierig zu unterscheiden, ob reife naive T-Zellen im Blut aus dem Thymom stammen, da der verbliebene normale Restthymus neben dem Thymom ebenfalls reife T-Zellen in die Peripherie entläßt (Douek *et al.*, 1998). Bisher wurden Fragen zum T-Zell-Export aus Thymomen nur in wenigen „unkonventionellen“ Fällen untersucht, für die charakteristisch war, daß eine Blut-Lymphozytose nach der Resektion des Thymoms verschwand (Zusammenstellung der Fälle siehe (de Jong *et al.*, 1997)). Jedoch ist nicht bekannt, ob diese Fälle für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten „konventionellen“ Thymome repräsentativ sind. Die Analyse „konventioneller“ Thymome im Hinblick auf den T-Zell-Export stellte daher eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit dar.

## 2.6 Aufgabenstellung

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, pathogenetische Mechanismen für die häufige Assoziation zwischen Thymomen und Autoimmunerkrankungen, insbesondere der *Myasthenia gravis*, aufzuklären. Speziell sollte die Hypothese überprüft werden, ob die in Thymomem stattfindende abnorme T-Zell-Reifung das periphere T-Zell-Repertoire beeinflusst und dessen Autoantigen-spezifisches Potential vergrößert.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die T-Zell-Reifung und -Funktion sowie die abnorme Expression von Antigenen innerhalb von Thymomen gelegt. Dabei sollte vor allem im Hinblick auf die unterschiedlichen MG-Pathogenesemodelle der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich Thymome von nicht-neoplastischen Thymi unterscheiden bzw. ob sich Unterschiede zwischen MG-assoziierten und nicht-assoziierten Thymomen erkennen lassen.

Zunächst sollten für die paraneoplastische MG charakteristische Autoantigene ermittelt werden. Dazu wurde untersucht, ob es sich bei den beiden im neoplastischen thymischen Epithel exprimierten Proteinen p153 und NF-M um dasselbe Molekül handelt. Außerdem sollte analysiert werden, ob NF-M-spezifische T-Zellen bei MG-Patienten vorkommen und ob es einen Unterschied gibt zwischen Thymitispatienten und Thymompatienten mit bzw. ohne MG. Nachdem ein Zusammenhang zwischen NF-M-spezifischen T-Zellen und paraneoplastischer MG hergestellt werden konnte, wurden weitere Fragmente des NF-M-Proteins und außerdem der Delta-Untereinheit des AChR rekombinant hergestellt und in T-Zell-Proliferationsassays getestet. Da Thymompatienten mit assoziierter MG im Gegensatz zu Thymitispatienten eine heterogene autoreaktive B-Zell-Antwort zeigen, sollte mittels dieser Untersuchungen analysiert werden, ob sich diese Heterogenität auch für autoreaktive T-Zellen von Thymompatienten nachweisen läßt.

Um ein breites Spektrum immunologisch relevanter Faktoren auf molekularer Ebene vergleichend zwischen neoplastischem und nicht-neoplastischem Thymus zu ermitteln, sollten außerdem RNA-Expressionsanalysen durchgeführt werden. Hierzu wurde mRNA aus dem Thymomgewebe und dem Restthymusgewebe desselben Patienten durch Hybridisierung kommerziell erhältlicher Arrays verglichen. Hauptziel dieser Analyse sollten Faktoren mit möglichen Auswirkungen auf die intratumoröse Thymopoese sein.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern Thymome Einfluß auf das extrathymische Immunsystem nehmen. Zunächst sollte untersucht werden, ob „konventionelle“ Thymome reife Autoantigen-spezifische T-Zellen in die Peripherie entlas-

sen. Hierzu wurden zunächst FACS-Analysen durchgeführt, mit deren Hilfe zirkulierende naive (CD45RA+) T-Zellen und deren Subpopulationen quantifiziert werden konnten. Um eventuelle Veränderungen in den T-Zell-Populationen nach der Tumorresektion zu ermitteln, wurden außerdem FACS-Untersuchungen im Blut von Patienten nach der Thymektomie durchgeführt. Funktionelle Analysen sollten zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen Autoantigen-spezifischen T-Zell-Antworten im Thymom bzw. Blut desselben Patienten besteht.

Schließlich sollten weitere funktionelle Untersuchungen und die Analyse der Chemokinexpression in Thymomen und nicht-neoplastischen Thymi klären, ob die immunologisch relevante Rezirkulation von T-Zellen in Thymome bei MG Patienten gestört ist. Außerdem sollte untersucht werden, ob die geringe Anzahl an B-Zellen in Thymomen auf eine verminderte Migration reifer B-Zellen aus der Peripherie zurückgeführt werden kann.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Arbeitsgeräte und Hilfsmittel

Elektrophorese-Apparatur GNA100, GNA200, Powersupply EPS 200 und GPS200/400 Blotapparatur Novablot von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Powersupply Power Pac 200 von Bio-Rad (München). Minigel-Twin von Biometra (Göttingen). PCR-Maschine Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer (Weiterstadt). Zentrifugen von Eppendorf (Hamburg), Heraeus (Hanau), Beckman (München). Mikroskope von Zeiss (Jena). Photometer von Kontron. FACScan<sup>®</sup> (488 nm, Argonlaser) und dazugehörige Software LYSIS II von Becton Dickinson (Heidelberg). Videoauswerteeinheit von MWG (Ebersberg). UV-Schirm UVT 20M/W von Herolab.

Protan/Nitrozellulose-Transfermembran von Schleicher und Schuell (Dassel). BiomaxMR von Kodak (New England). 3MM Chromatographiepapier von Whatman (Madstone, England). GenElute<sup>™</sup> Minus EtBR von Supelco (Bellefonte, USA). Spritzen und Kanülen von Becton Dickinson (Heidelberg). Insulinspritzen Omnicon<sup>®</sup> 80 von Braun (Melsungen).

#### 3.1.2 Chemikalien

Acrylamid/Methylenbisacrylamid (Gel 30) von Roth (Karlsruhe). Agarose von Biozym (Oldendorf). DMEM (Dulbecco's modified Eagles' Medium) von GIBCO BRL (Eggenstein). DMSO (steril) von Sigma (Deisenhofen). Ficoll von Linaris (Bettingen am Main). FCS von Linaris (Bettingen am Main). Glutamin von Biochrom (Berlin). Größenstandard für DNA-Agarosegele: 123 bp Leiter von GIBCO BRL (Eggenstein). Größenstandard für Proteingele: vorgefärbter low bzw. high range Marker von Bio-Rad (München). MBP (human) von Dr. Gold, Neurologische Klinik (Würzburg). MOPS von Sigma (Deisenhofen). Penicillin/Streptomycin von GIBCO BRL (Eggenstein). RPMI 1640 von PAA (Martinsried). Sephadex<sup>™</sup> G-50 DNA fine Grade von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Tetanus Toxoid von Behring Institut (Marburg). Trypsin/EDTA von PAA (Martinsried).

Die radioaktiv markierten Moleküle [ $P^{32}$ ]-dCTP und [ $^3H$ ]-Thymidin wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Alle weiteren Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) eingesetzt.

### 3.1.3 Häufig-verwendete Puffer und Lösungen

Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Bradford-Reagenz (Bio-Rad)	100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 30 mg SDS, 50 ml 96 % Ethanol, ad 200 ml H <sub>2</sub> O
BSA	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC auf 1 l H <sub>2</sub> O, ÜN schütteln, autoklavieren
DNA-Auftragspuffer	je eine Spatelspitze Bromphenol-Blau, Xylencyanol, 8 ml Glycerin, 2 ml 0.5 M EDTA
Ethidiumbromid	40 mg/ml in H <sub>2</sub> O, 40 ml ad 2 l 0.5 x TBE
FACS-Puffer	1 x PBS mit 0.01 % NaN <sub>3</sub> (w/v), Lösung durch 0.1 µm Nitrozel- lulosemembran filtriert
FACS-Färbepuffer	FACS-Puffer mit 0.5 % BSA
Ionomycin	0.5 mg/ml
low TE	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA
10 x MOPS	400 mM MOPS, 1mM NaAcetat, 100 mM EDTA
PBS	8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0.2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> gelöst in H <sub>2</sub> O
RNase A	20 mg/ml, thermostabile RNAsen 30 min kochen
RNA-Auftragspuffer (nativ)	50 % Sucrose, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 0.5 M Borsäure
RNA-Auftragspuffer (denaturierend)	10 µl MOPS (10 x), 10 µl Formaldehyd, 50 µl Formamid, 10 µl nativer Auftragspuffer, 1 µl Ethidiumbromid
5 x TBE	270 g Tris, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, 137.5 g Borsäure, H <sub>2</sub> O ad 5l
TPA	1 mg/ml in Ethanol (96 %)
Trypanblau	5 g/l Trypanblau, 9 g/l NaCl gelöst in H <sub>2</sub> O

### 3.1.4 Enzyme und Antikörper

#### Enzyme:

Ligase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach

---

RNAse A	Roche, Mannheim
RNAse-freie DNase I	Roche, Mannheim
Superscript TM II (reverse Transkriptase)	GIBCO BRL, Eggenstein
Taq-Polymerase	GIBCO BRL, Eggenstein

Antikörper für den Western-Blot:

mAk139	Dr. S. Tzartos, Athen, Griechenland
mAk 155	Dr. S. Tzartos, Athen, Griechenland
mAk NN18	Sigma, Deisenhofen
mAK BF10	Boehringer, Mannheim
anti-GST	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kaninchen-anti-Ziege-Serum (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma, Deisenhofen

Antikörper für die FACS-Analyse:

anti-CD1a-PE	Dako, Hamburg
anti-CD3-PE	Dako, Hamburg
anti-CD3-Tricolor	Medac, Hamburg
anti-CD4-FITC	Dako, Hamburg
anti-CD8-PE	Dako, Hamburg
anti-CD45RA-FITC/PE	Dianova, Hamburg
anti-CD45RO-FITC/PE	Dianova, Hamburg
anti-CD69-FITC/PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotypkontrollen	Medac, Hamburg; Sigma, Deisenhofen

Antikörper für die Immunhistochemie:

anti-CD22 (Maus-anti-Mensch, Verdünnung 1:200) von Dako, Hamburg

### **3.1.5 Plasmide und Oligonukleotide**

Der Expressionsvektor pGex-5X-2 wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Alle Oligonukleotide wurden in Auftragssynthese von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt (Sequenzen siehe Anhang 6.1).

### 3.1.6 Bakterienstämme und Medien

#### Escherichia coli-Stämme:

DH5 $\alpha$	GIBCO BRL, Eggenstein
JM105	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
X90	New England Biolabs, Schwalbach

#### Nährmedien für Bakterien:

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl pH 7.5 (NaOH). Für Platten 15 g/l Agar.
LB <sub>Amp</sub> -Medium	LB-Medium mit 100 $\mu$ g/l Ampicillin
SOB-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O, Autoklavieren, Zugabe von je 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> , 1 M MgSO <sub>4</sub>
SOC-Medium	2 ml sterilfiltrierte 20 % (w/v) Glucose ad 100 ml SOB-Medium

### 3.1.7 Eukaryontische Zellen und Medien

#### Primärzellen:

Periphere Blutlymphozyten (PBL)  
Lymphozyten aus Thymus-/Thymomgewebe  
Tonsillenzellen

#### Zell-Linien:

IMR 32	Neuroblastom, human (Tumilowicz <i>et al.</i> , 1970)
TE671	Rhabdomyosarkom, human (Schoepfer <i>et al.</i> , 1988)

#### Nährmedien für eukaryontische Zellen:

RPMI<sub>kompl</sub> = RPMI 1640 + 2 mM Glutamin + 100 IU/ml Penicillin + 100 IU/ml Streptomycin  
Für die Kultur primärer Suspensionszellen wurde RPMI<sub>kompl</sub> mit 3 % HP oder 5-10 % FCS angereichert.

Die Kultivierung der Zelllinien IMR 32 und TE671 fand in DMEM + 10 % FCS statt.

### 3.1.8 Patienten und Gewebe

Eine Zusammenfassung der klinischen Daten der Patienten ist aus den Tabellen im Anhang ersichtlich (siehe 6.3). Nicht alle Patienten, Zellen bzw. Gewebe sind in jede Untersuchung

eingegangen. Die genaue Anzahl der untersuchten Fälle ist in den Bildunterschriften bzw. in den entsprechenden Tabellen im Anhang angegeben.

Die Diagnose der MG beruhte auf klinischen Befunden, Elektromyographie bzw. auf der Detektion von anti-AChR-Autoantikörpern [Müller-Hermelink, in press #885]. Die Thymome wurden entsprechend der WHO-Klassifikation (Rosai and Sobin, 1999) in WHO Typ AB (gemischt) bzw. WHO Typ B2 (cortikal) eingeteilt. Blutproben der Patienten wurden zum Zeitpunkt der Thymektomie bzw. 3 bis 66 Monate später entnommen. Als Kontrolle diente Blut von gesunden Personen und Zellen von Thymitispatienten bzw. Patienten mit einem medullären Thymom (WHO Typ A). Die absolute Zellzahl der PBL pro ml Blut (siehe 3.2.3.6) konnte für 75 % der Patienten, für die FACS-Analysen durchgeführt wurden (siehe Abb. 20; Abb. 21), ermittelt werden.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Kultivierung prokaryontischer Zellen**

##### **3.2.1.1.1 Fest- und Flüssigkultur von Bakterienstämmen**

Für die Festkultur wurde mit einer ausgeglühten Impföse aus einem gefrorenen Bakterienglycerolstock etwas Zellmaterial entnommen und mit einem Dreiösenausstrich auf eine LB-Platte überimpft. Die Platte wurde über Nacht (ÜN) bei 37 °C bebrütet.

Für eine 250 ml ÜN-Suspensionskultur von Bakterien wurde mit einer ausgeglühten Impföse eine einzelne Kolonie von einer Platte in LB-Medium überführt. Für eine 3 ml-ÜN-Kultur einer Minipräparation von Plasmid-DNA wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher überimpft. Die Suspensionskulturen wurden ÜN bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

##### **3.2.1.1.2 Dauerkultur von Bakterien**

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden 800 µl einer ÜN-Kultur mit 200 µl einer sterilen 50%-igen Glycerinlösung gemischt und bei -80 °C gelagert.

##### **3.2.1.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien**

Bakterien aus einer Glycerin-Dauerkultur wurden auf eine SOB-Agar-Platte ausgestrichen und ÜN bei 37 °C bebrütet. 500 µl SOB-Medium wurden mit einer Kolonie dieser Platte an-

geimpft und bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt bis die Zellsuspension eine OD<sub>550</sub> von 0.5 aufwies. Die Bakterien wurden in sterile Zentrifugenbecher überführt und 30 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden bei 4 °C abzentrifugiert (15 min, 2.500 rpm, Zentrifuge J2-HS, Beckmann, Palo Alto, USA), das Zellpellet in 20 ml eiskalter Lösung RF1 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer 9-minütigen Zentrifugation bei 2.500 rpm und 4 °C wurde das Pellet in 3.5 ml Lösung RF2 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden zu 225 µl im Trockeneis/Ethanolbad aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C als Glycerinstock.

#### Lösung RF1

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
30 mM	KAc
10 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
15 %	(w/v) Glycerol
Mit 0.2 M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen, sterilfiltrieren.	

#### Lösung RF2

10 mM	RbCl
10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
15 %	(w/v) Glycerol
Mit 0.2 M NaOH auf pH 6.8 einstellen, sterilfiltrieren.	

### 3.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*

Die zu transformierenden Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der DNA vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 min bei 42 °C erwärmt. Danach wurde sofort das zwei- bis dreifache Volumen an LB-Medium dazugegeben und die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Suspension wurde auf LB<sub>AMP</sub>-Platten ausgestrichen und ÜN bei 37 °C bebrütet.

### 3.2.1.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine Maxipräparation mittels des Endofree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt.

<b>Pufferbezeichnung</b>	<b>Funktion</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
Puffer 1	Resuspension	50 mM Tris/HCl pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer 2	Lyse	200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer 3	Neutralisation	3.0 M Na-Acetat pH 5.5
Puffer QBT	Äquilibrierung	750 mM NaCl 50 mM MOPS pH 7.0 15 % Isopropanol 0.15 % Triton <sup>®</sup> X-100
Puffer QC	Waschen	1.0 M NaCl 50 mM MOPS pH 7.0 15 % Isopropanol
Puffer QF	Elution 1	1.25 M NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8.5 15 % Isopropanol
Puffer QN	Elution 2	1.6 M NaCl 50 mM MOPS pH 7.0 15 % Isopropanol
STE		100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl pH 8.0 1mM EDTA

Aus einer Bakterienkolonie wurde eine 5 ml LB<sub>Amp</sub>-Tagkultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Mit der Tagkultur wurde dann eine 100 ml ÜN-Kultur angeimpft und ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde am nächsten Morgen bei 5.000 x g pelletiert und das Pellet in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Zu der Lösung wurden dann 10 ml Puffer 2 bei RT vorsichtig dazugegeben, einige Male behutsam invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 10 ml eiskalter Puffer 3 zupipetiert, die Lösung vorsichtig gemischt und sofort auf die mitgelieferte, unten verschlossene Filterspritze gegeben. Die Lösung wurde 10 min bei RT inkubiert und dann durch die Spritze filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde mit 2.5 ml EndoFree-Puffer versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Während der Inkubationszeit

wurde die DNA-Aufreinigungssäule mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Danach wurde die gekühlte DNA-Lösung über die Säule gegeben. Das Prinzip der Säule bestand darin, daß die DNA am Säulenmaterial gebunden wurde und die restlichen Bestandteile der Lösung ungehindert die Säule passierten. Die Säule wurde daraufhin 2 x mit Puffer QC gewaschen und dann die DNA mit 15 ml Puffer QN wieder eluiert. Gefällt wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol bei RT und einer anschließenden Zentrifugation von 30 min bei 15.000 x g und 4 °C. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und 10 min luftgetrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die Plasmid-DNA in unterschiedlichen Volumina low TE aufgenommen und resuspendiert.

### 3.2.1.4 DNA-Fällung

DNA wurde je nach Bedarf an Qualität oder Quantität nach drei unterschiedlichen Methoden gefällt. Sollte die DNA möglichst rein sein und einen geringen Anteil an einwertigen Salzen aufweisen, so wurde mit dem doppelten Volumen 96 % Ethanol bei -20 °C 30 min gefällt. Wurde mehr Wert auf Quantität als auf Qualität bei der DNA-Fällung gelegt, so erfolgte eine Isopropanolfällung (1/10 Volumen 5M Na-Acetat + 1 Volumen Isopropanol, 30 min, -20 °C). Bei beiden Fällungen wurde anschließend 30 min bei 15.800 x g bei RT zentrifugiert. Als dritte Methode für die DNA-Fällung wurde die Ammoniumacetatfällung angewendet. Hierbei wurde die DNA-haltige Lösung mit 1 Volumen NH<sub>4</sub>-Acetat (4°C) + 2 Volumen 96 % Ethanol (RT) versetzt und sofort 30 min bei max. Geschwindigkeit in einer Eppifuge zentrifugiert.

Das DNA-Pellet wurde je nach Anwendung in sterilem H<sub>2</sub>O oder low TE gelöst.

### 3.2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Extinktion der DNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g DNA/ml}$$

### 3.2.1.6 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

<b>GET</b> 50 mM Glucose 10 mM EDTA pH 8.0 25 mM Tris/HCl pH 8.0	<b>LYSE</b> 0.2 M NaOH 1 % SDS
	<b>KaliumAcetat</b> 3 M Kalium 5 M Acetat pH 4.8

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 1.5 ml aus einer 3 ml ÜN-Kultur entnommen und bei 5.000 x g 5 min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl GET aufgenommen und mit dem Vortexer resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 µl Lysispuffer, die erhaltene Lösung wurde 5 x invertiert und für 5 min auf Eis gestellt. Nach Beendigung der Inkubation wurden 150 µl 3 M KaliumAcetat-Lösung hinzugegeben, die Lösung vorsichtig gemischt und nochmals 5 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 15.800 x g. Der erhaltene Überstand wurde in ein frisches Cap überführt. Durch Zugabe von 700 µl 96 % Ethanol und 5 min Zentrifugation bei 15.800 x g wurde die Plasmid-DNA bei RT gefällt. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 65 °C im Thermoblock getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl low TE mit 20 µg/ml RNase gelöst.

### 3.2.1.7 Restriktionsverdau

Der Erfolg einer Klonierung wurde zunächst durch einen Restriktionsverdau überprüft.

Für einen Verdau von Plasmid-DNA aus einer Minipräparation wurden 3 µl eines 30 µl Ansatzes verwendet. Folgender Standardansatz wurde je Restriktionsverdau pipettiert:

3 µl	Plasmid-DNA
1 µl	10-fach Puffer des entsprechenden Enzyms
1 Unit	Restriktionsenzym
ad 10 µl H <sub>2</sub> O	

Der Restriktionsverdau erfolgte 1.5 h bei 37 °C im Wasserbad. Für den Verdau von PCR-Produkten wurde ein vergleichbarer Ansatz pipettiert und dieser ÜN bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.1.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese

DNA-Fragmente >80 bp wurden über ein Agarosegel aufgetrennt. Standardmäßig erfolgte die Auftrennung über ein 2%iges Agarosegel. Die DNA wurde 1:10 mit DNA-Auftragspuffer gemischt und 5-10 µl aufs Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0.5 x TBE mit 0.8 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 2 h bei 120 V. Der Gellauf wurde über eine Videoauswerteeinheit der Firma MWG (Ebersberg) dokumentiert.

### 3.2.1.9 Cyclesequencing von DNA und Auswertung über ABI373

Für die Sequenzierreaktion wurde der ABI PRISM<sup>™</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer (Weiterstadt) verwendet. Folgender Ansatz wurde standardmäßig pipettiert:

2 µl	Plasmid-DNA aus Minipräparation oder PCR-Fragment
5 µl	Sequenzier-Master-Mix
1 µl	3.2 pmol Primer
ad 20 µl H <sub>2</sub> O	

Der Reaktionsansatz durchlief folgende Reaktionszyklen in der PCR-Maschine Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer (Weiterstadt): (96 °C, 10 sec / X °C, 5 sec/ 60 °C, 4 min) x 25; 4 °C ∞, wobei X der Annealing-Temperatur für den jeweiligen Sequenzierprimer entsprach (maximal 60 °C).

Der Sequenzieransatz wurde danach über eine Sephadex G50 Säule in einer gelben Eppendorfspitze aufgereinigt und aus dem Eluat die amplifizierte DNA mit 2 µl 3 M NaAcetat-Lösung, pH 4.6 und 50 µl 96 % Ethanol 10 min auf Eis gefällt. Die DNA wurde bei 15.800 x g 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und bei 65 °C im Thermoblock getrocknet.

Die DNA wurde zum Auftragen auf das Sequenziergel in 3 µl Auftragspuffer für Sequenziergele (denaturierend) (Formamid und 50 mM EDTA, pH 8.0, Verhältnis 5:1) gelöst und 2 min bei 90 °C inkubiert. Bis zum Laden des Gels wurde die denaturierte Probe bei 4 °C gelagert.

### **3.2.1.10 RNA-Isolation aus gefrorenem Gewebe (Chomczynski and Sacchi, 1987)**

Gefriermaterial wurde am Kryostaten in 5 µm dicke Schnitte geraspelt. Für eine RNA-Präparation wurden 80 bis 100 Schnitte verwendet. Diese wurden in 1 ml TRIZOL<sup>®</sup> (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und auf Eis gestellt. Zur Homogenisierung des Gewebes wurde mit unterschiedlich starken Kanülen und einer 1 ml-Spritze geschert. Das Gewebe mußte nach Beendigung so homogen sein, daß es problemlos durch eine Insulinkanüle aufgezogen werden konnte. Nach der Homogenisierung wurden die Proben entweder bei -80 °C gelagert oder sofort zur RNA-Isolierung verwendet.

Für die RNA-Präparation wurde jeder Ansatz zunächst mit 1.25 µl einer Glykogenlösung (20 mg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und bei RT 2-3 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe 30 s gevortext. Daraufhin wurde bei 4 °C und 10.000 x g 15 min zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Cap überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte 10 min bei RT und einer anschließenden Zentrifugation wie im vorherigen Isolationsschritt beschrieben.

Das RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und im Heizblock bei 65 °C 10 min getrocknet. Die RNA wurde je nach Größe des Pellets in 20-40 µl DEPC-Wasser aufgenommen, 10 min bei 65 °C inkubiert und 30 s gevortext. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

#### **3.2.1.11 RNA-Isolation aus Zellen**

Zur Präparation von RNA aus Suspensionszellen oder Zelllinien wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Der Puffer wurde bis kurz über das Pellet abgesaugt und die Zellen in dem verbleibenden Volumen resuspendiert.  $1 - 2 \times 10^7$  Zellen wurden dann in 1 ml TRIZOL® (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und gevortext. Danach wurde die Probe direkt durch eine Insulinspritze gezogen. Die weiteren Isolationsschritte erfolgten wie unter 3.2.1.10 beschrieben.

#### **3.2.1.12 Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die RNA-Konzentration wurde über die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm mit folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g RNA/ml}$$

#### **3.2.1.13 RNA-Gel**

Für ein RNA-Gel mit einem Volumen von 50 ml wurden 0.75 g Agarose in 36.3 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht und der Volumenverlust nach dem Aufkochen mit DEPC-H<sub>2</sub>O ausgeglichen. Der flüssigen Agarose wurden daraufhin noch 8.7 ml Formaldehyd (37%) und 5 ml MOPS-Puffer (10x), RNase-frei zugesetzt.

Von der zu analysierenden RNA-Probe wurden 2 µl mit jeweils 8 µl RNA-Auftragspuffer (denaturierend) vermischt, 15 min auf 65 °C erhitzt, danach kurz auf Eis gestellt und dann auf das Gel aufgetragen. Der Laufpuffer bestand aus 1 x MOPS-Puffer.

#### **3.2.1.14 DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA**

Um eine Kontamination der RNA durch mitisolierte DNA auszuschließen, wurde die frisch präparierte Gesamt-RNA mit einer RNase-freien DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim) behandelt.

**ANSATZ**

16.5 µl	Gesamt-RNA
2 µl	DNase I-Puffer
1 µl	DNase I
0.5 µl	RNAasin <sup>®</sup> (4.000 U/ml) (Promega/Mannheim)

**DNase I-Puffer (10-fach)**

400 mM	Tris/HCl pH 7.5
100 mM	NaCl
60 mM	MgCl <sub>2</sub>

**Termination-Mix**

0.1 M EDTA pH 8.0
1.0 mg/ml Glycogen

Die Ansätze wurden 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend durch Zugabe von 2 µl Termination-Mix abgestoppt. Die Proben wurden danach mittels einer RNeasy-Säule (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers von dem Enzym gereinigt (Pufferangaben: siehe Hersteller). Hierzu wurde jeder Ansatz mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, mit 350 µl Puffer RLT versetzt und gevortext. Danach wurden 250 µl 96 % Ethanol hinzugefügt, die Proben vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und auf die RNeasy-Säule gegeben. Während der anschließenden Zentrifugation (8.000 x g, 15 sec) wurde die RNA durch das Säulenmaterial gebunden. Die Säule wurde 2 x mit 500 µl Puffer RPE und einer nachfolgenden Zentrifugation bei 8.000 x g, 15 sec gewaschen. Beim letzten Waschschrift erfolgte eine 2 minütige Zentrifugation bei 8.000 x g, um die Säule zu trocknen. Die Elution der RNA von der Säule erfolgte durch Zugabe von 30 µl H<sub>2</sub>O und zentrifugieren bei 8.000 x g für 1 min. Die Aufbewahrung der gereinigten RNA erfolgte bei -80 °C.

**3.2.1.15 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Enzyms Superscript II und dem mitgelieferten Puffer bzw. 100 mM DTT von GIBCO BRL, Eggenstein.

Die RNA wurde aufgetaut und 10 min bei 65 °C inkubiert und gevortext. Für eine cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz pipettiert:

5 µg	Gesamt-RNA
0.5 µl	oligo dT <sub>15</sub> (1µg/µl)
1 µl	RNAasin <sup>®</sup> (4.000U/ml) (Promega, Mannheim)
ad 12 µl H <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wurde 10 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert und dann auf Eis gestellt. Folgende Chemikalien wurden pro Ansatz dazupipettiert:

4 µl	5x First-Strand-Puffer
2 µl	100 mM DTT
1 µl	10 mM (jedes 10 mM) dNTPs

Die Substanzen wurden gemischt und 2 min bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 0.8 – 1 µl des Enzyms Superscript II. Nach einer 50-minütigen Inkubation bei 42 °C wurde der Ansatz zur Inaktivierung der reversen Polymerase für 15 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.

Die cDNA wurde sofort in einer PCR-Reaktion eingesetzt oder bei –20 °C gelagert.

### 3.2.1.16 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit cDNA als Template

Die PCR-Reaktionen wurden in der PCR-Maschine Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer, Weiterstadt durchgeführt.

#### **Ansatz**

1-2 µl	cDNA
2.5 µl	10 x PCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>
1-3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
0.5 µl	10 mM dNTPs (jedes dNTP 2.5 mM)
0.5 µl	FORWARD-Primer (20 pmol)
0.5 µl	REVERSE-Primer (20 pmol)
0.1 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
ad 25 µl H <sub>2</sub> O	

Die Amplifikationsprodukte wurden zum Schluß auf einem DNA-Agarosegel analysiert (siehe 3.2.1.8). Die genauen Bedingungen für die verschiedenen PCR-Reaktionen sind im Anhang unter 6.2 angegeben.

### 3.2.1.17 Prinzip der Optimierung einer PCR

Bei der Verwendung neuer Primerpaare wurden standardmäßig zu Beginn die Reaktionsbedingungen der PCR optimiert. Die cDNA von isolierten Tonsillenzellen (siehe 3.2.3.4) oder stimulierte PBL (siehe 3.2.3.7) wurden als Template für die Amplifikation eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde, wie unter 3.2.1.16 beschrieben, pipettiert und die  $MgCl_2$ -Endkonzentration von 0.5 mM bis 3.5 mM in 0.5-er Schritten ausgetestet. Die Optimierung der PCR wurde mit einer Annealingtemperatur begonnen, welche 5 °C unter der nach folgender Formel berechneten Primerschmelztemperatur lag:

$$T_M = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Ergab die gewählte Annealingtemperatur kein zufriedenstellendes Ergebnis, so wurde sie teilweise bis zur errechneten Schmelztemperatur der jeweiligen Primer erhöht. Bei schwer zu optimierenden PCR-Reaktionen wurde außerdem mit dem PCR-Optimierungs Kit von Invitrogen (Groningen, Niederlande) gearbeitet, welcher eine Reihe von Puffern mit verschiedenen pH-Werten bzw.  $MgCl_2$ -Konzentrationen enthält.

### 3.2.1.18 GAPDH-PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese

Die Qualität der cDNA wurde über eine GAPDH-spezifische PCR kontrolliert. Folgender Ansatz bzw. PCR-Bedingungen wurden standardmäßig verwendet:

1.0 µl cDNA	94 °C 1 min
2.5 µl 10 x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$	(94 °C 15 s
2.0 µl 25 mM $MgCl_2$	65 °C 15 s            x 25
0.5 µl 10 mM dNTPs (jedes dNTP 2.5 mM)	72 °C 1 min)
0.5 µl GAPDH-FOR (20 pmol)	72 °C 2 min
0.5 µl GAPDH-REV (20 pmol)	4 °C ∞
0.1 µl Taq-Polymerase (5U/µl)	
17.9 µl $H_2O$	

### 3.2.1.19 Quantifizierung der cDNA-Menge anhand einer GAPDH-PCR

Um für nachfolgende semiquantitative PCRs die cDNA-Mengen aufeinander einzustellen, wurden bei der GAPDH-PCR nach 20, 22 und 24 Zyklen jeweils 7 µl des PCR-Ansatzes entnommen und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Bandenintensitäten wurden visuell miteinander verglichen und durch Titration der eingesetzten cDNA-Menge aufeinander abgestimmt.

Die erhaltenen GAPDH-Banden sollten nach erfolgtem Mengenabgleich alle die gleiche Intensität aufweisen.

### 3.2.1.20 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel

#### 3.2.1.20.1 Aufreinigung über GenElute™ Minus EtBr (Supelco, Bellefonte, USA)

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und auf eine Säule, die vorab mit 100 µl low TE äquilibriert worden war, geladen und 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde durch Ammoniumacetatfällung aus dem Eluat gewonnen. Das mit 70 % Ethanol gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 12 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. 2 µl wurden auf einem Gel analysiert und das verbleibende Volumen für eine Ligations- oder Sequenzierreaktion verwendet.

#### 3.2.1.20.2 Aufreinigung mittels Gelase (Biozym, Ohlendorf)

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Gelase (β-Agarase) erfolgte aus einem 2.0-3.5 % LMP-Gel. Hierzu wurde die DNA aus dem Gel geschnitten und das Gelstück gewogen. Pro 10 mg Gel wurden 30 µl 1 x Gelasepuffer zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Der Puffer wurde danach sorgfältig abpipettiert und das Gelstück bei 70 °C 5 min im Thermoblock geschmolzen. Die flüssige LMP-Agarose wurde auf 45 °C abgekühlt und 1 U Gelase/600 mg 1 % LMP-Gel zupipettiert. Die Lösung wurde für 16 h in der PCR-Maschine konstant auf 45 °C gehalten. Anschließend wurde eine Ammoniumacetat-Fällung mit dem aufgereinigten Fragment durchgeführt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 12 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 3.2.1.21 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine „sticky-end“-Ligation wurden der verwendete Vektor und das zu klonierende Fragment mit denselben Restriktionsenzymen verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Die nach der Aufreinigung erhaltenen DNA-Konzentrationen wurden visuell mit Hilfe eines Agarosegels bestimmt. Prinzipiell lag das zu klonierende Fragment mindestens im 10-fachen Überschuß zum Vektor im Ligationsansatz vor.

1 µl Vektor (500 ng/µl)
2 µl 10 x Ligasepuffer
10 µl Fragment (5µg)
1 µl T4-Ligase
6 µl H <sub>2</sub> O

Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Inaktivierung der T4-Ligase wurde die Ligation 10 min auf 65 °C erhitzt.

### 3.2.1.22 Atlas™ Human Cancer cDNA-Expression-Array (Clontech, Heidelberg)

Als Hybridisierungsprobe für die zwei Arrays wurden das Thymomgewebe und der Restthymus von einem Patienten (#6331/97) gewählt, welcher nach immunhistochemischer Analyse in beiden Geweben eine ähnliche Lymphozytenzusammensetzung aufwies.

Zunächst wurde die Gesamt-RNA entsprechend der unter 3.2.1.10 beschriebenen Methode isoliert. Danach erfolgte ein DNase-Verdau der Proben mit anschließender Reinigung mittels RNeasy-Säulen (siehe 3.2.1.14). Die Konzentration der RNA wurde bestimmt und die Qualität auf einem RNA-Gel kontrolliert (3.2.1.12, 3.2.1.13).

Jeweils gleiche RNA-Mengen aus dem Normal- bzw. Tumorgewebe wurden in cDNA umgeschrieben (siehe 3.2.1.15) und anschließend mit Hilfe des Rediprime™ II Kits (random prime labelling system) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) nach dem Protokoll des Herstellers mit P<sup>32</sup> radioaktiv markiert. Hierzu wurden jeweils 1.5 µg cDNA mit TE-Puffer auf ein Volumen von 45 µl aufgefüllt, 5 min auf 95 °C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Die DNA-Lösung wurde nun ins mitgelieferte Probentube gegeben und mit 50 µCi [P<sup>32</sup>]-dCTP versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0.2 M EDTA-Lösung abgestoppt und auf Eis gestellt.

Die Hybridisierung der beiden Arrays erfolgte parallel nach folgendem Schema bei einer Temperatur von 65 °C im Hybridisierungssofen. Die Heringsperm-DNA wurde zunächst 5 min bei 100 °C denaturiert, auf Eis gestellt und dann zur Vorhybridisierungslösung gegeben. Derselbe Vorgang wurde mit der markierten cDNA-Probe durchgeführt.

Arbeitsschritt	Lösung	Zeit
Blocken	2 x SSPE, 1 % SDS	4 h
Vorhybridisierung	5 x SSPE, 5 x Denhardt's, 0.5 % SDS 0.5 ml Heringsperm-DNA (1mg/ml)	1 h
Hybridisierung	Zugabe der markierten Probe zur Vorhybridisierungslösung	ÜN
Waschen	2 x SSPE, 0.1 % SDS	10 min

Die Arrays wurden nach der Hybridisierung für 5 h in eine Kassette gelegt und mittels eines Phosphorimagers ausgewertet.

Zur nochmaligen Hybridisierung wurden die Arrays „gestrippt“ Hierzu wurden die Membranen für 10 min in 0.5 % SDS gekocht, abgekühlt, in Frischhaltefolie gewickelt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**20 x SSPE**

3.6 M NaCl  
0.2 M Natriumphosphat  
0.02 MEDTA pH 7.7

**100 x Denhardt's Lösung:**

2 % (w/v) BSA  
2 % (w/v) Ficoll<sup>TM</sup>  
2 % (w/v) Polyvinylpyrolidon

## 3.2.2 Proteinchemische Methoden

### 3.2.2.1 Isolation von Zytoskelettproteinen

Gefriermaterial von Thymomgewebe wurde am Kryostaten in  $10\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte geraspelt und in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Für die Extraktion von Zytoskelettproteinen wurden 100 Schnitte benötigt. Alle nachfolgenden Präparationsschritte fanden auf Eis bzw. mit vorgekühlten Lösungen und Arbeitsgeräten statt. Zu den Gewebeschnitten wurde zunächst eiskalter TNM, versetzt mit den Proteaseinhibitoren PMSF (1mM) und Leupeptin (20  $\mu\text{g/ml}$ ), gegeben und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $480 \times g$  5 min zentrifugiert, um lösliche Proteine zu entfernen. Für die Tritonextraktion wurde das Pellet entsprechend der Größe in 1-3 ml eiskaltem Puffer TNM mit 1 % Triton X-100 und den im vorherigen Schritt beschriebenen Proteaseinhibitoren aufgenommen und in einen Homogenisator überführt. Die Extraktion erfolgte 5 min auf Eis durch Auf- und Abbewegen bzw. Drehen des Stößels. Das Homogenisat wurde auf zwei Eppendorf-Caps verteilt und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und max. Umdrehung 20 min pelletiert. Der Überstand enthielt die Detergenz-löslichen Proteine und wurde verworfen.

Das Pellet mit den Zytoskelettproteinen wurde nun in 2 x Probenpuffer (siehe 3.2.2.4) 1:1 verdünnt mit TNM bei RT resuspendiert, durch eine Insulinspritze geschert, 5 min auf  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt und 1 min bei 10.000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Zytoskelettproteine und wurde direkt auf einem 7.5 % Proteingel (3.2.2.4) aufgetrennt oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**TNM-Puffer**

10 mM Tris/HCl pH 7.6  
140 mM NaCl  
5 mM  $\text{MgCl}_2$

### 3.2.2.2 Expression rekombinanter Proteine

Zur Proteinexpression wurde das „GST Gene Fusion System“ von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Die rekombinanten Fusionsproteine, bestehend aus GST (Glutathion-S-Transferase) und dem gewünschten Protein, wurden nach Angaben des Herstellers exprimiert. Eine ÜN-Kultur wurde 1:20 mit LB<sub>Amp</sub>-Medium verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Erreichte die Bakteriensuspension eine optische Dichte zwischen 0.5 und 0.7 bei einer Wellenlänge von 550 nm, so wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach 60 min wurden die Zellen geerntet (10 min, 4 °C, 4.000 rpm, Zentrifuge J2-HS, Beckmann, Palo, Alto, USA), das Pellet in gekühltem Lysepuffer resuspendiert (1/20 des Volumens der Expressionskultur) und die Bakterien durch Sonifikation im Eisbad aufgeschlossen.

Die *löslichen Proteine* wurden im „Batch“-Verfahren aufgereinigt. Hierzu wurde die Suspension nach der Sonifikation erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4.000 rpm) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Glutathionbeads (1/200 des Volumens der Expressionskultur) wurden 30 min im 10-fachen Volumen PBS inkubiert, 3 x mit PBS gewaschen und zu dem Überstand gegeben. Die Suspension wurde bei leichtem Rotieren 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Beads 4x mit eisgekühltem RPMI-Medium gewaschen.

#### Lysepuffer

1 % (v/v)	Triton X-100
100 mM	EDTA
1 mM	Dithiothreitol
0.5 mM	PMSF
0.5 µg/ml	Leupeptin
2.0 µg/ml	Aprotinin

*Nichtlösliche Proteine* (Proteine  $\alpha$ AChR (1-150) bzw.  $\alpha$ AChR (140-216)) wurden nach der Induktion der Proteinexpression und Sonifikation der Bakterien aus der unlöslichen Fraktion des Bakterienlysates isoliert. Hierzu wurde nach der Zentrifugation (s.o.) das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Proteinprobenpuffer (siehe 3.2.2.4) aufgenommen. Nach 10-minütigem Erhitzen auf 95 °C wurden die nichtlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand auf ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel (siehe 3.2.2.4) aufgetragen. Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel zunächst 30 min in 1 M KCL gefärbt. Das gewünschte Protein wurde anhand des Molekulargewichtes identifiziert, als Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch gegeben. Die Elektroelution erfolgte ÜN bei 5 mA (Laufpuffer 0.5 x PEP, siehe 3.2.2.4). Die proteinhaltige Lösung wurde an-

schließend aus dem Dialyseschlauch pipettiert und mindestens 48 Stunden bei mehrmaligem Pufferwechsel gegen PBS dialysiert.

Die Reinheit der Präparation wurde mittels Gelelektrophorese (siehe 3.2.2.4) überprüft und mittels Western Blot-Analyse (siehe 3.2.2.5) identifiziert.

### 3.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit einem auf der Methode von Bradford beruhenden Reagenz von Bio-Rad, München. Mit verschiedenen Konzentrationen an BSA wurde eine Standardkurve zur Proteinbestimmung ermittelt. Dafür wurden 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µg BSA mit 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 verdünnt in PBS) versetzt und die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert, welcher nur Bradford-Reagenz enthielt, gemessen. Jede Probe wurde in zwei Verdünnungen als Doppelbestimmung ebenfalls mit 1 ml des Reagenzes versetzt. Anhand der ermittelten Extinktion konnte aus der Standardgeraden die Proteinkonzentration ermittelt werden.

### 3.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurde zunächst ein 7.5, 10 oder 12.5 %-iges Trenngel gegossen und dieses mit Isopropanol beschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Alkohol abgewaschen und das Trenngel mit dem 5 %-igen Sammelgel überschichtet.

Pipettierschema: (Trenngel jeweils 10 ml, Sammelgel 5 ml)

Lösung	Trenngel 7.5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12.5%	Sammelgel 5%
H <sub>2</sub> O	3.55 ml	2.75 ml	2.05 ml	3.45 ml
30 % AAM	2.5 ml	3.3 ml	4 ml	830 µl
1 M Tris pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	
1 M Tris pH 6.8				620 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl	5 µl

Die zu analysierenden Proben wurden jeweils 1:1 mit 2x Proteinprobenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und dann auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienten 10 µl eines

vorgefärbten low oder high range Proteinstandards (BIO-RAD, München). Die Elektrophorese erfolgte 1 h bei 30 mA. Als Laufpuffer diente 1 x PEP. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel zunächst für 2-3 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert, danach für einige Minuten bis zur Entfärbung des Hintergrunds in erwärmter Entfärbelösung geschwenkt. Für den Western Blot wurde das Gel direkt nach der Gelelektrophorese ungefärbt eingesetzt.

**10 x PEP (Laufpuffer)**

50 mM Tris/HCL pH 8.3  
500 mM Glycin  
1 % SDS

**Coomassie-Färbelösung**

0.05 % (w/v) Coomassie brilliant blue  
50 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure

**2 x Proteinprobenpuffer**

0.1 M Tris/HCl pH 6.8  
200 mM  $\beta$ -ME  
4 % SDS  
0.2 % Bromphenolblau  
20 % Glycerin

**Entfärbelösung**

100 ml Essigsäure  
100 ml Isopropanol  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

### 3.2.2.5 Western Blot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mit Hilfe eines semi-dry Elektroblots. Der Blotaufbau von der Anode zur Kathode war wie folgt: 3 Bögen 3MM-Papier, eine Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel, wiederum drei Bögen 3MM-Papier. Alle Bestandteile wurden vor dem Zusammenbau zunächst in Transferpuffer getränkt. Der Blot erfolgte 1.5 h bei 100 mA.

Zur immunologischen Detektion wurde der Blot wie folgt weiterbehandelt:

Arbeitsschritt	Lösung	Zeit
Blocken	3 % BSA in PBS	1 h
Inkubation mit Erstantikörper	verdünnt in Waschpuffer + 1 % BSA	2 h
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min
Detektion mit Zweitantikörper	verdünnt in Waschpuffer + 1 % BSA	1 h
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min
Entwicklung	2 ml Chloronaphtol (3 mg/ml in Methanol) + 8 ml PBS + 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	abhängig von der Färbintensität

**Transfer-Puffer**  
48 mM Tris/HCl pH 8.0  
93 mM Glycin  
0.037 % SDS  
20 % Methanol  
H<sub>2</sub>O ad 1l

**Waschpuffer**  
1 x PBS  
0.1 % Tween 20

Alternativ erfolgte eine Entwicklung mittels des ECL-Systems (Verstärkte Chemilumineszenz, Kit von Pierce, Illinois, USA). Dazu wurden die beiden Lösungen ECL1 und ECL2 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1 min auf den Blot gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Entwicklungsreagenz mit Zellstoff abgesaugt und ein Filmstreifen für 30 s bis zu 10 min aufgelegt und danach entwickelt.

### 3.2.2.6 Peptid-Spotting

Um die Bindungsstelle des monoklonalen AK 155 auf dem Protein NF-M zu lokalisieren, wurde ein Peptid-Epitop-Mapping mit sich überlappenden Peptiden durchgeführt, welche die Aminosäuren 557-736 des NF-M-Proteins überspannten. Die einzelnen Peptide wurden direkt auf einem Blatt Zellulose durch Auftropfen der einzelnen Aminosäuren synthetisiert (Frank, 1992). Jedes der 173 synthetisierten Peptide war 12 Aminosäuren lang und hatte mit dem darauffolgenden 11 Aminosäuren gemeinsam. Das Zelluloseblatt wurde zunächst mit dem mAK 155 (unverdünnter Zellkulturüberstand) inkubiert und anschließend mit einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 (Kaninchen-anti-Ratte-Serum, Dako, Hamburg) detektiert. Das hoch-affine Epitop des mAK 155 konnte durch die dunkel gefärbten Punkte auf dem Zellulose-Blatt identifiziert werden.

### 3.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 Einfrieren von eukaryontischen Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden in RPMI<sub>kompl</sub> + 5 % FCS aufgenommen und auf Eis gestellt. Parallel dazu wurde das Einfriermedium aufgetaut und ebenfalls vorgekühlt. Die gekühlte Zellsuspension wurde 1:1 mit dem Einfriermedium gemischt und in 2 ml Kryoröhrchen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach zwei bis drei Wochen wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

**Einfriermedium:** 80 % FCS + 20 % DMSO

#### 3.2.3.2 Auftauen von eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension mit 10 ml PBS versetzt und 5 min bei  $480 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium aufgenommen.

#### 3.2.3.3 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurden 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 90  $\mu\text{l}$  Trypanblau gemischt und in die Neubauerzählkammer pipettiert. Es wurde die durchschnittliche Lebendzellzahl pro einem Großquadrat bestimmt und mit  $10^4$  (Umrechnungsfaktor vom Volumen der Zählkammer pro Großquadrat (0.1  $\mu\text{l}$ ) auf 1 ml Suspensionsvolumen) sowie mit dem Verdünnungsfaktor  $10^1$  multipliziert. Der erhaltene Wert stellte die Anzahl an Zellen/ml dar.

#### 3.2.3.4 Isolation von Lymphozyten aus Frischgewebe

Thymus- und Thymomgewebe bzw. Tonsille wurden sorgfältig von kontaminierendem Blut und Häutchen befreit, in kleine Stücke geschnitten und mit Hilfe des Stempels einer Spritze durch ein Stahlsieb gedrückt. Die Zellsuspension wurde durch eine Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation aufgereinigt. Dazu wurden 15 ml Ficoll (RT) in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und mit maximal dem doppelten Volumen einer Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Der Gradient wurde 20 min bei RT und  $451 \times g$  ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen waren als trüber Ring sichtbar. Die Zellen wurden abpipettiert, zweimal in PBS gewaschen (10 min,  $480 \times g$ ) und in RPMI<sub>kompl</sub> + 3 % HP (siehe 3.2.3.5) des jeweiligen Patienten aufgenommen. Die frisch isolierten Suspensionszellen wurden entweder eingefroren (3.2.3.1) oder für T-Zell-Proliferations-Assays (3.2.3.9) bzw. FACS-Analysen (3.2.3.10) verwendet.

### 3.2.3.5 Gewinnung von Primärzellen aus Vollblut mittels Ficollgradient

Die Aufreinigung von Lymphozyten (PBL) aus Vollblut erfolgte mit LeucoSep® von Greiner (Deutschland). Hierfür wurden 15 ml Ficoll (RT) in ein 50 ml LeucoSep®-Röhrchen gegeben und 1 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Draufhin wurden 15-30 ml heparinisiertes Vollblut in das Röhrchen pipettiert und 15 min bei 800 x g bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ergab sich folgende Schichtung im Reaktionsgefäß von oben nach unten: Plasma – Lymphozyten – Ficoll- Filterscheibe - Ficoll-Erythrozyten/tote Zellen. Das Humanplasma (HP) wurde abpipettiert, auf Eis gestellt und später als Medienzusatz für die Suspensionszellen verwendet. Der Lymphozytenring wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und 1x mit PBS und anschließend 1x mit RPMI 1640 gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 480 x g).

### 3.2.3.6 Bestimmung der absoluten Zellzahl der PBL im Blut

Die Anzahl der PBL, welche nach der Zell-Isolierung aus dem Blut (siehe 3.2.3.5) bestimmt worden war, wurde durch das Volumen (ml) des entnommenen Blutes dividiert. Diese Berechnung ergab die absolute Anzahl PBL/ml Blut des Patienten.

### 3.2.3.7 Stimulation von PBL mit Ionomycin und TPA

Die Stimulation von peripheren Blutzellen erfolgte in RPMI<sub>kompl</sub> + 5 % FCS versetzt mit 500 ng/ml Ionomycin und 10 ng/ml TPA für 6h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3.8 Kultivierung der Zell-Linien

Die adhärenenten Zelllinien IMR 32 und TE671 wurden nach dem Auftauen in eine Kulturflasche mit DMEM + 10 % FCS überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. War die Zellkulturflasche konfluent mit den Zellen bewachsen, so wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS ohne zweiwertige Ionen gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von DMEM + 10 % FCS wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 480 x g), in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf zwei Kulturflaschen verteilt.

### 3.2.3.9 T-Zell-Proliferationstest

Die aus Blut isolierten PBL wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro well (200 µl) in 96-well-Rundbodenplatten ausgesät. Je  $5 \times 10^4$  der aus dem Thymus- bzw. Tumorgewebe isolierten Suspensionszellen wurden für den Test zusammen mit  $5 \times 10^4$  bestrahlten (5.000 rad) autologen PBL als antigenpräsentierende Zellen pro well eingesetzt. Als Medium wurde RPMI<sub>kompl</sub> + 3 % autologem HP verwendet. Zur Stimulation der Zellen wurden rekombinante

Autoantigene in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten ein Ansatz ohne Antigen, ein Ansatz mit 5 µg/ml GST (Fusionspartner der rekombinanten Proteine) und ein Ansatz mit humanem MBP (5 µg/ml). Als Positivkontrolle wurde zur polyklonalen Stimulation 0.1 % PHA verwendet. Tetanus Toxoid (TT) wurde als Kontrolle für ein Fremd-Antigen mit einer Konzentration von 10 U/ml eingesetzt. Für die rekombinanten Fusionsproteine wurden jeweils 6 wells pro Antigen, für die Kontrollen jeweils nur 3 wells, pipettiert. Der Proliferationstest wurde 3 Tage im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Zur Messung der Zellproliferation wurden die Zellen mit 0.5 µCi/well [<sup>3</sup>H]-Thymidin in RPMI<sub>kompl</sub> für 16 h ÜN inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Versuchsansatz bei -20 °C tiefgefroren. Die Auswertung konnte dann unabhängig vom Test erfolgen. Dazu wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut, geerntet (Betaplate<sup>TM</sup> 96-well Harvester, Pharmacia, Freiburg) und die vorhandene Radioaktivität gemessen (Betaplate<sup>TM</sup> Counter, Pharmacia, Freiburg). Die Proliferationsrate wurde als Stimulationsindex (SI) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{SI} = \text{Proliferation in Anwesenheit des Antigens [cpm]} / \text{Proliferation der Kontrolle [cpm]}$$

Als Kontrolle diente die Proliferation in Anwesenheit von GST für die rekombinanten Antigene und die Medienkontrolle für TT und PHA.

### 3.2.3.10 FACS-Analyse

Zur direkten Färbung von Oberflächenmolekülen wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und die entsprechenden direkt-fluoreszenzmarkierten Antikörper, in einer für jeden Antikörper speziell ermittelten Vor-Verdünnung, in einem Volumen von 10 µl hinzugegeben. Die Zellen mit den Antikörpern wurden auf Eis im Dunkeln für mindestens 20 min inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch einen Waschschritt entfernt. Dazu wurden 2 ml FACS-Puffer zu jedem Ansatz pipettiert, gevortext und für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 500 µl FACS-Färbepuffer aufgenommen. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Zellen mit den Isotypen der verwendeten Antikörper gefärbt.

Analysiert wurden die gefärbten Zellen mit Hilfe eines FACScan<sup>®</sup> (Argonlaser, 488 nm, Becton Dickinson, Heidelberg) und der dazugehörigen Software LYSIS II (Becton Dickinson). Die prozentualen Anteile der verschiedenen T-Zell-Populationen wurden jeweils auf die CD3<sup>+</sup>-Zellen bezogen. Der Anteil der Monozyten (CD4<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) innerhalb dieser CD3<sup>+</sup> Zellen war stets kleiner als 1.5 %.

### **3.2.3.11 Immunhistochemische Färbung**

Für die immunhistochemische Färbung von Thymus- bzw. Thymomgewebe wurde ein frischer oder bereits tiefgefrorener Kryoschnitt 10 min in Aceton fixiert und danach für 15 min bei RT getrocknet. Der Objektträger wurde daraufhin 3 x mit Tris/HCl pH 7.4 gewaschen und anschließend überschüssige Flüssigkeit abgetrocknet. 100 µl des gegen ein bestimmtes humanes Antigen gerichteten Maus-Primärantikörpers wurden in der entsprechenden Verdünnung in PBS mit 0.5 % BSA aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle erfolgte parallel die Inkubation eines entsprechenden Serienschnittes mit dem Isotyp des Primärantikörpers. Es wurde 3 x gewaschen und getrocknet. Danach wurde der Schnitt mit 100 µl des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers (Kaninchen-anti-Maus) 1:50 verdünnt in PBS + 30 % HP inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte eine Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper wiederum für 30 min. Für die nachfolgende DAB-Färbereaktion wurde der Schnitt zunächst in PBS gestellt und anschließend für 10 min in 100 µl der Färbelösung (10 ml PBS, 1 Spatelspitze DAB, 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert. Der Schnitt wurde in PBS zurückgestellt und mit PBS abgespült. Mit Hämalaun erfolgte nun eine Gegenfärbung zur Sichtbarmachung der Zellkerne und anschließend wurden die Schnitte eingedeckt.

### **3.2.4 Statistische Auswertung der Daten**

Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem Man Whitney U-Test für unabhängige Datenreihen und mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Datenreihen geprüft. Zur Ermittlung einer Korrelation wurde der Spearman-Test verwendet. Die Signifikanzanalysen wurden mit dem Computerprogramm „SPSS für Windows“ (Version 9.0) durchgeführt.

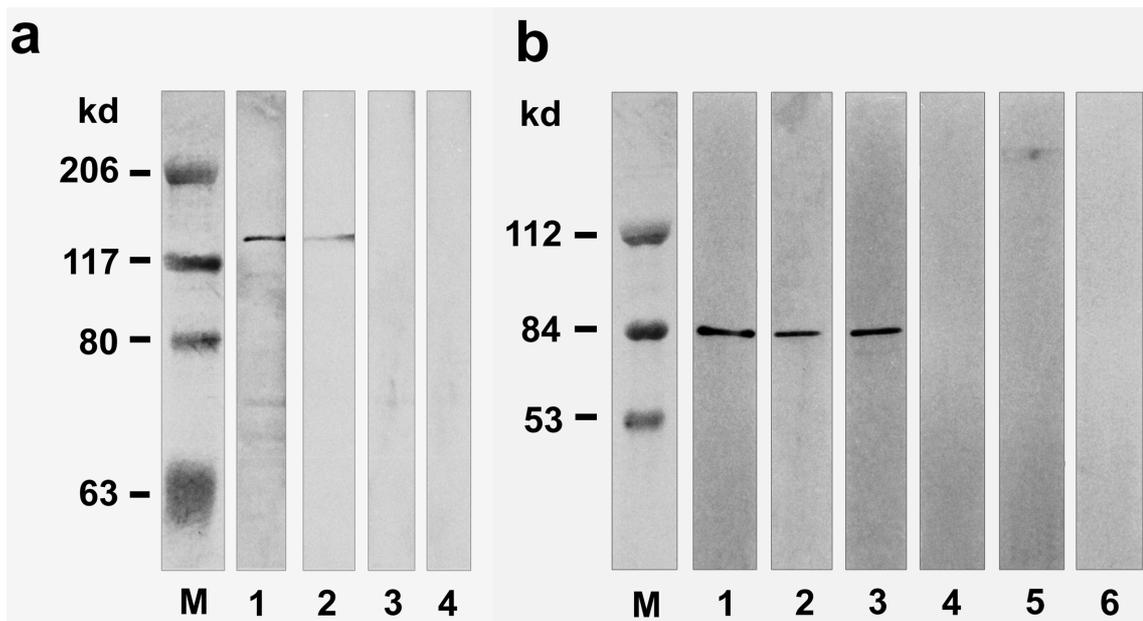
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Identifizierung intratumoröser Autoantigene und ihr Einfluß auf die Thymopoese in Thymomen

#### 4.1.1 Identifizierung des Proteins p153

In MG-assoziierten kortikalen Thymomen wurde die abnorme intraepitheliale Expression eines Proteins, welches ein AChR-ähnliches Epitop enthält, beschrieben (Marx *et al.*, 1990). Für das Protein wurde ein Molekulargewicht von 153 kd ermittelt und es wurde deshalb als p153 bezeichnet. Außerdem wurde eine abnorme Expression des Neurofilamentproteins mittleren Molekulargewichts (NF-M) in Thymomen beschrieben (Marx *et al.*, 1996).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte als erstes untersucht werden, ob es sich bei p153 und NF-M um identische Proteine handelt. Dazu wurden Zytoskelett-Extrakte eines kortikalen Thymoms (Fall #2682/96) und das rekombinante NF-M-Fragment 459-737 (NF-M-B) im Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte mit dem mAk NN18, welcher an das humane NF-M-Protein bindet und dem mAk 155, welcher die zytoplasmatische Region der  $\alpha$ -Untereinheit des humanen Azetylcholinrezeptors erkennt und mit dem Protein p153 kreuzreagiert. Als Positivkontrolle wurde das rekombinante Protein außerdem mit einem anti-GST-Serum inkubiert. Wie aus Abb. 3a ersichtlich, erkannte im Zytoskelett-Extrakt eines kortikalen Thymoms sowohl der anti-Azetylcholinrezeptor mAk 155 als auch mAk NN18 ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 153 kd. Beide Antikörper banden auch an das rekombinante NF-M-Fragment (Abb. 3b). Da das rekombinante NF-M-Protein als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein exprimiert wurde, wurde es auch durch das polyklonale anti-GST-Serum (Abb. 3b, Spur 3) erkannt. Das Ergebnis dieser Immunodetektion ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß es sich bei dem Protein p153 um das Neurofilament-Protein NF-M handelt.



**Abb. 3: Western Blot-Analyse.** Der Zytoskelett-Extrakt eines kortikalen Thymoms (a) und das rekombinante Fusionsprotein GST-NF-M-B (459-737) (b) wurden über eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern mAk 155 (jeweils Spur 1) und mAk NN18 (jeweils Spur 2). NF-M-B wurde zusätzlich mit einem polyklonalen anti-GST-Serum gefärbt (Spur 3 (b)). Die Spuren 3+4 unter (a) bzw. 4-6 unter (b) sind die jeweiligen Kontrollen ohne den ersten Antikörper. M: Molekulargewichtsmarker.

Um die Bindungsstelle des kreuzreagierenden mAk 155 auf dem NF-M-Protein genau zu bestimmen, wurde ein Peptid Epitop Mapping (siehe 3.2.2.6) durchgeführt. Dazu wurde eine kontinuierliche Serie sich überlappender synthetischer NF-M-Peptide von Aminosäure 557 bis 736 untersucht (Abb. 4b). Das hochaffine Epitop KSPVEEK wurde durch die Inkubation der Peptide mit dem Antikörper mAk 155 als Bindungsstelle identifiziert (Abb. 4b). Die Antikörperbindungsstelle trat fünfmal innerhalb der Aminosäuren 619 bis 676 auf (Abb. 4a, c). Zum Vergleich ist die Bindungsstelle des mAk 155 an die zytoplasmatische Region der  $\alpha$ -Untereinheit des humanen Azetylcholinrezeptors angegeben. Durch die eindeutige Bestimmung der Antikörperbindungsstelle des mAk 155 an NF-M konnte die Identifizierung des Proteins p153 als NF-M bestätigt werden.



## 4.1.2 Expression bisher nicht verfügbarer rekombinanter Proteine

Die Expression des NF-M-Proteins in Thymomen könnte einen Einfluß auf das autoreaktive T-Zell-Repertoire der Patienten haben. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten T-Zell-Proliferationstests mit verschiedenen rekombinanten Fragmenten des NF-M-Proteins durchgeführt werden. Nachdem das rekombinante Fragment NF-M(459-737) (NF-M-B), welches die Bindungsstelle des Antikörpers mAK 155 enthält, bereits durch A. Schultz zur Verfügung stand (Schultz, 1997), wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zusätzlich die Bereiche NF-M-A (1-465) und NF-M-C (736-916) kloniert und exprimiert.

Außerdem wurde erstmals das Fragment  $\delta$ AChR(313-450) der  $\delta$ -Untereinheit kloniert und exprimiert, welches die zytoplasmatische Region dieser AChR-Untereinheit überspannt. Hintergrund dieser Untersuchungen war die Beobachtung, daß von zahlreichen in der Immunhistochemie eingesetzten anti-AChR-Antikörpern außer dem mAK 155 gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des AChR nur noch der mAK 139 mit Thymomepithel reagierte (A. Marx, persönliche Mitteilung). Bekannt ist vom mAK 139, daß er an die Aminosäuresequenz 374-385 der  $\delta$ -Untereinheit des AChR bindet (Loutrari *et al.*, 1997; Tzartos and Lindstrom, 1980). Der mAK 139 wurde analog zum mAK 155 durch Immunisierung von Ratten mit denaturierten *Torpedo* AChR gewonnen.

Als Kontrolle wurde das Fragment  $\delta$ AChR(430-496) kloniert, welches die 4. Transmembrandomäne und den C-Terminus dieser Untereinheit enthält und keine Bindungsstelle für den mAK 139 aufweist.

### 4.1.2.1 Konstruktion der Expressionsklone

Die Fragmente des Neurofilament-Proteins mittleren Molekulargewichtes (NF-M) und der  $\delta$ -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors ( $\delta$ AChR) wurden mit Hilfe eines bakteriellen Expressionssystems (Vektor pGex-5X-2, siehe Abb. 7) als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine translatiert. Als Quelle für die codierende Sequenz der beiden Proteine diente cDNA, welche mittels einer PCR amplifiziert wurde. Die bei dieser PCR verwendeten Primer (NFMA-FOR/REV, NFMC-FOR/REV, DELTA4-FOR/REV, DELTA5-FOR/REV, Sequenzen siehe unter 6.1) waren so konstruiert, daß sie zunächst die Schnittstelle eines Restriktionsenzym gefolgt von 15-20 Basen der Sequenz für das entsprechende Protein enthielten. Nach einem Verdau des PCR-Produktes bzw. des Vektors mit den passenden Restriktionsendonukleasen (3.2.1.7) wurden Vektor und PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mittels GenElute<sup>TM</sup> Minus EtBr aufgereinigt

(3.2.1.20.1). Anschließend erfolgte eine „sticky-end“-Ligation (3.2.1.21) und die Amplifikation in *E. coli* (Stamm DH5 $\alpha$ ). Die Klone wurden zunächst mittels eines Restriktionsverdau überprüft und danach durchsequenziert. Die richtigen Klone wurden zur Expression in einen anderen *E. coli* Stamm (X90) transformiert.

Nach erfolgter Expression dienten die aufgereinigten Proteine (3.2.2.2) als Autoantigene für die Stimulation von T-Zellen (3.2.3.9). Zusätzlich wurden die bereits vorliegenden Klone pGex- $\alpha$ (1-150), pGex- $\alpha$ (140-216), pGex- $\alpha$ (301-398) und pGex-NF-M(459-737) (NF-M-B) exprimiert (Schultz, 1997).

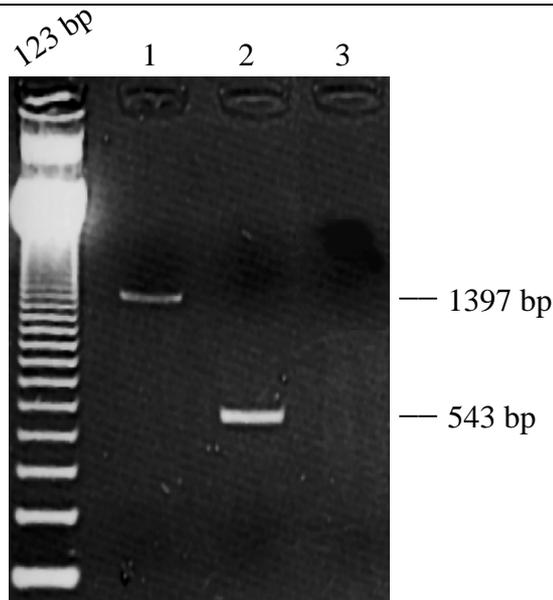
#### **4.1.2.1.1 Klone pGex-NF-M(1-465) (NF-M-A) und pGex-NF-M(736-916) (NF-M-C)**

Als Ausgangsmaterial für die Konstruktion der Expressionsklone diente für NF-M-A cDNA aus Tumorgewebe des Patienten #16292/95 und für NF-M-C cDNA der Zelllinie IMR 32. Die Zelllinie konnte für NF-M-A nicht als Quelle dienen, da die Sequenzierung des Bereichs 1-465 eine Mutation mit einem Aminosäureaustausch ergab.

Zur Vervielfältigung der codierenden Sequenz von NF-M-A (Accession No. Y00067) wurde zunächst die Gesamt-RNA aus dem Thymomgewebe entsprechend 3.2.1.10 präpariert und in cDNA umgeschrieben (3.2.1.15). Es erfolgte eine PCR mit den Oligonukleotiden NFMA-FOR und NFMA-REV (siehe 6.1) (1 min, 94 °C; (30 s, 94 °C/ 40 s, 50 °C/ 60 s, 72 °C) x 40; 2 min, 72 °C;  $\infty$ , 4 °C) in einem Probevolumen von 25  $\mu$ l. Anstelle des Standard-PCR-Puffers der verwendeten Taq-Polymerase wurde 5 x Puffer F (300 mM Tris/HCl pH 9.0, 75 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> von Invitrogen (Groningen, Niederlande)) verwendet. Das PCR-Produkt und der Vektor pGex-5X-2 wurden mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI verdaut. Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung (4.1.2.1) erfolgte die Expression im *E.coli*-Stamm X90.

Für NF-M-C wurde die Gesamt-RNA entsprechend 3.2.1.11 aus Zellen der Linie IMR 32 isoliert. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu denen für NF-M-A, jedoch wurde die PCR mit den Primern NFMC-FOR und NFMC-REV (siehe 6.1) durchgeführt. Für den Restriktionsverdau wurden die Enzyme EcoRI und XhoI verwendet.

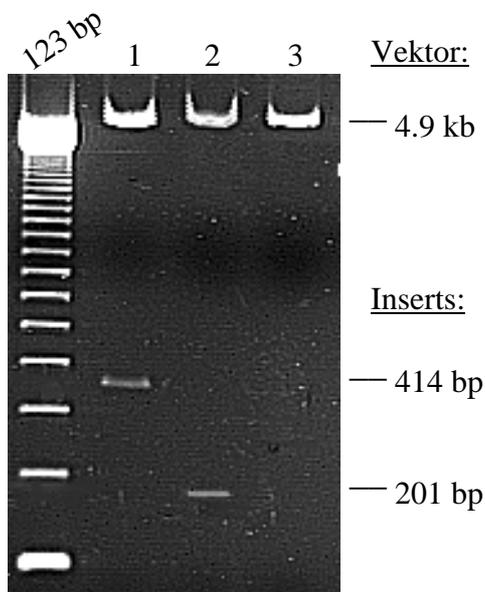
In Abb. 5 sind die PCR-Produkte für die Fragmente NF-M-A bzw. NF-M-C, aufgetrennt auf einem Agarosegel zu sehen. Die genauen Schnittstellen zwischen Insert und Vektor sind der Abb. 7 zu entnehmen.



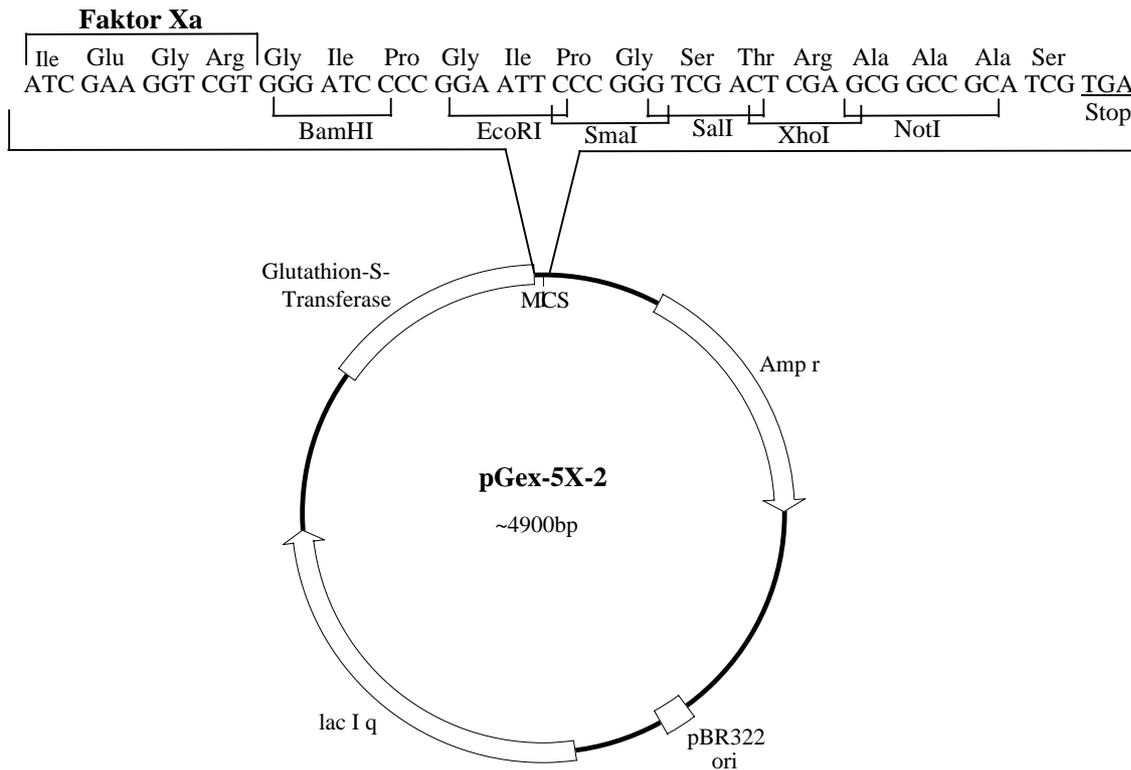
**Abb. 5: RT-PCR von humanem NF-M-A bzw. NF-M-C.** Auf dem 1.5%igen Agarosegel wurde eine 123 bp Leiter als Größenstandard aufgetragen. Spur 1: Fragment NF-M(1-465) (NF-M-A). Spur 2: Fragment NF-M(736-916) (NF-M-C). Spur 3: Negativkontrolle ohne cDNA. Quelle für die codierende Sequenz war für NF-M-A Tumorgewebe des Patienten #16292/95, für NF-M-C die Zell-Linie IMR 32.

#### 4.1.2.1.2 Klone pGex- $\delta$ AChR (313-450) ( $\Delta^{\text{zyt}}$ ) und pGex- $\delta$ AChR (430-496) ( $\Delta^{\text{Cterm}}$ )

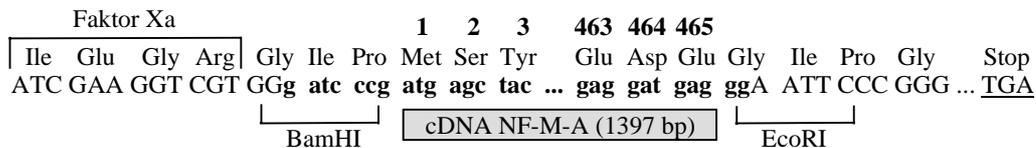
Als Quelle für die codierende Sequenz der  $\delta$ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors wurde die Zell-Linie TE671 verwendet. Die Klonierungsschritte erfolgten wie oben beschrieben. Als Primer für die PCR dienten DELTA4-FOR und -REV bzw. DELTA5-FOR und -REV (siehe 6.1). Die PCR für die beiden Fragmente  $\delta$ AChR(313-450) und  $\delta$ AChR(430-496) lief unter folgenden Bedingungen: 1 min, 94 °C; (30 s, 94 °C/ 40 s, 68 °C/ 45 s, 72 °C) x 40; 2 min, 72 °C;  $\infty$ , 4 °C). Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte über BamHI/EcoRI-Schnittstellen. Abb. 6 zeigt den Restriktionsverdau für die Klone  $\Delta^{\text{zyt}}$  bzw.  $\Delta^{\text{Cterm}}$ , Abb. 7 die genauen Schnittstellen zwischen Insert und Vektor der einzelnen Klone.



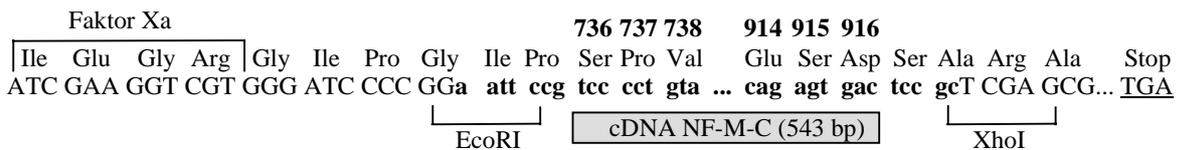
**Abb. 6: Restriktionsverdau der Klone  $\Delta^{\text{zyt}}$  und  $\Delta^{\text{Cterm}}$ .** Auf dem 2 %igen Agarosegel wurde eine 123 bp-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Spur 1: pGex- $\delta$ AChR(313-450) ( $\Delta^{\text{zyt}}$ ). Spur 2 : pGex- $\delta$ AChR(430-496) ( $\Delta^{\text{Cterm}}$ ). Spur 3: Vektor pGex-5X-2 ohne Insert; jeweils verdaut mit BamHI/EcoRI. Quelle für die codierende Sequenz war die Zell-Linie TE671.



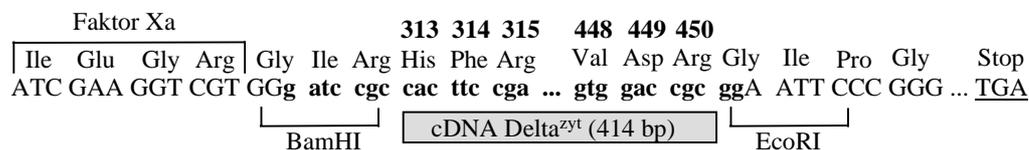
**pGex-NF-M-A(1-465)** [~6300 bp]



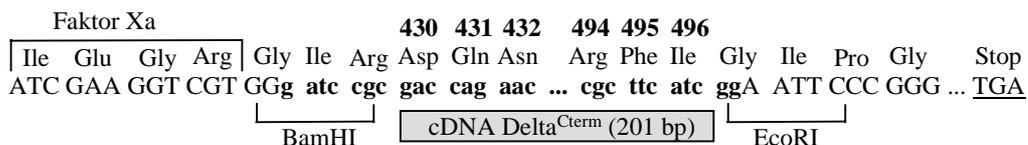
**pGex-NF-M-C(736-916)** [~5440 bp]



**pGex-Delta<sup>zyt</sup>(313-450)** [~5310 bp]



**pGex-Delta<sup>Cterm</sup>(430-496)** [~5100bp]



**Abb. 7: Vektorkarte von pGex-5X-2.** Die Karte wurde nach Angaben des Herstellers konstruiert. Bei den einzelnen Klonen sind die genauen Sequenzen der Schnittstellen zwischen Vektor und Insert angegeben. Die Großbuchstaben geben Sequenzen des Vektors, die Kleinbuchstaben Sequenzen des Inserts an. Die Glutathion-S-Transferase (GST) Genregion enthält den *tac* Promotor, den *lac* operator (regulatorische Transkriptionseinheit für die Synthese des Laktakt-spaltenden Enzyms  $\beta$ -Galactosidase), die Ribosomenbindungsstelle und die codierende Sequenz für GST. MCS: multiple cloning site, amp<sup>r</sup>: Ampicillinresistenz ( $\beta$ -Laktamase), ori: Replikationsursprung, lac I q: *lac* Repressor (bindet an *lac* operator).

#### 4.1.2.2 Bakterielle Proteinexpression

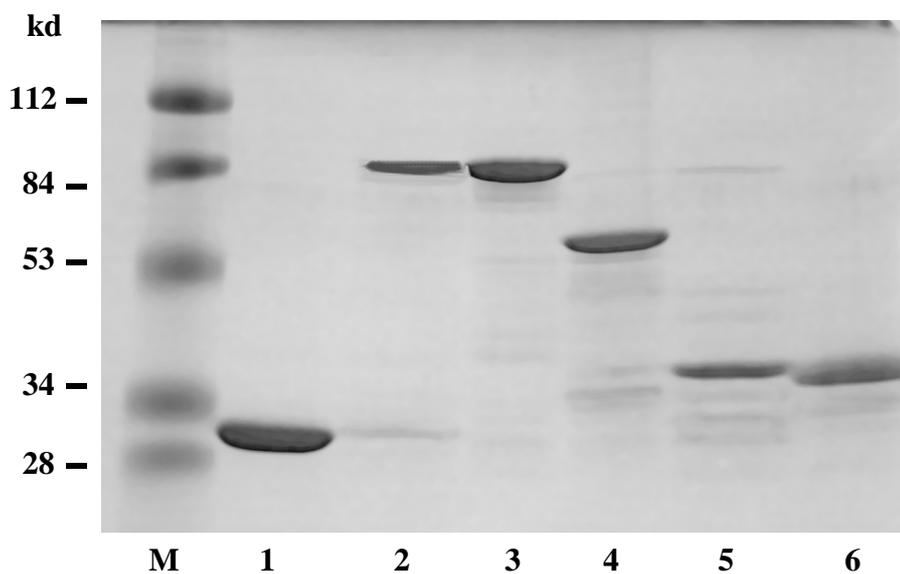
Die Proteinexpression erfolgte mit Hilfe des „GST Fusion Systems“ von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Die rekombinanten Fusionsproteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel (3.2.2.4) analysiert. Entsprechend ihres Laufverhaltens wurde mittels eines mitaufgetrennten Proteinstandards das Molekulargewicht geschätzt. Zusätzlich wurde das Gewicht aus der Anzahl der Aminosäuren für jedes Protein errechnet. Für den Fusionspartner GST wurde dabei ein Molekulargewicht von 29 kDa zugrunde gelegt, für jede Aminosäure ein durchschnittliches Molekulargewicht von 120 Da.

Fusionsprotein	Geschätztes Molekulargewicht [kDa]	Errechnetes Molekulargewicht [kDa]
NF-M-A (1-465)	85	82.8
NF-M-C (736-916)	60	48.7
Delta <sup>zyt</sup> (313-450)	42.0	43.6
Delta <sup>Cterm</sup> (430-496)	37.0	35.0

Die geschätzten und errechneten Werte stimmen außer für das Fusionsprotein NF-M-C weitgehend überein. Das scheinbar höhere Molekulargewicht in der Gelelektrophorese für dieses Protein läßt sich vermutlich durch eine höhere Ladungsdichte erklären. Eine erhöhte Proteinladung, hervorgerufen z.B. durch Phosphorylierungen, kann neben dem Molekulargewicht das Laufverhalten eines Proteins im Gel beeinflussen. Phosphorylierungen erhöhen dabei nicht nur die Ladungsdichte, sondern auch das Molekulargewicht. Für das Neurofilament NF-M sind multiple Phosphorylierungen vor allem im C-terminalen Bereich (Carden *et al.*, 1985; Julien and Mushynski, 1982) und deren Einfluß auf das Laufverhalten in der Gelelektrophorese (Myers *et al.*, 1987) beschrieben worden. Würden diese Phosphorylierungen an Serinresten auch von Kinasen im bakteriellen System durchgeführt, so könnte dies zu der Überschätzung

des Molekulargewichts des NFM-C-Proteins in der Gelelektrophorese führen. Dies scheint sehr wahrscheinlich, da auch für das Fragment NF-M-B (459-737) im Gel ein höheres Molekulargewicht von 85 kDa geschätzt wurde gegenüber einem errechneten Gewicht von 57 kDa (Schultz, 1997). Für das Protein NF-M-A hingegen stimmen geschätztes und errechnetes Molekulargewicht überein, da sich im N-terminalen Bereich nur wenige Phosphorylierungsstellen befinden (Myers *et al.*, 1987).

Die folgende Abb. 8 zeigt die Auftrennung der gereinigten rekombinanten Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel.



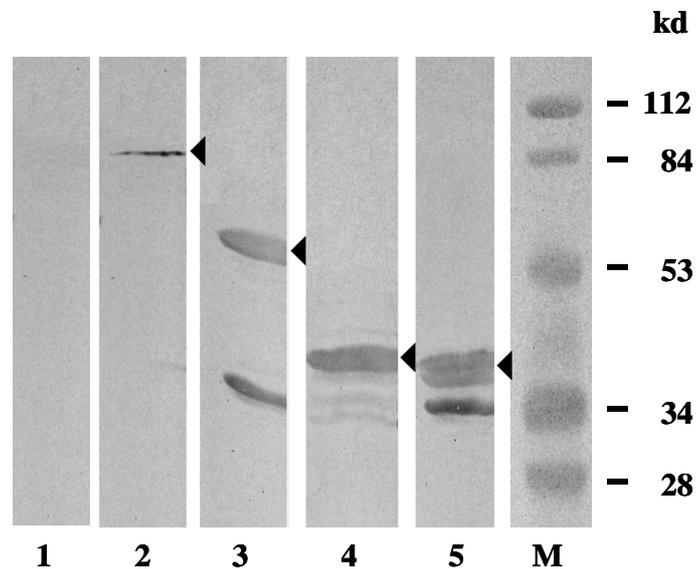
**Abb. 8: Gelelektrophoretische Auftrennung bakteriell exprimierter rekombinanter Proteine.**

(1) GST, (2) GST-NF-M-A, (3) GST-NF-M-B, (4) GST-NF-M-C, (5) GST-Delta<sup>zyt</sup> und (6) GST-Delta<sup>Cterm</sup>. Die Auftrennung erfolgte auf einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel. M: Größenstandard in kd.

Zur Identifikation der rekombinanten Proteine wurden schließlich Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern mAk 155, mAk 139, mAk NN18, mAk BF10 und mittels eines polyklonalen anti-GST-Serums.

Das anti-GST-Serum band an alle rekombinanten Proteine (siehe Abb. 9), wodurch der eindeutige Nachweis erbracht wurde, daß es sich bei den jeweiligen aufgereinigten Proteinen wirklich um die gewünschten GST-Fusionsproteine handelte. Im Blot sind auch Banden kleineren Molekulargewichts erkennbar. Hierbei handelt es sich um proteolytische Abbauprodukte der Fusionsproteine, welche während der Aufreinigung trotz Zugabe von Proteaseinhibitoren

ren entstehen können. Der Fusionspartner GST ist relativ unempfindlich gegenüber Proteasen. Aus diesem Grunde ist vor allem bei NF-M-C (Spur 3) bzw. Delta<sup>CTerm</sup> (Spur 5) eine deutlichere Bande bei ca. 29 kd (dem Molekulargewicht von GST) erkennbar (Abb. 9).

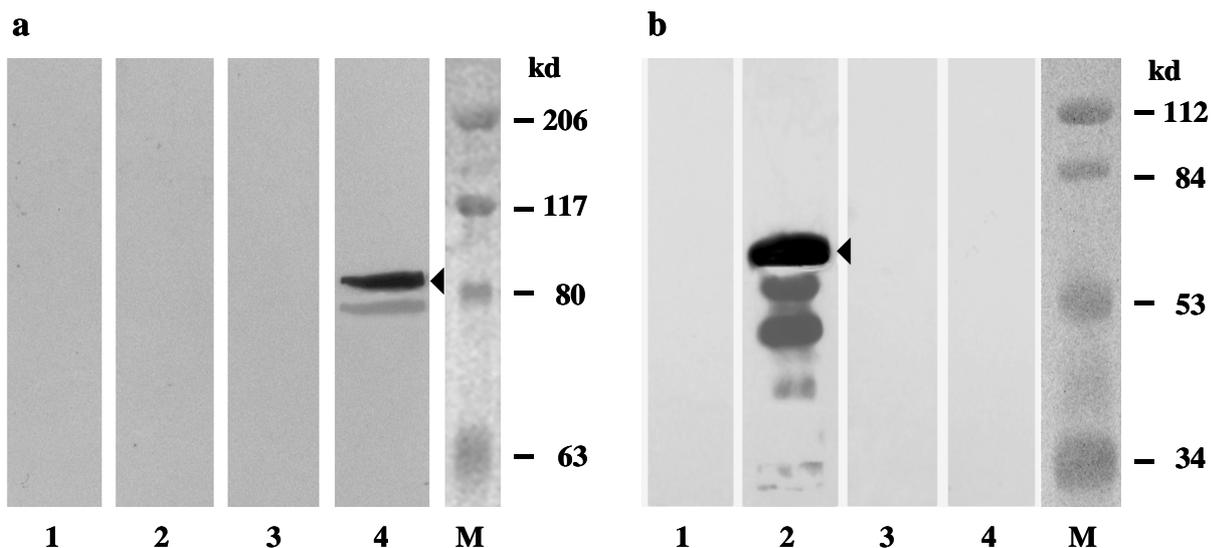


**Abb. 9: Nachweis der Fusionsproteine im Western Blot .** Die verschiedenen rekombinanten Fusionsproteine (2) NF-M-A, (3) NF-M-C, (4) Delta<sup>zyt</sup>, (5) Delta<sup>CTerm</sup> wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit polyklonalem anti-GST-Serum (Peroxidase-gekoppelt) und anschließender Chloronaphtol-Färbung. (1) Negativkontrolle ohne Erstantikörper. M: Größenstandard in kd. ◄ : markiert die Hauptbande. Darunterliegende Banden: proteolytische Abbauprodukte, insbesondere GST ca. 30 kD.

Durch den NF-M-spezifischen Antikörper mAK BF10 wurde weder das Fragment NF-M-A noch NF-M-C (Abb. 10, jeweils Spur 1) erkannt. Jedoch ließ sich mittels dieses Antikörpers das Fragment NF-M-B im Western Blot detektieren (Daten nicht gezeigt.). Im Gegensatz dazu band der NF-M-spezifische Antikörper mAK NN18 sowohl an das Fragment NF-M-B (Abb. 3, Spur 2b) als auch an das Fragment NF-M-C (Abb. 10, Spur 2b). Das Fragment NF-M-A wurde dagegen nicht erkannt (Abb. 10, Spur 1b). Die beiden NF-M-spezifischen Antikörper mAK BF10 und mAK NN18 binden demnach an unterschiedliche Epitope im Protein. Für das Fragment NF-M-C konnte somit mittels des mAK NN18 ein zusätzlicher Nachweis erbracht werden, daß das aufgereinigte Fusionsprotein tatsächlich ein Fragment des NF-M-Proteins enthält. Mangels eines Antikörpers, welcher ein Epitop im Bereich des Fragmentes NF-M-A (Aminosäure 1-465) erkennt, mußte dieser zusätzliche Nachweis für dieses Fragment ausbleiben.

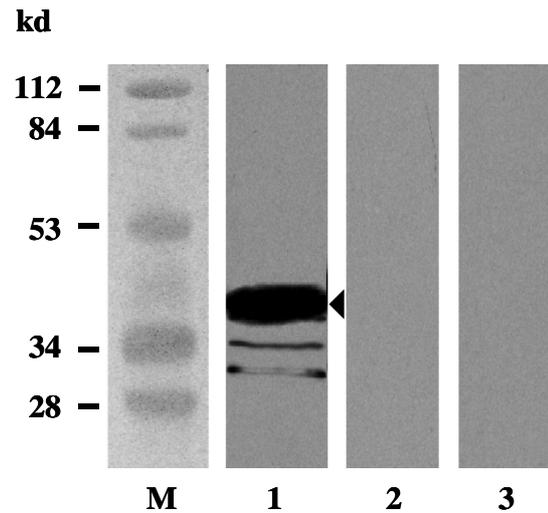
Außerdem wurden die beiden NF-M-Fragmente NF-M-A und NF-M-C mit dem mAK 155 getestet. Beide Fragmente wurden von diesem Antikörper, welcher das Fragment NF-M-B erkennt (siehe Abb. 3, Spur 1b), nicht gebunden (Abb. 10, Spuren 3 a, b). Demnach befindet sich also in den Fragmenten NF-M-A bzw. NF-M-C kein Epitop für diesen Antikörper.

Auch in diesem Western Blot (Abb. 10) sind unter der dominierenden Hauptbande mehrere schwächere Nebenbanden kleineren Molekulargewichts erkennbar, welche wiederum auf proteolytische Abbauprodukte des jeweiligen Fusionsproteins zurückzuführen sind.



**Abb. 10: Western Blot-Analyse von NF-M-A und NF-M-C.** Die rekombinanten Proteine NF-M-A (a) bzw. NF-M-C (b) wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Detektion erfolgte jeweils mit den Antikörpern BF10 (Spur 1), NN18 (Spur 2) und mAK 155 (Spur 3) und anschließender ECL-Entwicklung. NF-M-A wurde außerdem mit dem anti-GST-Serum gefärbt (Spur 4a), NF-M-C mit dem mAK 139 (Spur 4b). M: Größenstandard in kd. Die entsprechenden Negativkontrollen ohne Erstantikörper waren jeweils negativ (nicht dargestellt.) ◄ : markiert die Hauptbande. Darunterliegende Banden: proteolytische Abbauprodukte.

Die rekombinanten Fragmente der  $\delta$ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors wurden mit dem Antikörper mAK 139 im Western Blot untersucht (siehe Abb. 11). Das Fragment Delta<sup>zyt</sup> (313-450) (Spur 2) wurde von dem AK detektiert, wohingegen das Fragment Delta<sup>Cterm</sup> (430-496) (Spur 3) nicht erkannt wurde. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Literaturangaben (Tzartos and Lindstrom, 1980), worin die Bindungsstelle des mAK 139 innerhalb der  $\delta$ -Untereinheit mit dem Epitop 374-385 angegeben wird, welches sich innerhalb des rekombinanten Fragmentes Delta<sup>zyt</sup> befindet.



**Abb. 11: Western Blot-Analyse von Delta<sup>zyt</sup> und Delta<sup>Cterm</sup>.** Die rekombinanten Proteine Delta<sup>zyt</sup> (Spur 1) und Delta<sup>Cterm</sup> (Spur 2) wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper mAK 139 und anschließender ECL-Entwicklung. Spur 3: Negativkontrolle ohne Erstantikörper. M: Größenstandard in kd. ◄ : markiert die Hauptbande. Darunterliegende Banden: proteolytische Abbauprodukte.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Western Blot-Analysen zusammengefaßt (Nicht alle Ergebnisse sind in den obigen Abbildungen gezeigt.)

**Tabelle 4: Ergebnisse der Western Blot-Analysen.**

Antikörper	NF-M-A (1-465)	NF-M-B (459-737)	NF-M-C (736-916)	Delta <sup>zyt</sup> (313-450)	Delta <sup>Cterm</sup> (430-496)
anti-GST	+	+	+	+	+
mAK BF10	-	+	-	nt	nt
mAK NN18	-	+	+	nt	nt
mAK 155	-	+	-	nt	nt
mAK 139	Nt	+	-	+	-

(+): Im Western Blot positive Reaktion.

(-): Im Western Blot nicht detektierbar.

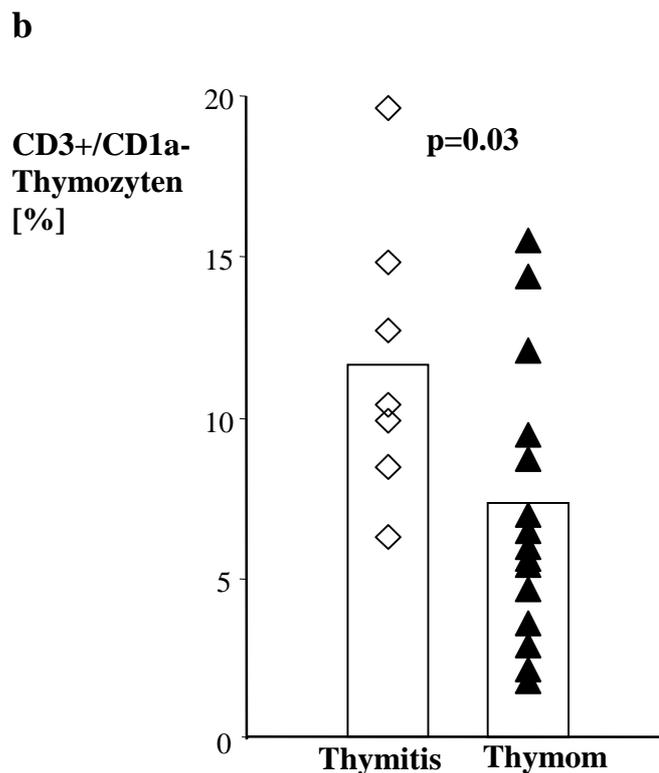
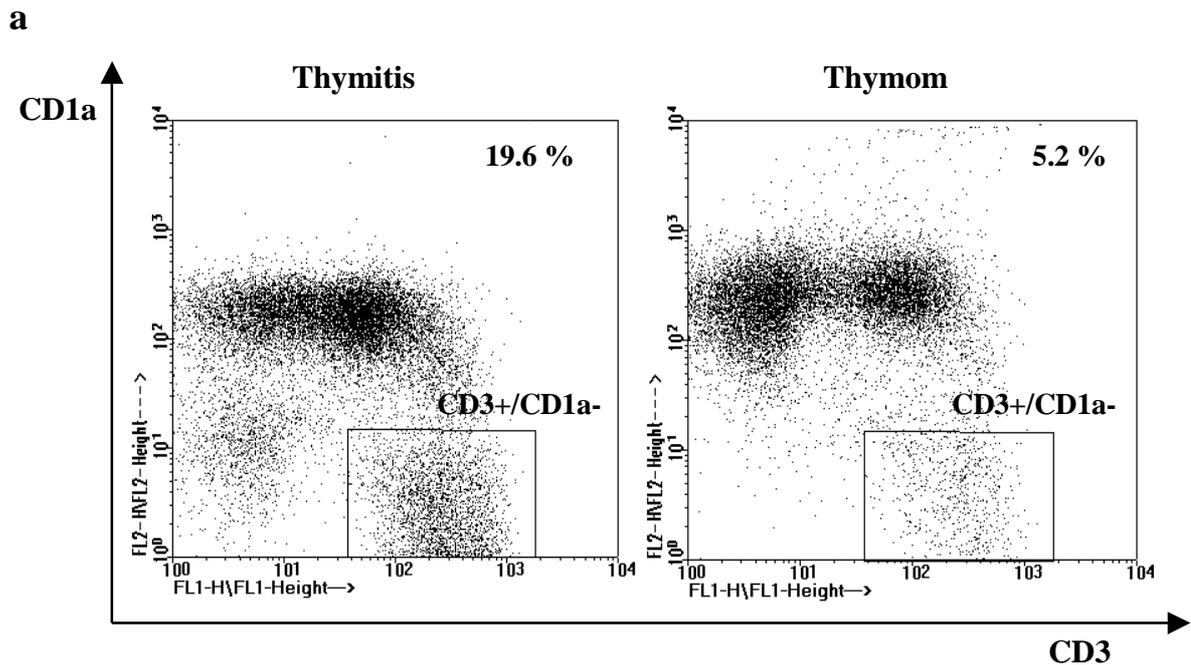
(nt): nicht getestet.

### 4.1.3 T-Zell-Proliferationstests mit rekombinanten Autoantigenen

#### 4.1.3.1 Nachweis NF-M-B-spezifischer T-Zellen

Die intratumoröse Expression von NF-M könnte das autoreaktive T-Zell-Repertoire von Thymompatienten beeinflussen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zunächst T-Zell-Proliferationstests mit verschiedenen rekombinanten Fragmenten der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR und dem rekombinanten Fragment NF-M-B (459-737) durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Thymozyten, welche aus Thymomen bzw. aus Thymi mit einer Thymitis isoliert wurden, zusätzlich mit dem Fremdantigen Tetanus Toxoid stimuliert. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, zeigten die Thymom-Zellen T-Zell-Antworten gegenüber den verschiedenen  $\alpha$ AChR-Fragmenten und gegenüber dem NF-M-Fragment. Dabei wurden Stimulationsindizes mit Werten zwischen 0.7 und 9.4 ermittelt. Die aus der Thymitis isolierten Zellen proliferierten nach der Stimulation mit den  $\alpha$ AChR-Fragmenten mit Indizes bis zu 2.7, nach der Stimulation mit dem NF-M-Fragment bis zu einem Index von 2.2. Für die unspezifische Proliferation ohne Antigen (Mediumkontrolle) ergaben sich für die Thymomzellen Werte zwischen 15 bis 670 cpm, für die Thymitis-Zellen zwischen 38 bis 278 cpm. Nach der Stimulation mit den verschiedenen Autoantigenen wurden für die Thymomzellen Werte zwischen 23 bis 3869 cpm und für die Thymozyten aus der Thymitis 32 bis 1128 cpm gemessen. Diese Werte, welche ein Maß für die Autoantigen-spezifische Proliferation der T-Zellen darstellen, waren in der Regel für die Thymomzellen höher als für die Zellen aus der Thymitis. Um dieses Ergebnis näher zu untersuchen, wurden die Anteile der reifen CD3<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> Thymozyten in Thymomen bzw. Thymitis mittels FACS-Analyse ermittelt. Nur für reife Thymozyten mit diesem immunologischen Phänotyp ist eine Antigen-spezifische Proliferation beschrieben worden (Vanhecke *et al.*, 1995b). Wie in Abb. 12a exemplarisch dargestellt, war der Anteil der reifen CD3<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> Zellen in Thymomen (7.1 +/- 4.1%) deutlich erniedrigt gegenüber dem Anteil dieser Zell-Population in Thymitispatienten (11.7 +/- 4.1 %). Für die Thymomzellen wurden Werte zwischen 2.0 bis 15.5 %, für die Thymitiszellen Werte von 6.3 bis 19.6 % ermittelt. Nach statistischer Auswertung ergab sich für die Thymome (n=15) ein signifikant niedrigerer Anteil (p=0.03) der reifen Thymozyten-Population als in Thymitispatienten (n=7) (Abb. 12b). Hieraus wird ersichtlich, daß die für die Thymomzellen beobachteten höheren Proliferationswerte durch wenige reife T-Zellen verursacht werden, während die im Vergleich zu den Thymomzellen niedrigeren Proliferationswerte der Thymitiszellen von anteilig mehr reifen T-

Zellen hervorgerufen werden. Die Autoantigen-spezifische Proliferation bezogen auf die reifen T-Zellen liegt demnach in Thymomen signifikant höher als in der Thymitis.



**Abb. 12: Anteil reifer CD3+/CD1a- Thymozyten.** FACS-Analyse von Thymozyten aus Thymomen bzw. Thymitis. Die angegebenen Anteile (%) beziehen sich auf die Gesamtpopulation. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Man-Whitney-U Test. (a) Charakteristische Punkt-Diagramme der CD3- und CD1a-Expression von Thymozyten isoliert aus einer Thymitis bzw. einem Thymom. (b) Prozentuale Anteile reifer CD3+ CD1a- Thymozyten in 7 Thymitis- bzw. 15 Thymompatienten. Die Balken geben die Mittelwerte der Anteile innerhalb der beiden Patientengruppen an.

**Tabelle 5: Antigen-spezifische Proliferation intratumoröser Thymozyten von Thymitis- und Thymompatienten nach Stimulation mit rekombinanten Fragmenten des AChR (1-150, 140-216, 301-398), NF-M-B (459-737) und TT.** Die Proliferation ist als sogenannter Stimulationsindex angegeben, dem Verhältnis der cpm-Werte in Anwesenheit des jeweiligen Antigens durch die cpm-Werte in Anwesenheit von Glutathion-S-Transferase oder Medium (Patientendaten siehe Tabelle 10, im Anhang).

(Anzahl der Fälle: TFH/MG+: n=16, CT/MG+: n=10, MXT/MG+: n=4, CT/MG-: n=3, MXT/MG-: n=5)

<b>Diagnose/Fall</b>	<b>AChR (1-150)</b>	<b>AChR (140-216)</b>	<b>AChR (301-398)</b>	<b>NF-M (459-737)</b>	<b>TT</b>
<b>TFH/MG+</b>					
8775/95	nt	nt	2,7	0,8	8,7
9801/96	2,0	1,4	2,6	1,6	2,7
14498/96	1,8	1,2	1,8	2,2	0,8
27327/96	1,2	1,1	1,0	1,3	2,7
433/97	2,3	1,6	2,1	2,0	1,6
2773/97	1,6	1,3	1,0	1,5	3,3
4494/97	1,5	1,5	1,4	1,3	1,0
4777/98	1,2	1,0	1,1	1,1	2,9
5402/98	1,2	1,1	1,2	1,1	3,2
11457/98	1,3	1,1	1,1	0,8	4,3
H1693/98	1,7	1,4	1,4	1,6	3,2
H4051/98	1,3	nt	1,0	1,1	1,1
H6637/98	2,1	nt	1,4	1,2	7,0
H6718/98	1,1	nt	0,8	0,8	6,7
H6795/98	1,9	nt	1,2	1,1	2,9
H7131/98	1,3	nt	1,1	1,0	8,4

Fortsetzung Tabelle 5:

<b>Diagnose/Fall</b>	<b>AChR (1-150)</b>	<b>AChR (140-216)</b>	<b>AChR (301-398)</b>	<b>NF-M (459-737)</b>	<b>TT</b>
<b>CT/MG+</b>					
2577/95	nt	nt	1,4	4,6	0,9
4858/95	2,1	3,2	4,2	3,6	1,3
16769/95	0,8	nt	1,1	1,0	1,0
2682/96	2,3	1,9	nt	2,8	1,3
10083/96	1,9	1,7	1,4	2,0	6,1
10749/96	1,3	1,3	1,8	1,7	7,3
6331/97	2,5	1,3	2,5	1,6	1,1
12250/97	nt	0,9	1,0	1,0	1,2
H4143/98	1,5	1,3	1,6	2,7	1,4
H5735/98	5,1	nt	1,1	1,3	2,1
<b>MXT/MG+</b>					
2306/91	nt	nt	nt	nt	nt
26253/93	nt	nt	2,8	nt	7,2
24864/94	nt	nt	5,3	nt	1,2
4492/97	5,3	2,8	9,4	5,4	1,4
<b>CT / MG -</b>					
20308/97	0,9	0,8	0,9	0,9	1,0
H6335/97	1,7	1,2	1,5	1,2	0,8
5186/98	0,9	0,7	0,7	0,7	1,4
<b>MXT / MG -</b>					
17821/94	nt	nt	0,7	nt	29,0
12211/95	3,1	nt	3,2	1,2	0,7
14839/95	2,5	1,7	0,7	1,8	1,2
13748/96	1,5	1,3	1,1	1,5	nt
3437/98	1,0	0,9	0,9	1,0	1,4

AChR: Azetylcholinrezeptor; CT: kortikales Thymom; MG: Myasthenia gravis;

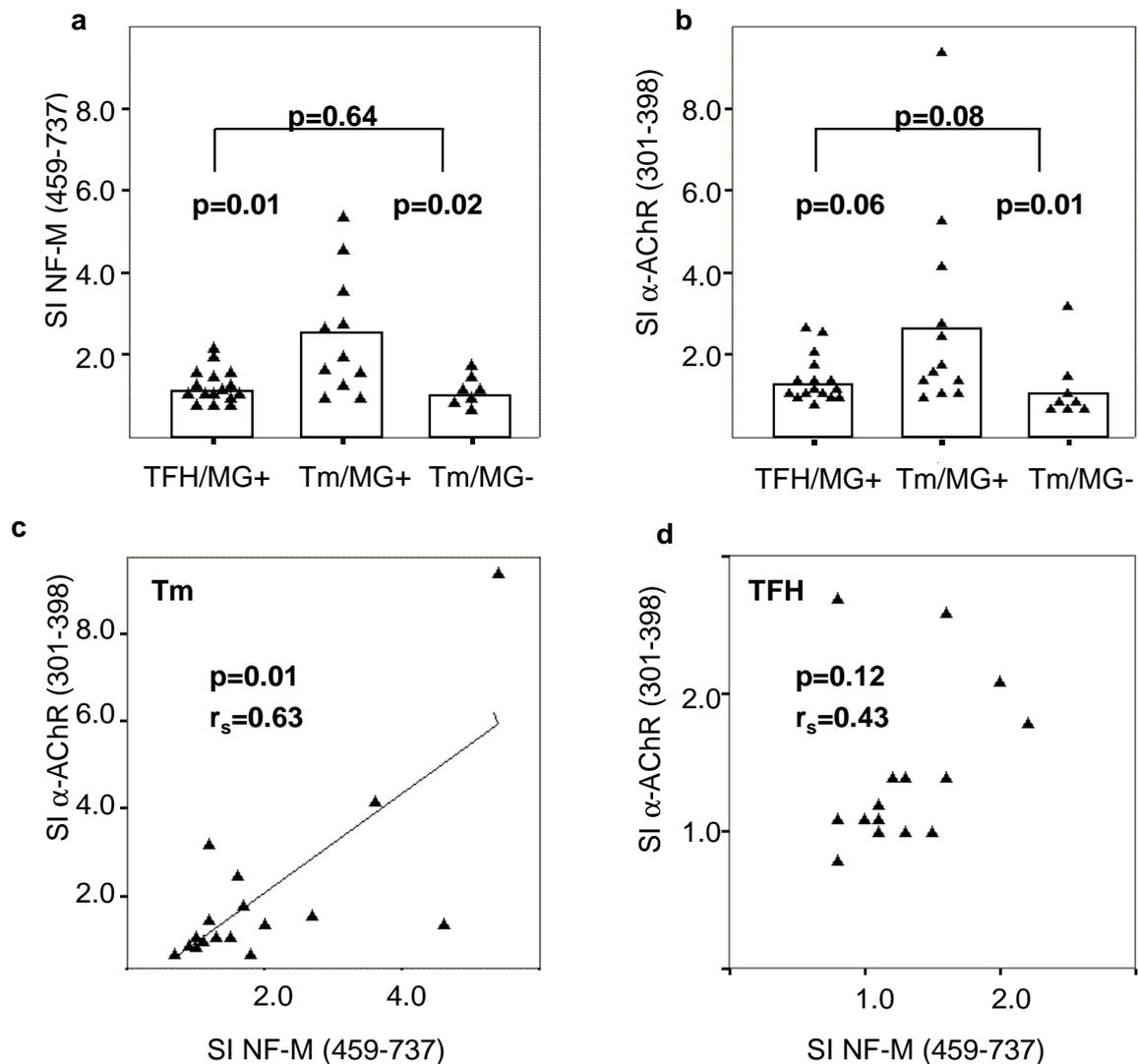
MXT: gemischtes Thymom; NF-M: Neurofilament mittleren Molekulargewichts; nt: nicht getestet; TFH: Thymitis; TT: Tetanus Toxoid.

Bezüglich der spezifischen anti-NF-M-T-Zell-Antworten ergab die statistische Analyse eine signifikante Erhöhung in Thymompatienten mit MG verglichen mit Thymitispatienten ( $p=0.01$ ) und Thymompatienten ohne MG ( $p=0.02$ ) (Abb. 13a).

Beim Vergleich der Patienten mit Thymitis und Thymompatienten ohne MG wurde kein Unterschied in der anti-NF-M-Proliferation gefunden ( $p=0.64$ ). Die T-Zellen beider Patientengruppen scheinen nicht spezifisch auf das NF-M-Protein zu reagieren.

Im Gegensatz dazu verhielten sich die intrathymischen T-Zellen der drei Patientengruppen nach Stimulation mit den Autoantigenen der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR unterschiedlich. Wie für das Fragment  $\alpha$ AChR(301-398) gezeigt, wurden die höchsten Stimulationsindizes für Thymompatienten mit MG gefunden, gefolgt von den Thymitispatienten, während die T-Zellen der Thymompatienten ohne MG auf die Stimulation mit diesem Antigen nahezu nicht reagierten (siehe Abb. 13b). Es ergab sich eine Tendenz für einen Unterschied zwischen den Thymitis- und den Thymompatienten ohne MG ( $p=0.08$ ). Außerdem wurde analysiert, ob anti-NF-M- und anti- $\alpha$ AChR(301-398) T-Zell-Antworten von Thymom- bzw. Thymitispatienten miteinander korreliert waren (Abb. 13c, d). Es ergab sich eine schwache positive Korrelation zwischen den Antworten von Thymompatienten mit MG ( $p=0.01$ ;  $r_s=0.63$ ), aber keine Korrelation bei Thymitispatienten ( $p=0.12$ ;  $r_s=0.43$ ). Aus diesen Ergebnissen läßt sich schliessen, daß die T-Zell-Antworten gegen NF-M bzw. die Korrelation mit den anti- $\alpha$ AChR(301-398)-Antworten charakteristisch zu sein scheinen für Thymompatienten mit MG.

T-Zell-Antworten gegen das Fremd-Antigen Tetanus Toxoid (TT) korrelierten weder mit dem Auftreten der Autoimmunerkrankung MG noch mit dem Vorhandensein eines Thymoms ( $p>0.2$ ). Ebenso ergab sich keine Korrelation zwischen T-Zell-Antworten gegen TT und den verschiedenen rekombinanten Fragmenten des  $\alpha$ AChR und NF-M. Außerdem proliferierten die T-Zellen auch nicht nach Stimulation mit dem rekombinanten Autoantigen Glutaminyl-t-RNA-Synthetase (1-604), welches als Negativkontrolle bei den Tests eingesetzt wurde (Nenninger *et al.*, 1998).



**Abb. 13: NF-M-reaktive T-Zellen sind charakteristisch für Thymompatienten mit MG.** Thymozyten aus Thymomen bzw. Thymitis wurden mit den rekombinanten Autoantigenen NF-M (459-737) und  $\alpha$ AChR (301-398) in T-Zell-Proliferationstests stimuliert. Vergleich der spezifischen T-Zell-Antworten gegen NF-M (a) und AChR (b) von Thymompatienten mit MG gegenüber Thymompatienten ohne MG bzw. mit Thymitis. Korrelation der T-Zell-Reaktivitäten gegen die beiden Autoantigene in Thymom- (c) und Thymitispatienten (d). SI: Stimulationsindex. TFH: Thymitis. Tm: Thymom. MG: Myasthenia Gravis. Die Balken geben den mittleren SI der jeweiligen Patientengruppe an.

#### 4.1.3.1.1 Nachweis autoreaktiver T-Zellen in Thymompatienten gegen bisher nicht verfügbare Autoantigene

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt (Abb. 13a), führte die Stimulation von intratumorösen T-Zellen mit dem von A. Schultz hergestellten rekombinanten Autoantigen NF-M(459-737) (NF-M-B) in Thymompatienten mit MG zu einer signifikant höheren Proliferation verglichen mit Thymompatienten ohne MG bzw. MG-Patienten mit Thymitis (Schultz *et al.*, 1999). In weiteren Tests wurde der Frage nachgegangen, ob auch durch andere Fragmente des NF-M-Proteins bzw. durch Fragmente der  $\delta$ -Untereinheit des AChR eine Autoantigen-spezifische T-Zell-Antwort ausgelöst werden kann.

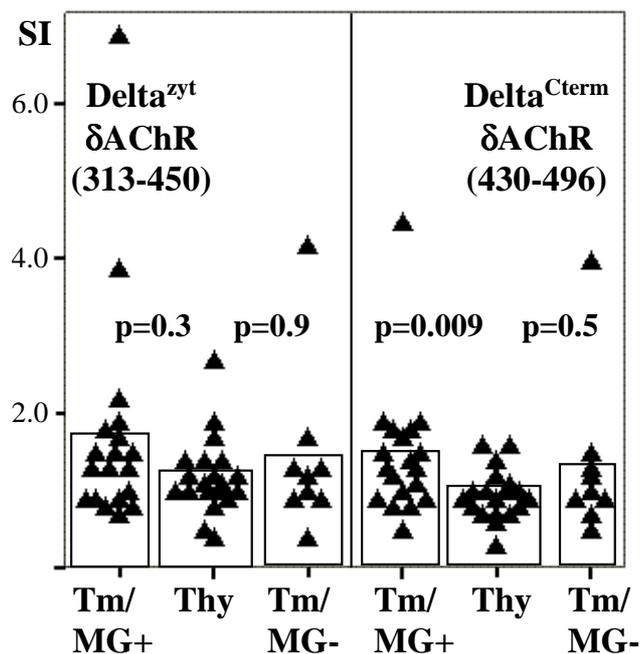
Hierzu wurden die bakteriell exprimierten und aufgereinigten Fragmente des NF-M-Proteins bzw. der  $\delta$ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors in T-Zell-Proliferationstests mit peripheren Blutlymphozyten (PBL) bzw. Thymozyten von Thymompatienten eingesetzt. Als Kontrolle bei diesen Versuchen dienten PBL und Thymozyten von Thymitispatienten mit MG.

In Abb. 14 sind die T-Zell-Proliferationsdaten dargestellt, welche für die aus Thymomen bzw. Thymitis isolierten Thymozyten nach Stimulation mit den Fragmenten Delta<sup>zyt</sup> (313-450) bzw. Delta<sup>Cterm</sup> (430-496) ermittelt wurden. Die Antworten gegen das Fragment Delta<sup>Cterm</sup> (430-496) waren bei Thymompatienten mit MG gegenüber Myasthenie-Patienten mit einer Thymitis signifikant erhöht ( $p=0.009$ ). Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Antworten intratumoröser T-Zellen von Thymompatienten ohne MG und Thymitispatienten ermitteln ( $p=0.5$ ). Wurden die Daten der Thymompatienten mit bzw. ohne MG gemeinsam analysiert, so blieb nach statistischer Auswertung der signifikante Unterschied gegenüber der Patientengruppe mit Thymitis erhalten, wurde jedoch kleiner ( $p=0.02$ ) (Daten nicht gezeigt). Die erhöhten Proliferationsantworten gegen das C-terminale Fragment der  $\delta$ -Untereinheit des AChR scheint demnach charakteristisch für Thymom-assoziierte Myastheniepatienten zu sein.

Im Gegensatz dazu waren die Proliferationsantworten intratumoröser T-Zellen innerhalb der drei Patientengruppen nach Stimulation mit dem Fragment Delta<sup>zyt</sup> nahezu gleich ( $p=0.3$  bzw.  $p=0.9$ , Abb. 14). Auch ein Vergleich der Proliferationsdaten aller Thymompatienten, unabhängig von der Assoziation mit MG, ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0.4$ ) zur Gruppe der Thymitispatienten (Daten nicht gezeigt.) Für T-Zell-Antworten gegen dieses Fragment, welches die Bindungsstelle für den mAChR 139 enthält, ließ sich also keine Assoziation mit einem der untersuchten Krankheitsbilder ermitteln.

Auch für die beiden zuvor nicht untersuchten Fragmente NF-M-A und NF-M-C des NF-M-Proteins konnte keine signifikante Erhöhung der T-Zell-Antworten von Thymompatienten mit

MG gegenüber Thymitispatienten gefunden werden. Die statistische Auswertung der Daten von 19 Thymompatienten mit MG gegenüber 19 Thymitispatienten ergab für das Fragment NF-M-C (736-916) einen Wert von  $p=0.3$  (Daten nicht gezeigt.). Für das Fragment NF-M-A (1-465) dagegen konnte bei der Berücksichtigung der Daten von 12 Thymompatienten mit MG und 14 Thymitispatienten eine statistische Tendenz für einen Unterschied ermittelt werden ( $p=0.1$ ) (Daten nicht gezeigt). Durch eine Erhöhung der Patientenanzahl könnte sich hier vielleicht eine Signifikanz ergeben.

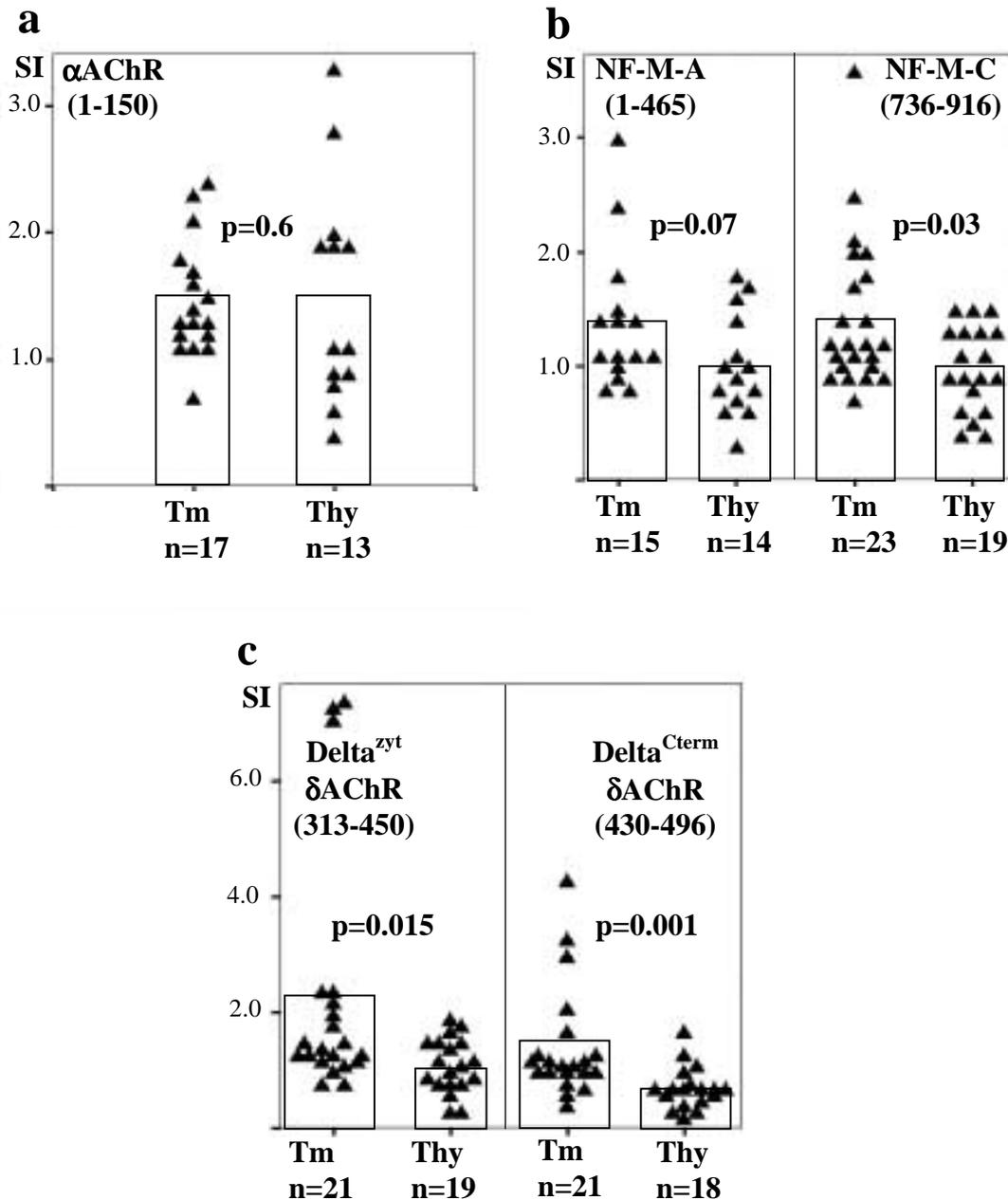


**Abb. 14: Autoantigen-spezifische T-Zellen gegen das Fragment Delta<sup>Cterm</sup> δAChR (430-496) sind charakteristisch für Patienten mit Thymom-assoziiertes MG.** Das Streudiagramm zeigt die Proliferationsantworten intratumoröser T-Zellen, isoliert von 19 Thymompatienten mit MG (Tm/MG+), 9 Thymompatienten ohne MG (Tm/MG-) und 20 (Delta<sup>zyt</sup>) bzw. 19 (Delta<sup>Cterm</sup>) Thymitispatienten mit MG (Thy). Rekombinante Fragmente der δ-Untereinheit des Azetylcholinrezeptors (δAChR (313-450) bzw. (430-496)) wurden als stimulatorische Antigene eingesetzt. Die Proliferationsantworten wurden als Stimulationsindizes (SI) berechnet (siehe Material und Methoden). Jedes Dreieck entspricht dem SI der Thymozyten eines individuellen Patienten; die Balken geben den Mittelwert der SI-Werte innerhalb der Thymozyten einer Patientengruppe für das entsprechende Antigen an.

Nachdem die Untersuchung der intratumorösen T-Zell-Proliferation nur für das Fragment Delta<sup>Cterm</sup> eine signifikante Erhöhung in Thymompatienten mit MG gegenüber Thymitispatienten ergab, sollte ermittelt werden, wie sich periphere Blutlymphozyten nach Stimulation mit den verschiedenen rekombinanten Autoantigenen verhalten. Die PBL wurden mit den Antigenen NF-M-A, NF-M-C, Delta<sup>zyt</sup>, Delta<sup>Cterm</sup> und zusätzlich als Kontrolle mit dem Fragment 1-150 der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR stimuliert, welches ein Autoantigen für alle MG-Patienten (Thymom oder Thymitis) darstellt.

Die Fragmente des  $\delta$ AChR führten zu einer signifikant erhöhten Proliferation ( $p=0.015$  bzw.  $p=0.001$ ) der peripheren T-Zellen von MG-assoziierten Thymompatienten im Vergleich zu Thymitispatienten (siehe Abb. 15c). Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied ( $p=0.03$ ) in der T-Zell-Proliferation zwischen diesen beiden Patientengruppen für das Fragment NF-M-C (Abb. 15b) ermittelt werden. Für das Fragment NF-M-A ergab sich hingegen aufgrund der geringeren Patientenanzahl nur eine Tendenz ( $p=0.07$ ) (Abb. 15b). Die Autoantigene NF-M bzw.  $\delta$ AChR lösten demnach spezifisch im Blut von Thymompatienten eine Autoantigen-spezifische T-Zell-Antwort aus.

Im Gegensatz dazu wurde sowohl in den PBL von Thymom- als auch Thymitispatienten eine erhöhte Proliferation gegenüber dem Autoantigen  $\alpha$ AChR (1-150) gemessen. Es ergab sich kein statistischer Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen ( $p=0.6$ ) (siehe Abb. 15a). Eine Proliferation gegenüber diesem Autoantigen ist demnach nicht spezifisch für MG-positive Thymom- oder Thymitispatienten, sondern für die seropositive Myasthenia gravis allgemein, da es sich bei der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR um das Hauptautoantigen bei seropositiven MG-Patienten handelt.



**Abb. 15:** Die Proliferation NF-M- und Delta-spezifischer T-Zellen ist im Blut von MG-assoziierten Thymompatienten erhöht. Das Streudiagramm zeigt die Proliferationsantworten peripherer T-Zellen (PBL) von Thymom- (Tm/MG+) bzw. Thymitis- (Thy) Patienten; n gibt jeweils die Anzahl der untersuchten Fälle an. Rekombinante Fragmente der  $\alpha$ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors ( $\alpha$ AChR, 1-150) in (a), des Neurofilaments mittleren Molekulargewichts (NF-M-A, NF-M-C) in (b) und der  $\delta$ -Untereinheit des AChR ( $\Delta^{\text{zyt}}$ ,  $\Delta^{\text{Cterm}}$ ) in (c) wurden als stimulatorische Antigene eingesetzt. Die Proliferationsantworten sind als Stimmulationsindizes (SI) angegeben (siehe Material und Methoden). Jedes Dreieck entspricht dem SI der PBL eines individuellen Patienten; die Balken geben den Mittelwert der SI-Werte für das entsprechende Antigen innerhalb einer Patientengruppe (Tm bzw. Thy) an.

## 4.2 Untersuchung von Mikromilieufaktoren in Thymomen und Thymusgewebe

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit T-Zell-Antigene charakterisiert und ihr unterschiedlicher immunologischer Einfluß auf Thymom- bzw. Thymitispatienten untersucht wurde, sollte nach weiteren Faktoren innerhalb des Mikromilieus von Thymomen gesucht werden, welche intratumorös die T-Zell-Toleranz beeinflussen und zu der beobachteten erhöhten Autoreaktivität im Zusammenhang mit Thymomen führen könnten. Dazu zählen u. a. Zytokine, Apoptosefaktoren und Faktoren, welche die MHC-Expression beeinflussen. Um hinsichtlich solcher Mikromilieu-Eigenschaften einen ersten Überblick zu erhalten wurde eine Analyse mittels eines cDNA-Arrays durchgeführt, mit dessen Hilfe die differentielle Expression verschiedener Gene im Thymomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe auf mRNA-Ebene untersucht werden sollte.

### 4.2.1 Atlas<sup>TM</sup> Human Cancer cDNA-Expression-Array (Clontech, Heidelberg)

Um in Thymomen im Vergleich zum nicht-tumorös veränderten Restthymus Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene zu detektieren, wurden zwei identische Atlas<sup>TM</sup> Human Cancer cDNA-Expression-Arrays (Clontech, Heidelberg) mit radioaktiv-markierter cDNA aus Thymomgewebe bzw. Restthymusgewebe desselben Patienten hybridisiert (siehe 3.2.1.22). Auf den Filtern waren 588 ausgewählte cDNA-Klone jeweils als Duplikat immobilisiert, welche Gene enthielten, denen eine Rolle bei der Kontrolle des Mikromilieus zugeschrieben wird. Darunter waren u. a. Gene für verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Apoptosefaktoren.

In Abb. 16 ist das repräsentative Ergebnis einer Hybridisierung dargestellt. RNA aus Thymom- und Restthymusgewebe hybridisierte nahezu mit den gleichen cDNA-Klonen, wobei bei einigen Genen unterschiedliche Hybridisierungsstärken zu erkennen waren. Die Hybridisierung der Arrays wurde zur Kontrolle der Spezifität mit Proben desselben Patienten wiederholt. Es ergaben sich vergleichbare Hybridisierungssignale.

Durch die Hybridisierung konnten die in der nachfolgenden Tabelle 6 aufgeführten Gene ermittelt werden. Bei diesen Genen handelt es sich vermutlich entweder um sehr stark exprimierte Gene oder um solche mit idealen Hybridisierungsbedingungen.

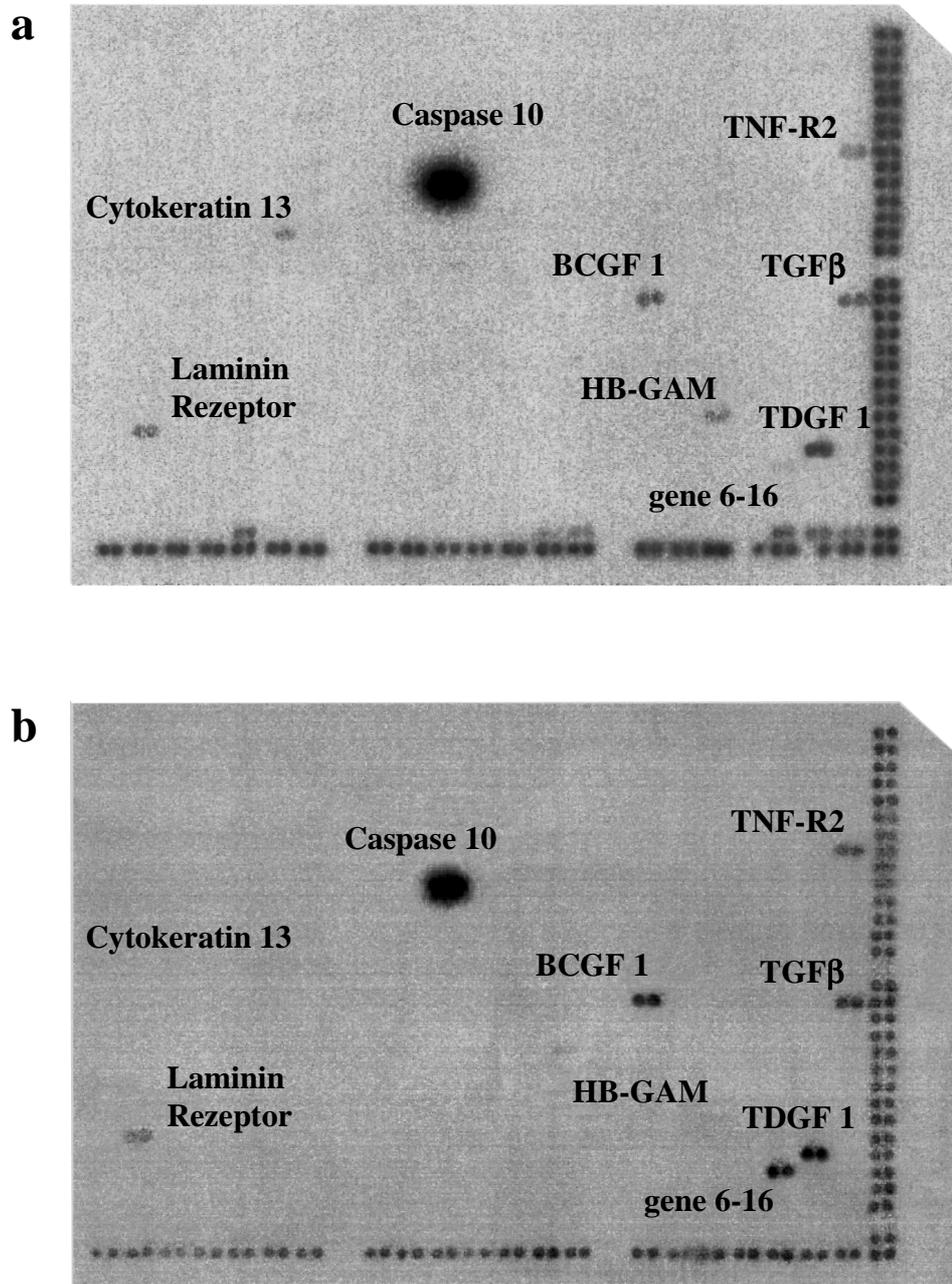
Ein Grund dafür, daß sich nur relativ wenige Hybridisierungssignale ergaben, könnte auf die vergleichbar schlechtere Qualität der aus Kryoblöcken isolierten RNA im Vergleich zu der aus nativen Zellen isolierten zurückzuführen sein. Die Qualität dieser RNA ist für die cDNA-Synthese und nachfolgende RT-PCR vollkommen ausreichend, könnte jedoch für die Hybridisierung des Arrays ein kritischer Faktor sein. Ein anderer Grund könnte darin liegen, daß für alle Gene dieselben Hybridisierungsbedingungen gewählt werden mußten und daß unter den gewählten Bedingungen die detektierten Gene am besten hybridisieren konnten.

Die Spezifität der Hybridisierung wurde mittels RT-PCR überprüft. Alle Gene, welche durch die Hybridisierung der Arrays ermittelt werden konnten, waren für denselben Patienten auch in der RT-PCR positiv (Daten nicht gezeigt.). Zusammenfassend konnten mittels der Array-Analyse zwar nur wenige Gene ermittelt werden, diese waren jedoch in nachfolgenden RT-PCR-Untersuchungen in verschiedenen Thymomen und Thymusgeweben nachweisbar.

**Tabelle 6: Ergebnis des Expressionsvergleichs zwischen Thymom- und Restthymusgewebe eines Patienten mit WDTC und assoziierter MG (#6331/97) mittels Atlas<sup>TM</sup> Human Cancer cDNA-Expression-Arrays (Clontech, Heidelberg)**

Gen	GenBank Accession No.	Restthymus	Thymom
Caspase 10	U60519	+++++	++++
Cytokeratin 13	X52426	+/-	+
Laminin-Rezeptor 37 kd	U43901	++	++
TNF-R2	M32315	++	+
BCGF 1	M15530	++	+++
TGFβ	M19154	++	++
HB-GAM	M57399	+	+/-
TDGF 1	M96956	++	+++
gene 6-16	X02492	+	+++

+/-: Stärke des Hybridisierungssignals auf dem Array



**Abb. 16: Expressionsanalyse von Thymom bzw. Restthymusgewebe.** Zwei identische Atlas™ Human Cancer cDNA-Expression-Arrays (Clontech, Heidelberg) wurden mit radioaktiv-markierter cDNA aus (a) Restthymus- bzw. (b) Thymomgewebe (WDTG/MG+) desselben Patienten (#6331/97) hybridisiert. Die detektierten Klone sind bezeichnet. BCGF1: **B**-cell growth factor 1 (12 kD), gene 6-16: human interferon-inducible peptide (6-16) gene, HB-GAM: **h**eparin-**b**inding growth-associated **m**olecule, TDGF 1: **t**eratocarcinoma-**d**erived growth factor 1, TGFβ: **t**ransforming growth factor **β** 1, TNF-R2: **t**umor **n**ecrosis factor receptor 2.

Die Untersuchungen zeigten, daß für die meisten Gene eine grundsätzlich ähnliche Expressionsintensität wie im nicht-neoplastischen Thymus zu finden war, passend zu dem organoiden („thymusähnlichen“) Charakter von Thymomen (Kirchner *et al.*, 1992; Müller-Hermelink and Marx, 2000). Daneben fanden sich aber auch Gene, die differentiell exprimiert wurden (Caspase 10, TNF-R2, Cytokeratin 13, BCGF 1, TDGF 1, gene 6-16). Während einige dieser Befunde (relative Caspase 10 bzw. TNF-R2 Erhöhung im Thymus bzw. relative Cytokeratin 13 Erhöhung im Thymom) wahrscheinlich eine einfache quantitative bzw. anatomische Erklärung finden dürften (relativ höherer Anteil Caspase 10 bzw. TNF-R2 exprimierender T-Zellen im Thymus bzw. relativ höherer Anteil von Cytokeratin 13 exprimierenden Epithelzellen in Thymomen), wirft die verstärkte Expression von BCGF 1 und gene 6-16 in Thymomen überraschende Fragen hinsichtlich der intratumorösen T-Zellentwicklung und der Expression von MHC II auf Thymomepithelzellen auf, auf die in der Diskussion näher eingegangen werden wird. Für einige einzelne Gene (BCGF 1, TDGF 1) ist über eine Expression im humanen Thymus bisher nicht berichtet worden. HB-GAM konnte zwar mittels RT-PCR im Thymus nachgewiesen werden (Sato *et al.*, 1986), über eine Expression in Thymomen ist bisher jedoch nichts bekannt.

Eine Charakterisierung der ermittelten Gene entsprechend Literaturangaben befindet sich im Anhang (unter 6.4).

#### **4.2.2 Untersuchung der Expression mittels RT-PCR**

Die Hybridisierungssignale für die Caspase 10 und TNF-R2 im Restthymus und Thymom entsprachen den Erwartungen, da aufgrund der Bedeutung dieser Proteine bei der Apoptose der Thymozyten mit einer erhöhten Expression im Thymus zu rechnen war. Das Expressionsverhalten für diese beiden Moleküle wurde deshalb nicht an weiteren Patienten untersucht. Ebenso wurde das Signal für Cytokeratin 13 nicht weiterverfolgt, da es sich hierbei um ein gängiges Strukturprotein für Epithelzellen handelt und deshalb keine Expressionsunterschiede im Tumor- bzw. Restthymusgewebe zu erwarten waren.

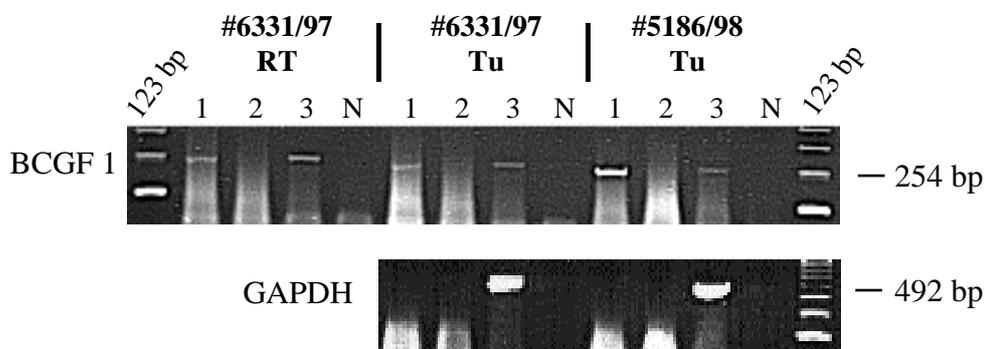
Die Expression der verbliebenen Gene wurde mittels semiquantitativer RT-PCR im Thymom- bzw. Thymusgewebe weiterer Patienten untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, eventuelle Expressionsunterschiede innerhalb verschiedener Patientengruppen zu quantifizieren. Zunächst wurde der Schwerpunkt darauf gelegt, Expressionsunterschiede in Thymomgeweben zu ermitteln, welche sich durch eine Assoziation mit MG bzw. fehlender Assoziation ergeben könnten. Es wurde Gewebe von Thymompatienten (kortikaler bzw. gemischter Typ)

mit oder ohne MG eingesetzt. Als Kontrollen diente Thymusgewebe einer Normalperson und Gewebe entzündeter Thymi (Thymitis).

Zusätzlich wurden einige Faktoren noch dahingehend überprüft, ob sie auch in medullär differenzierten Thymomen oder im Tumorgewebe von Patienten mit einem T-Zell-lymphoblastischen Lymphom (T-LBL) zu finden waren. Bei letztgenannter Erkrankung sind im Gegensatz zum Thymom nicht die Epithel-, sondern die T-Zellen neoplastisch verändert, zeigen aber ebenso wie die Mehrzahl der T-Zellen in kortikalen und gemischten Thymomen einen unreifen Phänotyp (Harris and Müller-Hermelink, 1999). Als Kontrollen dienten hier ebenso Normalthymus- bzw. Thymitisgewebe, sowie Thymomgewebe des kortikalen Typs.

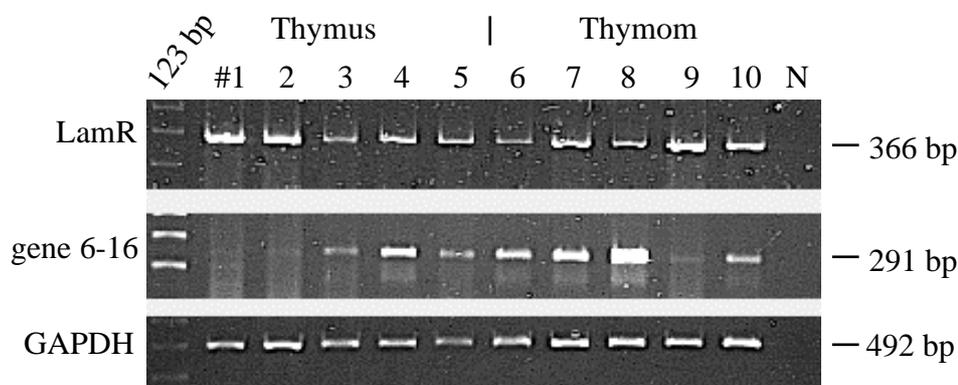
Zunächst wurde exemplarisch am Gewebematerial dreier Patienten überprüft, ob die DNase-Behandlung (siehe 3.2.1.14) der RNA-Proben erfolgreich war. Diese Behandlung war notwendig, da verschiedene nachfolgend mit der RT-PCR untersuchte Gene keine Introns aufweisen. Bei erfolgter PCR kann demnach nicht unterschieden werden, ob das PCR-Produkt ein Amplifikat der cDNA und damit ein Maß für die Expression eines Gens darstellt oder ob es sich um das Amplifikat kontaminierender genomischer DNA handelt. Eine solche Kontamination ist nach der Gesamt-RNA-Isolierung (siehe 3.2.1.10) nicht vollständig auszuschließen. Vor allem bei der Amplifikation kürzerer Fragmente (100-300 bp) können solche Kontaminationen von Bedeutung sein.

Für die Kontroll-PCR wurde das Gen BCGF1 ausgewählt, welches kein Intron enthält und zusätzlich einen Bereich sogenannter „Alu-Sequenzen“ aufweist (Sharma *et al.*, 1987), welche im menschlichen Genom sehr häufig vorkommen. Zusätzlich wurde eine Standard-GAPDH-PCR-Reaktion pipettiert, deren Primer intronüberspannend ausgewählt wurden.



**Abb. 17: Nachweis des DNase-Verdaus.** Aus dem angegebenen Gewebematerial isolierte Gesamt-RNA (jeweils Spur 1), mit DNase behandelte RNA (jeweils Spur 2) und daraus synthetisierte cDNA (jeweils Spur 3) wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel. PCR-Bedingungen: siehe unter 6.2. BCGF 1: B-cell growth factor 1, N: Negativkontrolle.

Wie aus Abb. 17 ersichtlich, ließ sich mittels der BCGF 1-PCR in der unbehandelten RNA (jeweils Spur 1) tatsächlich kontaminierende genomische DNA nachweisen. Die entsprechende Bande für das PCR-Produkt verschwand, wenn DNase-behandelte RNA für die PCR-Reaktion eingesetzt wurde (jeweils Spur 2). Bei Einsatz von cDNA (synthetisiert aus DNase-behandelter RNA) konnte das BCGF 1-PCR-Produkt wiederum nachgewiesen werden (jeweils Spur 3). Wie vorausszusehen, ergab sich bei der GAPDH-PCR mit intronüberspannenden Primern nur ein PCR-Produkt beim Einsatz von cDNA (Abb. 17). Dieses Ergebnis zeigt, daß der DNase-Verdau der RNA-Proben erfolgreich war und es sich dementsprechend bei den nachfolgend dargestellten PCR-Produkten jeweils um ein Maß für die Expression dieser Gene handelt.



**Abb. 18: RT-PCR-Nachweis von 37 kd Laminin-Rezeptor und gene 6-16 mRNA im Thymusgewebe.** Die Proben wurden auf einem 1.5%igen Agarosegel analysiert. Die GAPDH-PCR diente als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR. PCR-Bedingungen: siehe unter 6.2. LamR: 37 kd Laminin-Rezeptor, gene 6-16: human interferon-inducible peptide (6-16) gene, N: Negativkontrolle. Spuren 1-3: Thymusgewebe, Spuren 4-5: Restthymusgewebe, Spuren 6-10: Thymomgewebe (kortikal). Patientendaten siehe Tabelle 12 im Anhang.

Wie in Abb. 18 zu sehen, wurde die Laminin-Rezeptor-mRNA in allen untersuchten Geweben exprimiert (Patientendaten siehe Tabelle 12 im Anhang). Es ließ sich keine erhöhte Expression im Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe ermitteln. Dies entspricht auch dem Ergebnis nach der Hybridisierung der Arrays, da das Signal für den Laminin-Rezeptor sowohl für den Restthymus als auch für das Thymomgewebe in etwa die gleiche Stärke aufwies. Eine Überexpression des 37 kd Laminin-Rezeptors, wie sie in anderen Tumoren entdeckt werden konnte, ließ sich demnach also für die Thymome nicht nachweisen.

Im Gegensatz dazu konnte die Expression der „gene 6-16“ mRNA im Normalthymus (Spur 1) und einem Thymitisgewebe (Spur 2) nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 18). Sie war schwach im Thymitisgewebe eines weiteren Patienten (Spur 3) und einem Restthymusgewebe (Spur 5). Eine relativ starke Expression konnte hingegen erwartungsgemäß im Restthymus des Patienten entdeckt werden, dessen RNA auch für die Hybridisierung des Arrays verwendet worden war (Spur 4). In 3 von 5 Thymomgeweben konnte eine sehr starke mRNA-Expression für dieses Gen detektiert werden (Spuren 6-8, Abb. 18). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, daß in manchen kortikalen Thymomgeweben im Vergleich zum nicht-neoplastischen Thymus möglicherweise mehr Interferon- $\alpha$  bzw. - $\beta$  gebildet wird, da bekannt ist, daß die „gene 6-16“ mRNA-Expression nach Stimulation mit diesen Interferonen ansteigt (Ackrill *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1986).

Die Expression der Moleküle BCGF 1, TGF $\beta$ , TDGF 1 und HB-GAM wurden an einem erweiterten Patientenstamm untersucht (siehe Tabelle 13 bzw. Tabelle 14 im Anhang).

Wie aus Abb. 19a ersichtlich, wurde die mRNA des B-Zell-spezifischen Wachstumsfaktors BCGF 1 in allen untersuchten Geweben exprimiert, wobei das Signal in den MG-assoziierten Thymomen meist schwächer ausfiel (Spuren 3-12). Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die Banden mittels des Programmes NIH Image 1.59/ fat (Macintosh Performa 630) densitrometrisch quantifiziert. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 7 dargestellt. Die statistische Analyse ergab, daß die Expression von BCGF 1 in Thymomgeweben ohne MG signifikant ( $p=0.013$ ) erhöht ist gegenüber MG-assoziierten Thymomgeweben. Dies legt die Vermutung nahe, daß BCGF 1 möglicherweise an der Pathogenese der MG beteiligt ist.

Auch die Expression der TGF $\beta$  mRNA konnte zunächst in allen untersuchten Geweben detektiert werden (Abb. 19a, b). Jedoch war die Expression im Normalthymus bzw. der Thymitis (Spuren 1+2, Abb. 19) schwächer als in den meisten untersuchten Thymomgeweben. Nach Quantifizierung der PCR-Produkte (siehe Tabelle 7) ergab die statistische Analyse keinen Unterschied ( $p=0.96$ ) zwischen untersuchten Thymomgeweben mit bzw. ohne MG. Auch bei der Untersuchung weiterer Fälle (Abb. 19b) konnte die TGF $\beta$ -Expression fast in allen Geweben nachgewiesen werden. Nur der Fall 31 (medulläres Thymom) war vollständig negativ. Eine erhöhte Expression im Thymomgewebe gegenüber nicht-neoplastischem Thymusgewebe ließ sich anhand der weiteren untersuchten Fälle jedoch nicht bestätigen. TGF $\beta$  scheint demnach in Thymomen und im Thymusgewebe gleichermaßen exprimiert zu werden.

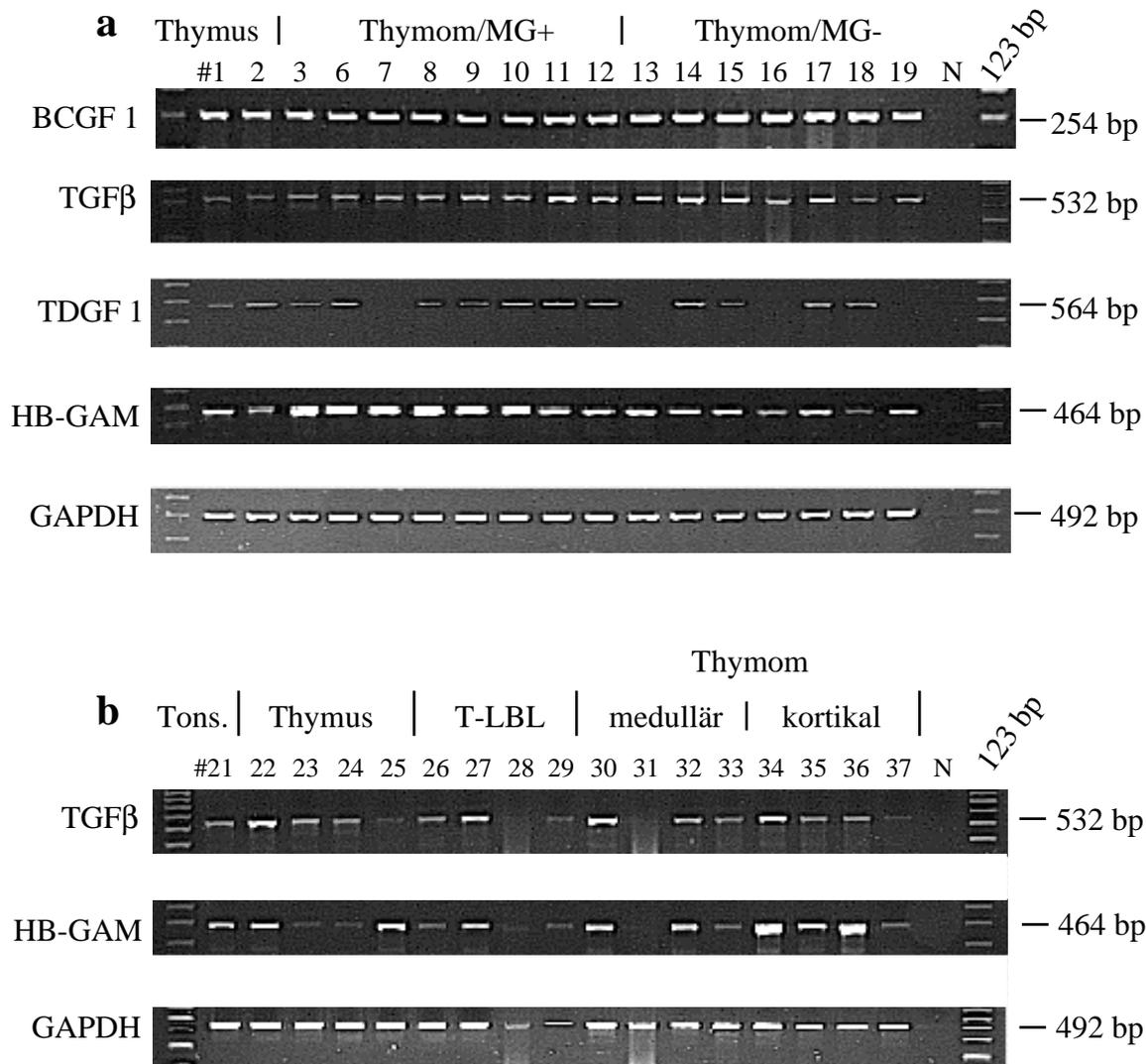
Untersuchungen zur Expression der TDGF 1 mRNA (Abb. 19a) zeigten, daß dieser Wachstumsfaktor sowohl im nicht-neoplastischen Gewebe als auch im Thymomgewebe zu finden

war. Allerdings zeigten nicht alle Tumoren eine Expression. Eine Korrelation zwischen der Expressionsstärke des Faktors und einer bestimmten Thymus-Diagnose ließ sich demnach nicht ermitteln.

Im Gegensatz dazu war die Expression des Wachstumsfaktors HB-GAM in MG-assoziierten Thymomen, insbesondere des kortikalen Typs (Spuren 3-9), gegenüber Thymomgewebe ohne MG (Spuren 13-19) bzw. nicht-neoplastischem Thymus (Spuren 1+2) erhöht (Abb. 19a). Dieses Ergebnis konnte auch nach erfolgter Quantifizierung der Banden und statistischer Analyse bestätigt werden. Die Expression des Faktors in Thymomgeweben mit MG war gegenüber denen ohne assoziierte Autoimmunität hoch signifikant erhöht ( $p=0.004$ ).

Bei der vergleichenden Untersuchung von Thymomgewebe des medullären und kortikalen Typs, T-LBL-Gewebe bzw. Thymusgewebe (Abb. 19b) wurde die stärkste Expression von HB-GAM wiederum in MG-assoziierten kortikalen Thymomen (Spuren 34 + 36) detektiert. Bei den medullären Thymomen konnte in zwei Fällen unabhängig von der MG-Assoziation eine stärkere Expression als im Normalgewebe gefunden werden (Spur 30: MG-assoziiert, Spur 32: ohne MG). Die meisten Normalthymus- und T-LBL-Fälle wiesen eine niedrigere Expression als in den untersuchten kortikalen Thymomen auf. Zusammenfassend ließ sich eine HB-GAM-Expression in unterschiedlichen Thymus- bzw. Thymomgeweben nachweisen, wobei die höchsten Werte für MG-assoziierte kortikale Thymome ermittelt werden konnten. Bei einem Vergleich der verschiedenen Thymomtypen war die Expression in kortikalen Thymomen höher als in gemischten oder medullären.

Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf eine mögliche Rolle von HB-GAM als Wachstumsfaktor insbesondere in kortikalen Thymomen, in Übereinstimmung mit Literaturangaben, in welchen HB-GAM ein Einfluß auf die Proliferation von Epithelzellen zugeschrieben wird (Fang *et al.*, 1992).



**Abb. 19: RT-PCR-Nachweis von BCGF 1, TGFβ, TDGF 1 und HB-GAM mRNA im Thymusgewebe.** Die Proben wurden auf einem 1.5%igen Agarosegel analysiert. PCR-Bedingungen: siehe unter 6.2. Die GAPDH-PCR (22 Zyklen) diente als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR. BCGF 1: B-cell growth factor 1, HB-GAM: heparin-binding growth-associated molecule, TDGF 1: teratocarcinoma-derived growth factor 1, TGFβ: transforming growth factor beta 1, N: Negativkontrolle. (a) Spuren 1-2: Thymusgewebe, Spuren 3-12: Thymomgewebe assoziiert mit MG, Spuren 13-19: Thymomgewebe ohne MG. Patientendaten siehe Tabelle 13 im Anhang. (b) Spur 21: Tonsillengewebe (Tons.), Spuren 22-25: Thymusgewebe, Spuren 26-29: T-Zell lymphoblastisches Lymphom (T-LBL), Spuren 30-33: medulläres Thymomgewebe, Spuren 34-37: kortikales Thymomgewebe. Patientendaten siehe Tabelle 14 im Anhang.

**Tabelle 7: Densitrometrische Quantifizierung der PCR-Banden mittels des Programmes NIH Image 1.59/fat (Macintosh) (siehe Abb. 19a, Abb. 25a)**

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Patient</b>	<b>Diagnose</b>	<b>I-TAC</b>	<b>BCGF1</b>	<b>TGFβ</b>	<b>HB-GAM</b>
<b>1</b>	14161/92	Normalthymus	112	87	66	95
<b>2</b>	H6637/98	Thymitis/MG+	106	82	65	84
<b>3</b>	10083/96	CT/MG+	101	84	79	157
<b>4</b>	H6694/98	CT/MG+	110	n.v.	n.v.	n.v.
<b>5</b>	H1508/98	CT/MG+	104	n.v.	n.v.	n.v.
<b>6</b>	13575/99	CT/MG+	98	85	92	135
<b>7</b>	H3983/99	CT/MG+	100	100	98	118
<b>8</b>	6331/97	WD/MG+	95	100	95	140
<b>9</b>	20286/94	CT/MG+	88	102	119	160
<b>10</b>	24864/94	MXT/MG+	85	n.v.	96	138
<b>11</b>	23382/96	MXT/MG+	76	112	136	120
<b>12</b>	11358/90	MXT/MG+	75	118	116	122
<b>13</b>	H5018/99	CT/MG-	64	121	97	131
<b>14</b>	5186/98	CT/MG-	63	134	160	91
<b>15</b>	3437/98	MXT/MG-	65	133	122	92
<b>16</b>	15091/95	MXT/MG-	56	140	105	71
<b>17</b>	17821/94	MXT/MG-	70	152	96	90
<b>18</b>	12211/95	MXT/MG-	63	133	76	52
<b>19</b>	5633/98	MXT/MG-	71	95	81	75

n.v.: keine PCR-Analyse, da entsprechende cDNA nicht mehr vorhanden

## 4.3 Einfluß des Thymoms auf die Zusammensetzung und Funktion des peripheren T-Zell-Repertoires

### 4.3.1 FACS-Analysen

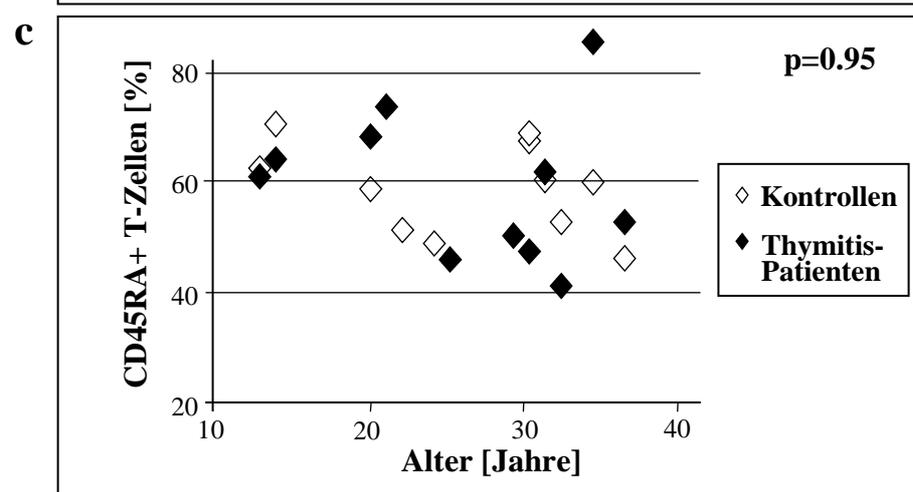
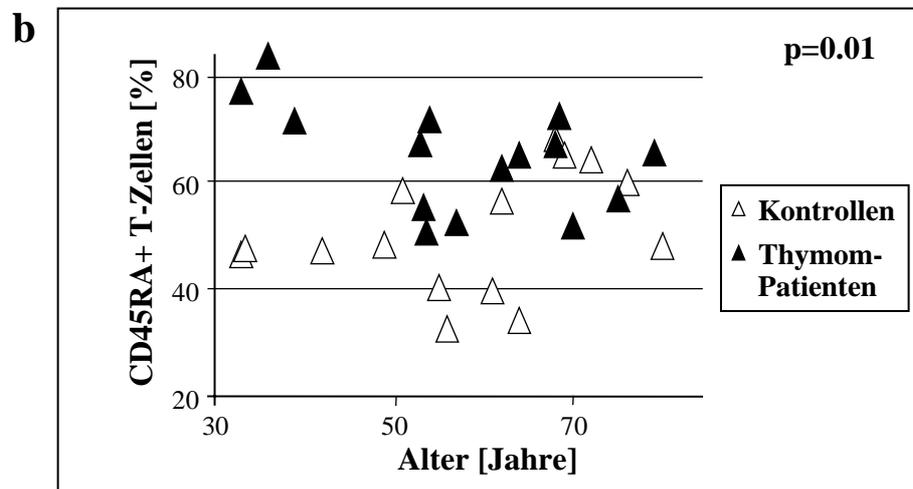
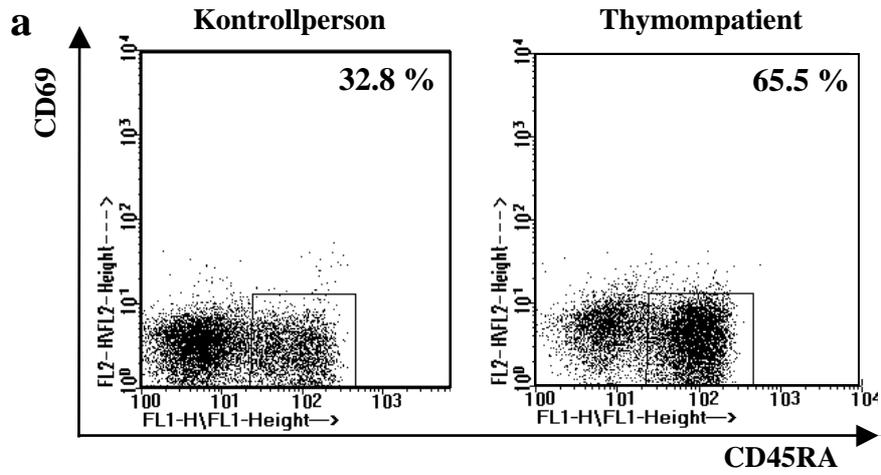
#### 4.3.1.1 Untersuchung des Anteils an CD45RA+ T-Zellen im Blut

Da in Thymomen nachweislich eine vollständige T-Zell-Reifung stattfindet (Nenninger *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1995), stellte sich die Frage, ob die entstandenen reifen Zellen vom Thymom in die Peripherie entlassen werden. In diesem Fall sollte der periphere T-Zell-Pool eines Thymompatienten, speziell die Anzahl naiver CD45RA+ T-Zellen, gegenüber einer gesunden Normalperson verändert sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurden periphere Blutlymphozyten (PBL) von Thymompatienten, Thymitispatienten und Kontrollpersonen, welche entsprechend den Patientengruppen nach Geschlecht und Alter ausgewählt wurden, analysiert (Patientendaten siehe Tabelle 15). Die absolute Zellzahl der PBL für die verschiedenen Patienten- bzw. Kontrollgruppen wurde entsprechend der im Material- und Methoden- teil erläuterten Methode bestimmt. Der Anteil zirkulierender CD3+ T-Zellen und der Subpopulation naiver CD3+ CD45RA+ CD69- T-Zellen im Blut wurde durch eine Dreifachfärbung mit den Antikörpern gegen CD69, CD45RA und CD3 und anschließender FACS-Analyse ermittelt. In keiner analysierten Probe, sowohl von Patienten als auch von Kontrollpersonen, wurde in der Peripherie eine Zellpopulation mit dem Immunophänotyp CD3+ CD45RA+ CD69+ detektiert (Abb. 20a). Dieser Phänotyp ist charakteristisch für Thymozyten, welche demnach auch bei Thymompatienten nicht in nachweisbarer Anzahl in die Peripherie entlassen werden.

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den absoluten Zellzahlen und dem Anteil der zirkulierenden CD3+ T-Zellen in Thymompatienten, verglichen mit den Werten gesunder Kontrollen, gefunden. Dieses Ergebnis war auch unabhängig vom Thymomsubtyp (kortikal:  $p=0.98$  bzw. gemischt:  $p=0.84$ ) (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war der Anteil der zirkulierenden CD3+ CD45RA+ CD69- T-Zellen bei Thymompatienten erhöht, verglichen zur gesunden Kontrollperson. Dies ist exemplarisch in Abb. 20a für einen Thymompatienten und die entsprechende Kontrollperson im Punkt-Diagramm dargestellt. Aus Abb. 20b ist ersichtlich, daß der Anteil der zirkulierenden CD45RA+ T-Zellen von 15 analysierten Thymompatienten mit lymphozytenreichen Subtypen (kortikal und gemischt) signifikant höher ( $p=0.01$ ) war als in geschlechts- und altersangepaßten Kontrollen. Im Gegensatz dazu wurde

---

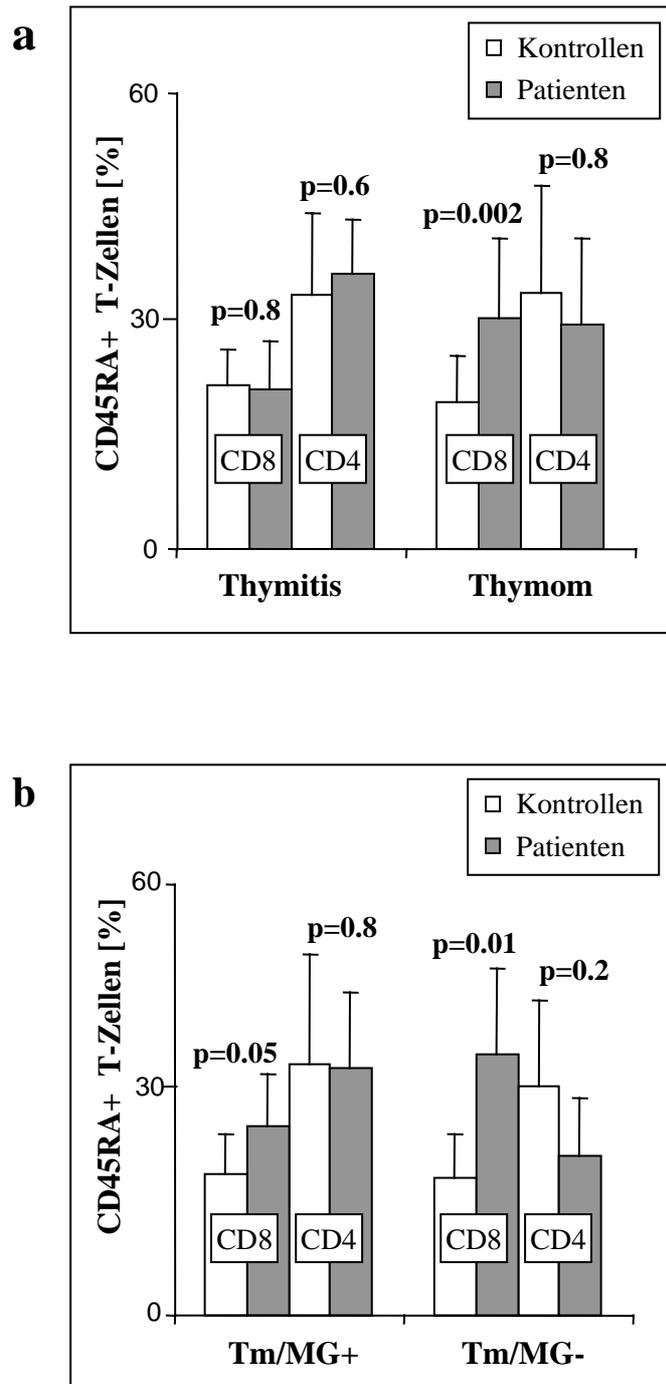
kein Unterschied zwischen den Prozentsätzen dieser Zellen in 11 Patienten ohne Thymom, jedoch mit einer diagnostizierten Thymitis, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen gefunden ( $p=0.95$ ) (Abb. 20b). Ebenso wurde keine Erhöhung des Anteils dieser Zellpopulation im Blut von 6 Patienten mit medullärem Thymom, welches in der Regel lymphozytenarm ist, im Vergleich mit den Kontrollpersonen, festgestellt ( $p=1.0$ ) (Daten nicht gezeigt).



#### 4.3.1.2 Untersuchung des Anteils an CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen im Blut

Aus dem Ergebnis, daß die CD45RA+ T-Zellen im Blut von Thymompatienten erhöht sind, ergab sich die Frage, ob diese Erhöhung gleichmäßig sowohl bei der CD4+ als auch der CD8+ Population zu finden war, oder ob nur der Anteil einer Population erhöht war. Um die Anteile an peripheren CD8+ bzw. CD4+ T-Zellen innerhalb der CD45RA+-Population zu bestimmen, wurden Färbungen mit den Antikörpern gegen das CD4- bzw. CD8-Antigen jeweils in Kombination mit Antikörpern gegen CD45RA und CD3 durchgeführt und mittels FACS analysiert. Der Anteil der CD45RA+ CD8+ T-Zellen im Blut von 15 Thymompatienten war signifikant erhöht ( $p=0.002$ ) gegenüber dem der Kontrollen (Abb. 21a). Ein ähnlicher Anstieg wurde auch im Blut von Patienten mit medullärem Thymom ( $n=6$ ) gefunden ( $p=0.04$ ) (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war der Anteil zirkulierender CD45RA+ CD8+ T-Zellen bei Patienten ohne Thymom, aber mit Thymitis ( $n=7$ ), im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant erhöht ( $p=0.8$ ) (Abb. 21a). Wurden die Thymompatienten mit und ohne MG einzeln analysiert, so ergab sich für die Patienten ohne MG ( $n=6$ ) ein Anstieg dieser Zellpopulation mit einer höheren Signifikanz ( $p=0.01$ ) als für die Patienten mit der Autoimmunerkrankung ( $n=9$ ) ( $p=0.05$ ) (Abb. 21b). Im Gegensatz dazu war der Anteil der CD4+ Population innerhalb der CD45RA+ T-Zellen im Blut von Thymom- und Thymitispatienten nicht signifikant verändert ( $p=0.8$  bzw.  $p=0.6$ ) gegenüber denen der Kontrollen (Abb. 21a).

**Abb. 20: Der Anteil CD45RA+ T-Zellen im Blut von Thymompatienten ist signifikant erhöht.** FACS-Analyse peripherer Blutlymphozyten von Thymom- und Thymitispatienten im Vergleich zu entsprechenden geschlechts- und altersangepaßten Kontrollpersonen. Die angegebenen Anteile (%) der CD45RA+ T-Zellen beziehen sich auf CD3+ Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Mann-Whitney-U-Test. (a) Charakteristische Punkt-Diagramme der CD69- und CD45RA-Expression peripherer Blutlymphozyten einer Kontrollperson verglichen mit der eines Thymompatienten (beide männlich, 64 Jahre alt). Anteile der CD45RA+ T-Zellen im Blut von (b) 15 Thymompatienten bzw. (c) 11 Thymitispatienten jeweils im Vergleich zu entsprechenden gesunden Kontrollen, dargestellt in Abhängigkeit vom Alter der Personen.

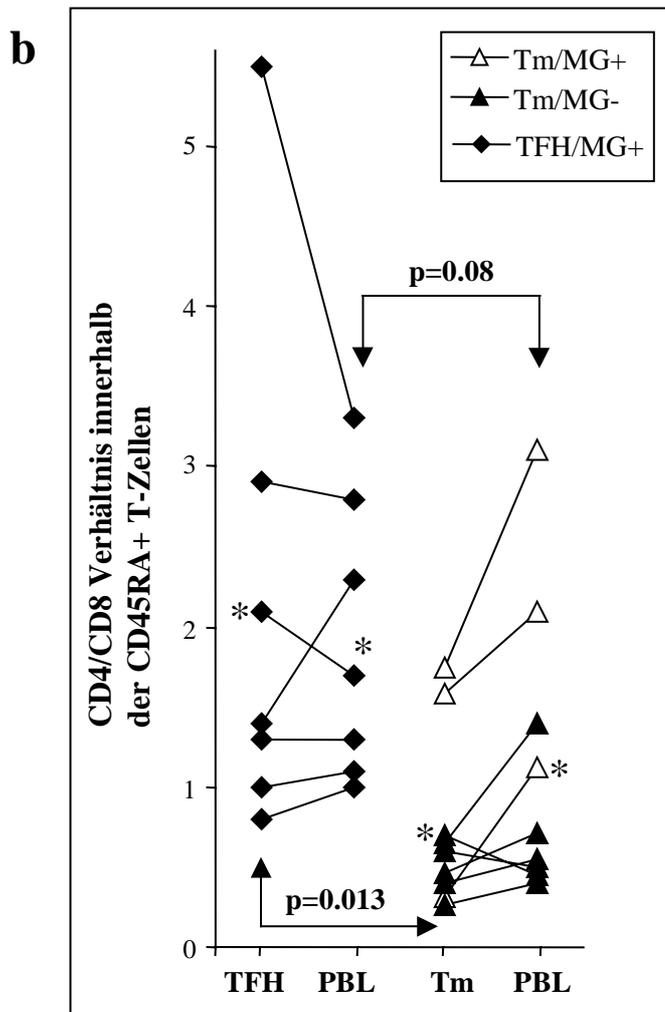
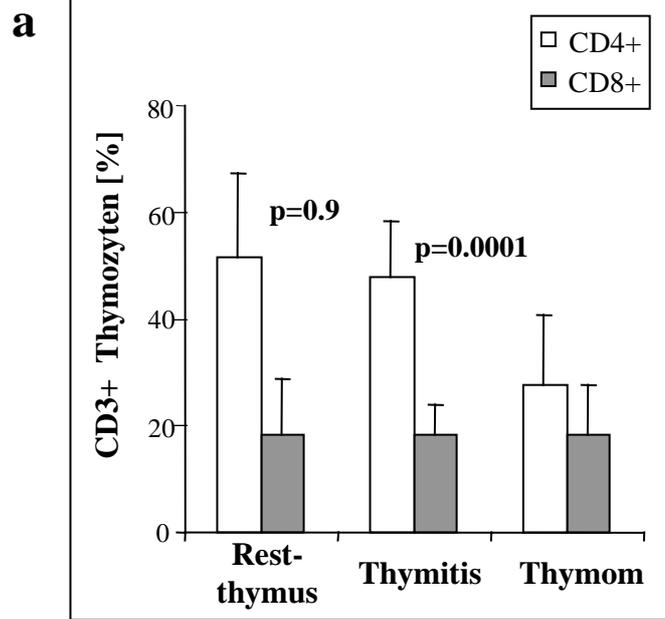


**Abb. 21: Der Anteil der CD8+ Population innerhalb der peripheren CD45RA+ T-Zellen von Thymompatienten ist signifikant erhöht.** Dreifarben-FACS-Analyse der CD4-, CD8- und CD45RA-Expression von PBL. Die angegebenen Anteile (%) beziehen sich auf CD3+ Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Mann-Whitney-U-Test. Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung. Die Balken geben den Mittelwert der Anteile an CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen innerhalb der CD45RA+ Population im Blut von (a) 7 Thymitis- und 15 Thymompatienten bzw. (b) 9 Thymompatienten mit MG (Tm/MG+) und 6 Thymompatienten ohne MG (Tm/MG-) und den entsprechenden Kontrollen an.

#### **4.3.1.3 Ermittlung des CD4/CD8-Verhältnisses unter den reifen T-Zellen in Thymomen und im Thymusgewebe**

Um herauszufinden, ob die Ursache für die erhöhte CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Population im Blut, in einer in Thymomen gegenüber nicht-neoplastischen Thymi veränderten Zusammensetzung der T-Zell-Populationen zu suchen ist, wurden die Anteile an CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> reifen CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Thymomen und in nicht-neoplastischem Restthymus bzw. in der Thymitis mittels FACS untersucht.

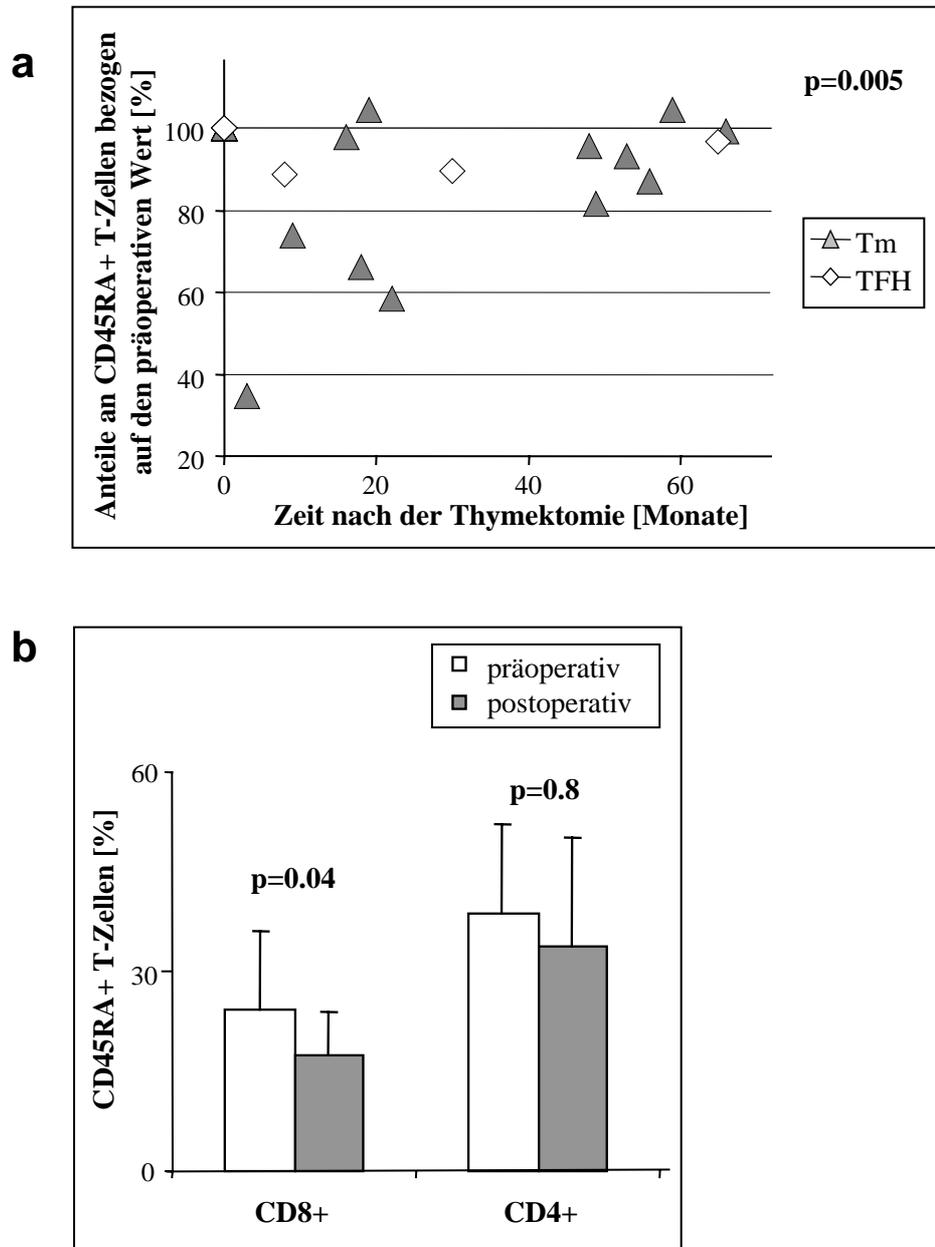
Wie in Abb. 22a zu sehen, waren die Anteile der reifen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Restthymus (n=9), in der Thymitis (n=11) und in den Thymomen (n=19) nahezu gleich (p=0.9). Es ergaben sich ähnliche Prozentsätze an reifen CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der Zellen des Restthymus und der Thymitis (p=0.9), im Gegensatz dazu wurde ein signifikant niedrigerer (p=0.0001) Anteil an CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T-Zellen in Thymomen im Vergleich zu Thymitis bzw. Restthymus gefunden (Abb. 22a). Dieser signifikant erniedrigte Anteil an reifen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Thymomen spiegelte sich insbesondere auch in einem signifikant erniedrigtem (p=0.013) CD4/CD8-Verhältnis innerhalb der CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen in Thymomen gegenüber denen der Thymitis wider. Dieser Befund ist aus Abb. 22b ersichtlich. Das Verhältnis der CD4/CD8 T-Zellen war ebenso innerhalb der zirkulierenden CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen von Thymompatienten gegenüber denen von Thymitispatienten erniedrigt, jedoch ergab die statistische Auswertung hier nur eine Tendenz (p=0.08) (Abb. 22b). Außerdem waren die CD4/CD8-Verhältnisse bei Thymompatienten innerhalb der zirkulierenden CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den Thymozyten erhöht (p=0.07), während die Verhältnisse bei Thymitispatienten für die zirkulierenden T-Zellen und die Thymozyten nahezu identisch waren (p=0.83).



#### 4.3.1.4 Untersuchung des Anteils an peripheren CD45RA+ Zellen nach der Thymektomie

Sollte der erhöhte Anteil an CD45RA+ T-Zellen im Blut von Thymompatienten auf die intra-tumoröse Thymopoese zurückzuführen sein, so wäre zu erwarten, daß sich der Anteil dieser Zellpopulation nach der Tumor-Resektion verändert. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden PBL verschiedener Patienten nach der Thymektomie mit Hilfe der Antikörper gegen CD3 und CD45RA jeweils in Kombination mit Antikörpern gegen CD4 bzw. CD8 gefärbt und mittels FACS analysiert. Die ermittelten Anteile der T-Zell-Populationen wurden mit denen vor der Thymektomie verglichen. Wie aus Abb. 23a ersichtlich waren die postoperativen Werte für die Anteile an CD45RA+ T-Zellen für 15 MG-Patienten gegenüber den präoperativen signifikant erniedrigt ( $p=0.005$ ). Im Gegensatz dazu wurde keine signifikante Erniedrigung ( $p=0.88$ ) bezüglich der absoluten Zellzahlen der PBL nach Thymektomie, verglichen mit denen vor der Operation, gefunden (Daten nicht gezeigt). Der Anteil an CD45RA+ Zellen war auch noch signifikant erniedrigt ( $p=0.02$ ), wenn nur die 12 Thymompatienten in die statistische Berechnung einfließen (Abb. 23a). Wurden die CD4+ und CD8+ Populationen innerhalb der CD45RA+ T-Zellen von 10 Thymompatienten einzeln analysiert, war der postoperative Abfall nur für die CD45RA+ CD8+ T-Zell-Population (Abb. 23b) signifikant ( $p=0.04$ ).

**Abb. 22: Das CD4/CD8-Verhältnis der reifen T-Zellen ist in Thymomen erniedrigt.** (a) Das Balken-Diagramm zeigt die Mittelwerte der Anteile reifer CD4+ und CD8+ Thymozyten im Restthymus ( $n=9$ ), in der Thymitis ( $n=11$ ) und im Thymom ( $n=19$ ). Die Werte wurden durch FACS-Analyse ermittelt und beziehen sich auf CD3+ Zellen. Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung. (b) Im Diagramm werden CD4/CD8-Verhältnisse innerhalb der CD45RA+ T-Zellen in einzelnen Fällen verglichen. Die analysierten T-Zellen wurden aus dem Thymus und Blut (PBL) von 7 Thymitispatienten (TFH) und aus dem Thymom (Tm) und Blut von 9 Thymompatienten isoliert. Die Anteile der CD4/CD8 CD45RA+ T-Zellen wurden für die Thymozyten bzw. PBL eines jeden Patienten mittels FACS ermittelt und auf CD3+ Zellen bezogen. Die Sternchen geben den Mittelwert der Verhältnisse für die Thymozyten bzw. die PBL der beiden Patientengruppen an.

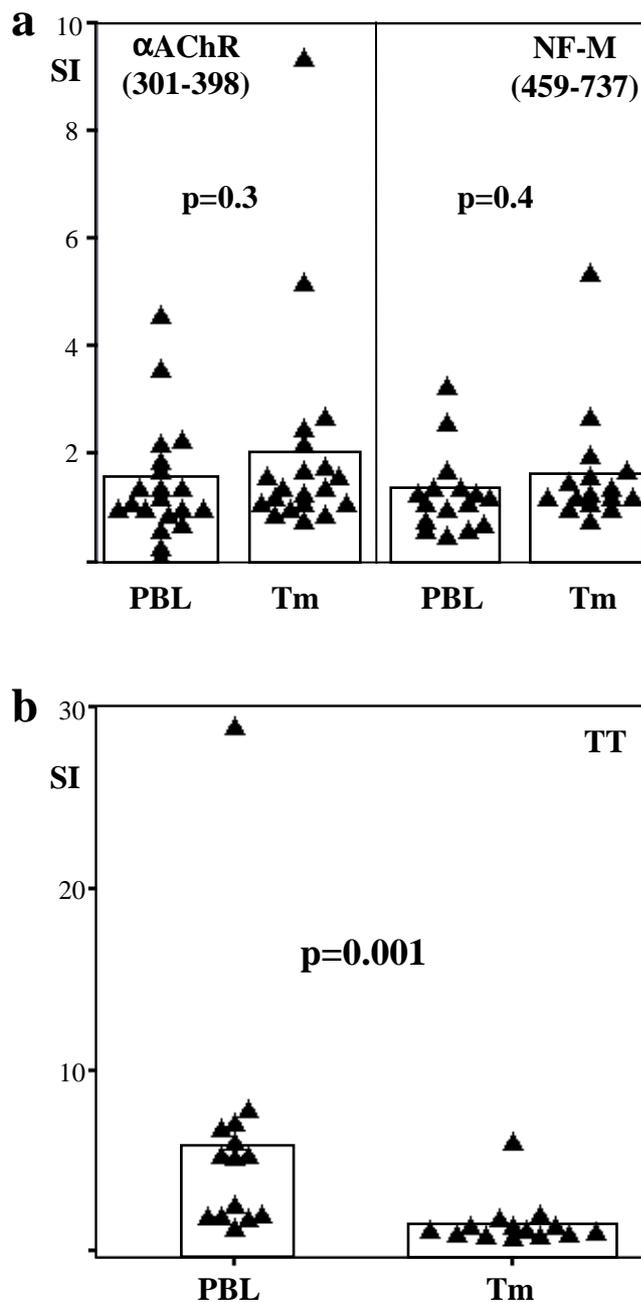


**Abb. 23: Der Anteil an CD45RA+ CD8+ T-Zellen nimmt nach der Thymektomie ab.** Dreifarben-FACS-Analyse der CD4- bzw. CD8-, CD45RA- und CD3-Expression von PBL. Die angegebenen Anteile (%) beziehen sich auf CD3+ Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Mann-Whitney-U-Test. (a) Jedes Dreieck/Rhomben gibt den Prozentsatz zirkulierender CD45RA+ T-Zellen für einen Patienten zu einem bestimmten postoperativen Zeitpunkt und relativ zu dem Prozentsatz dieser Zellpopulation kurz vor der Operation (gesetzt auf 100%) an. (b) Das Balken-Diagramm zeigt die Mittelwerte der CD4+ und CD8+ Populationen innerhalb der zirkulierenden CD45RA+ T-Zellen in 10 Thymompatienten prä- und postoperativ. Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung.

## 4.3.2 Funktionelle Analysen (Proliferationstests)

### 4.3.2.1 Ermittlung Autoantigen-spezifischer T-Zellen im Blut und Thymom

Um einen möglichen Austausch Autoantigen-spezifischer T-Zellen zwischen Thymom und Blut zu ermitteln, wurden T-Zell-Proliferations-Versuche mit Zellen aus beiden Kompartimenten durchgeführt. Es wurde ein Fragment (301-398) des Hauptautoantigens  $\alpha$ -AChR (Nenninger *et al.*, 1998) und ein Fragment (459-737) des Neurofilaments mittleren Molekulargewichtes, welches als ein charakteristisches Autoantigen für Thymompatienten mit MG ermittelt wurde (Teile dieser Arbeit und (Schultz *et al.*, 1999)), als Antigene eingesetzt. Um einen Import von Gedächtnis-T-Zellen aus dem Blut in das Thymom zu überprüfen, wurden T-Zellen aus dem Blut bzw. Thymom außerdem mit dem Fremdanigen Tetanus Toxoid (TT) stimuliert. Ähnliche T-Zell-Proliferationstests wurden als Negativkontrolle mit PBL von Personen ohne MG (n=12) durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den T-Zell-Antworten gegen  $\alpha$ AChR (p=0.3) und NF-M (p=0.4) im Tumor und Blut von Thymompatienten mit MG festgestellt (Abb. 24a). Im Gegensatz dazu waren die T-Zell-Antworten gegen TT signifikant höher (p=0.001) für T-Zellen aus dem Blut verglichen mit Antworten von intratumorösen T-Zellen (Abb. 24b). Anti- $\alpha$ AChR(301-398) T-Zell-Antworten waren signifikant höher (p=0.05) im Blut von Thymompatienten mit MG als bei den gesunden Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Für T-Zell-Antworten gegen das NF-M-Fragment im Blut von Thymompatienten mit MG ergab sich nur eine Tendenz (p=0.08) für einen Unterschied zu den Antworten der Personen ohne MG (Daten nicht gezeigt). In früheren Studien (siehe Teile dieser Arbeit und (Schultz *et al.*, 1999)) konnte gezeigt werden, daß intratumoröse Thymozyten von Myasthenie-Patienten signifikant höhere T-Zell-Antworten gegen  $\alpha$ AChR und NF-M zeigten als intratumoröse Thymozyten von Patienten ohne MG. Die Ähnlichkeit zwischen den früheren Ergebnissen und den neuen Resultaten bezüglich der PBL geben den Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Autoreaktivität im Blut und der intratumorösen Thymopoese.



**Abb. 24: Autoantigen-spezifische T-Zellen sind im Thymom und Blut von Thymompatienten gleichermassen verteilt.** Das Streu-Diagramm zeigt die Proliferationsantworten peripherer T-Zellen (PBL) und intratumoröser Thymozyten (Tm), isoliert von Patienten mit Thymom-assoziiierter MG. (a) Rekombinante Fragmente der  $\alpha$ -Untereinheit des Azetylcholinrezeptors ( $\alpha$ AChR, 301-398) und des Neurofilaments mittleren Molekulargewichts (NF-M, 459-737) wurden als stimulatorische Antigene eingesetzt; Tetanus Toxoid (TT) als sogenanntes „recall“-Antigen in (b). Die Proliferationsantworten wurden als Stimulationsindex (SI) berechnet (siehe Material und Methoden). Jedes Dreieck entspricht dem SI der PBL bzw. Tm von einem individuellen Patienten; die Balken geben den Mittelwert der SI-Werte innerhalb der PBL bzw. Tm für das entsprechende Antigen an. Das Antigen  $\alpha$ AChR wurde an 19, NF- M an 16 und TT an 14 Proben getestet.

## 4.4 Untersuchung des Chemokin-Profiles in Thymom- bzw. Thymusgewebe

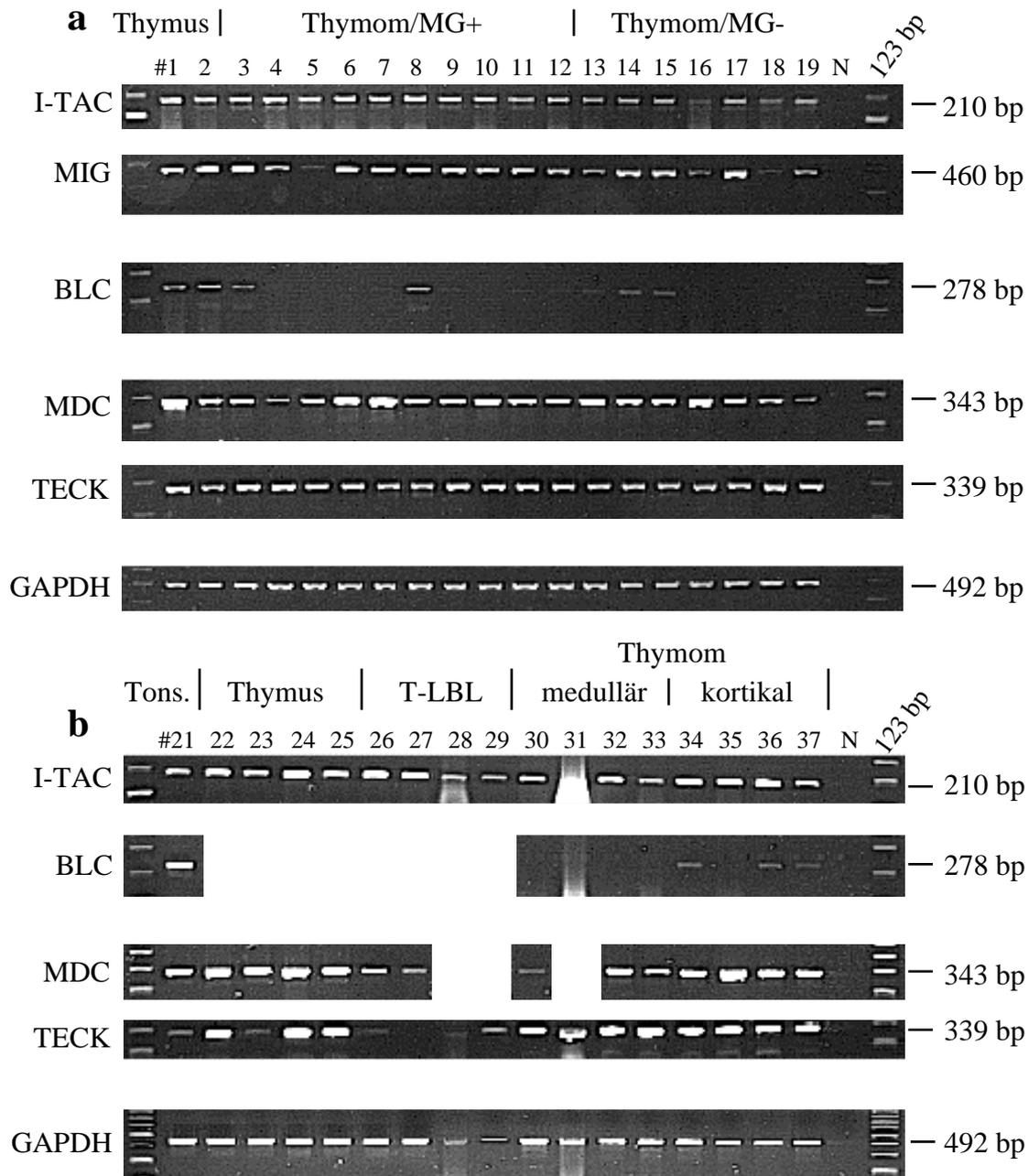
Wie in Abb. 24b dargestellt wurde anhand von Tetanus Toxoid-spezifischen T-Zellen gezeigt, daß die Migration von Gedächtnis-T-Zellen aus der Peripherie in das Thymom nicht stattzufinden scheint. Außerdem ist bekannt, daß die Zell-Zusammensetzung im Thymom- bzw. Thymitisgewebe signifikante Unterschiede aufweist. So ist etwa in der Thymitis und im normalen Thymusgewebe eine viel größere Anzahl an B-Zellen vorhanden als in Thymomen (Fend *et al.*, 1993; Marx and Müller-Hermelink, 1999). Außerdem unterscheiden sich auch die reifen T-Zellpopulationen in Thymomen signifikant von denen des nicht-neoplastischen Thymus (Helmreich, 1999). Um mögliche Ursachen für diese Unterschiede zu ergründen, wurde das Chemokin-Profil im Thymom- bzw. Thymusgewebe mittels RT-PCR untersucht. Hintergrund dieser Untersuchungen ist die Tatsache, daß Chemokine an der Migration von Zellen maßgeblich beteiligt sind und daher eine ursächliche Bedeutung für die unterschiedlichen Zellzusammensetzungen in Thymomen im Vergleich zum Thymus haben könnten.

### 4.4.1 RT-PCR-Analysen der Chemokinexpression

Die Expression der Chemokine wurde mittels semiquantitativer RT-PCR im Thymom- bzw. Thymusgewebe verschiedener Patienten (siehe Tabelle 13 bzw. Tabelle 14 im Anhang) untersucht. Es wurde lymphozytenreiches Thymomgewebe (kortikale bzw. gemischte Thymome) von Patienten mit oder ohne MG und nicht-neoplastisches Thymusgewebe von Thymitispatienten eingesetzt. Als Kontrollen dienten Thymusgewebe einer Normalperson, lymphozytenarme medulläre Thymome und Thymusbiopsien (Mediastinum (Med)) bzw. Lymphknoten (LK) von Patienten mit einem T-Zell-lymphoblastischen Lymphom (T-LBL).

Untersucht wurde im speziellen die Expression folgender Chemokine:

- A) durch Interferon- $\gamma$  induzierbare Chemokine: I-TAC (Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant) und MIG (Monokine induced by interferon- $\gamma$ )
- B) Thymus-spezifische Chemokine: MDC (Macrophage-derived chemokine) und TECK (Thymus-expressed chemokine)
- C) das B-Zell-spezifische Chemokin BLC (B-lymphocyte chemoattractant).



**Abb. 25: RT-PCR-Nachweis der Chemokine I-TAC, MIG, BLC, MDC und TECK im Thymusgewebe.** Die Proben wurden auf einem 1.5%igen Agarosegel analysiert. PCR-Bedingungen: siehe unter 6.2. Die GAPDH-PCR (22 Zyklen) diente als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR. I-TAC: Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant, MIG: Monokine induced by interferon  $\gamma$ , BLC: B-lymphocyte chemoattractant, MDC: Macrophage-derived chemokine, TECK: Thymus-expressed chemokine, N: Negativkontrolle. (a) Spuren 1-2: Thymusgewebe, Spuren 3-12: Thymomgewebe assoziiert mit MG, Spuren 13-19 Thymomgewebe ohne MG. Patientendaten siehe Tabelle 13 im Anhang. (b) Spur 21: Tonsillengewebe (Tons.), Spuren 22-25: Thymusgewebe, Spuren 26-29: T-Zell lymphoblastisches Lymphom (T-LBL), Spuren 30-33: medulläres Thymomgewebe, Spuren 34-37: kortikales Thymomgewebe. Patientendaten siehe Tabelle 14 im Anhang.

Wie aus Abb. 25a ersichtlich, wurden die mRNAs der Thymus-spezifischen Chemokine MDC und TECK in allen untersuchten Thymus- bzw. kortikalen und gemischten Thymomgeweben detektiert. Für das Chemokin MDC wurde eine teils stärkere, teils schwächere Expression im Gewebe einzelner Patienten ermittelt, welche jedoch nicht mit einem bestimmten histologischen Thymomtyp oder dem MG-Status korrelierte (Abb. 25a).

Bei der Untersuchung weiterer nicht-neoplastisch veränderter Thymi im Vergleich zu medullären und kortikalen Thymomen bzw. T-LBL-Gewebe (Abb. 25b) wurde die höchste MDC-Expression im Thymus und im kortikalen Thymomgewebe festgestellt. Die Expression in 3 medullären Thymomen (Spuren 30, 32, 33) und 2 T-LBL Biopsaten (Spuren 26+27) war dagegen vergleichbar schwächer als in kortikalen und gemischten Thymomen. (Die Spuren 28, 29 und 31 in Abb. 25b fehlen, da von diesen Fällen keine cDNA mehr zur Verfügung stand.) Ebenso wurde das Chemokin von reifen mononukleären Zellen aus dem Tonsillengewebe exprimiert, welches als Positivkontrolle diente (Abb. 25b, Spur 1). Diese Ergebnisse sprechen für eine Korrelation der Expressionsstärke von MDC mit dem histologischen Thymomtyp (kortikal/gemischt > medullär).

Für die TECK-mRNA wurde in allen zunächst untersuchten Thymus- bzw. lymphozytenreichen Thymomgeweben (kortikal, gemischt) unabhängig von der MG-Assoziation ein nahezu identisches Signal detektiert (Abb. 25a). Auch die Untersuchung lymphozytenarmer medullärer Thymome, vergleichend zu lymphozytenreichen kortikalen, ergab keinen Unterschied hinsichtlich der TECK-Expression (Abb. 25b, Spuren 30-37). Dieses Ergebnis war wiederum unabhängig vom MG-Status. Die TECK-Expression scheint demnach weder durch die Anzahl der Lymphozyten im Thymom noch durch den Epitheltyp beeinflusst zu werden und ist außerdem unabhängig vom MG-Status der Patienten.

Außerdem konnte die TECK-Expression in 3 von 4 nicht-neoplastisch veränderten Thymi in vergleichbarer Stärke zu der in Thymomen ermittelten nachgewiesen werden (Abb. 25b, Spuren 22-25). Die Expression von TECK scheint demnach in Thymomen im Vergleich zum nicht-neoplastischen Thymus nicht verändert zu sein. Für eine genaue Beurteilung müßten jedoch noch weitere Fälle nicht-neoplastischer Thymi herangezogen werden.

Obwohl es sich bei TECK laut Literaturangaben (Zlotnik *et al.*, 1999) um ein Thymus- und Dünndarm-spezifisches Chemokin handeln soll, konnte auch in Tonsillengewebe eine sehr schwache Expression detektiert werden (Abb. 25b, Spur 1). Nur eine geringe Expression oder keine wurde in den LK-Biopsien dreier Patienten mit T-LBL nachgewiesen (Abb. 25b, Spuren 26-28), da diese Biopsien keine Thymusepithelzellen oder thymische dendritische Zellen enthalten. Dieses Ergebnis zeigt außerdem, daß unreife T-Zellen kein TECK produzieren. Im Gegensatz dazu konnte in einer Biopsie aus dem Mediastinum eines Patienten mit T-LBL,

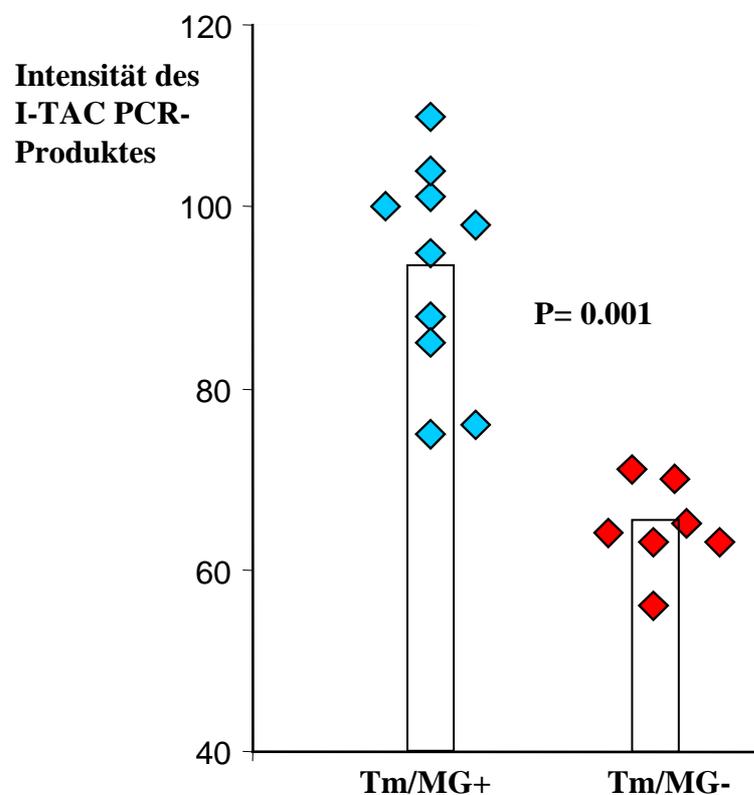
obwohl in der Biopsie immunhistologisch keine Epithelzellen nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt.), eine etwas stärkere TECK-Expression nachgewiesen werden (Abb. 25b, Spur 29), eventuell zurückzuführen auf die Produktion durch dendritische Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß TECK spezifisch mit der höchsten Expressionsrate von Thymusepithelzellen (auch neoplastisch veränderten) exprimiert wird.

Bei der Untersuchung des Expressionsmusters für die durch Interferon- $\gamma$  induzierbaren Chemokine I-TAC und MIG ergab sich ein ähnliches Bild (siehe Abb. 25a). Auch die mRNA dieser beiden Chemokine konnte in allen Geweben gefunden werden. Wurde eine verminderte Expression für das eine Chemokin im Gewebe eines Patienten detektiert, so war die Expression des anderen Chemokins in diesem Gewebe ebenfalls vermindert (siehe Abb. 25a, Spuren 5, 13, 16 und 18). I-TAC und MIG scheinen demnach im Thymus einer ähnlichen Expressionskontrolle zu unterliegen. Eine Quantifizierung des I-TAC-PCR-Produktes (siehe Tabelle 7 sowie Abb. 26) ergab eine signifikante Erhöhung ( $p=0.001$ ) der Expression dieses Chemokins in MG-assoziierten Thymomen im Vergleich zu MG-negativen Thymomen.

Die Untersuchung der I-TAC-Expression in weiteren nicht-neoplastischen Thymi im Vergleich zu kortikalen Thymomen ergab keinen Unterschied in der Expressionsstärke (Abb. 25b, Spuren 22-25 bzw. 34-37). Im Gegensatz dazu war in 2 von 4 medullären Thymomen die Expression vermindert (Spuren 31 + 33). Auch in den Biopsien von T-LBL-Patienten ließ sich eine I-TAC-Expression nachweisen (Spuren 26-29). Für die zwei Fälle, bei denen eine schwächere Expression gefunden wurde (Spuren 28 + 29), ist auch die GAPDH-PCR etwas schwächer als in den anderen Fällen, so daß eine vergleichbar hohe Expression wie die der Fälle 26 + 27 extrapoliert werden könnte. Ebenso wird I-TAC von Tonsillenzellen exprimiert (Abb. 25b, Spur 21). Zusammenfassend wird I-TAC also in lymphozytenreichen und einigen lymphozytenarmen Thymomen sowie in nicht-neoplastischen Thymi ähnlich stark exprimiert; die Expression in Thymomen (gemischt und kortikal) ist jedoch signifikant mit dem MG-Status korreliert.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Chemokinen wurde BLC (BCA-1) nur in wenigen Geweben exprimiert (Abb. 25a). Ein Signal konnte unter 19 Fällen in den beiden nicht-neoplastischen Thymi (Spuren 1+2), in 2 kortikalen Thymomen mit MG (Spuren 3 + 8) und 2 Thymomen (kortikal und gemischt) ohne MG (Spuren 14+15) (Abb. 25a) detektiert werden. Da im Vergleich zum Thymus in Thymomen in der Regel nur wenige B-Zellen vorkommen (Fend *et al.*, 1991), hat der Faktor BLC möglicherweise einen Einfluß auf die Migration von B-Zellen in den Thymus bzw. in Thymome. Es ergab sich keine Korrelation zwischen der BLC-Expression und dem MG-Status der Patienten.

In einer zweiten Untersuchungsserie wurden lymphozytenarme medulläre und lymphozytenreiche kortikale Thymome vergleichend untersucht. Die höchste Expression des B-Zell-spezifischen Chemokins wurde im Tonsillengewebe detektiert, welches als Positivkontrolle diente (Abb. 25b, Spur 1). Von diesem Gewebe ist bekannt, daß es viele B-Zellen enthält. Keine Expression konnte für die medullären Thymome (n=4) ermittelt werden. Bei den kortikalen Thymomen waren wiederum 3 von 4 Fällen positiv. Diese Ergebnisse legen zusammenfassend einen Einfluß des Faktors BLC auf die B-Zell-Migration nahe, da die höchsten Expressionsstärken in den B-Zell-reicheren Geweben gefunden wurden.



**Abb. 26: Die Expression des Chemokins I-TAC ist in MG-assoziierten Thymomen signifikant erhöht.** Die Intensität der PCR-Banden für das Chemokin I-TAC (Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant) wurde aus der Abb. 25a mittels des Programmes NIH Image 1.59/fat (Apple Macintosh) densitometrisch quantifiziert (Meßdaten siehe Tabelle 7). Jeder Rhombus entspricht der Intensität der PCR-Bande für das Thymomgewebe eines Patienten. Die Balken geben die Mittelwerte für die jeweilige Patientengruppe an. Tm/MG+: Thymompatienten mit assoziierter Myasthenia gravis (n=10, Mittelwert=93+/-12), Tm/MG-: Thymompatienten ohne MG (n=7, Mittelwert=65+/-5).

#### 4.4.2 Immunhistochemische Färbungen

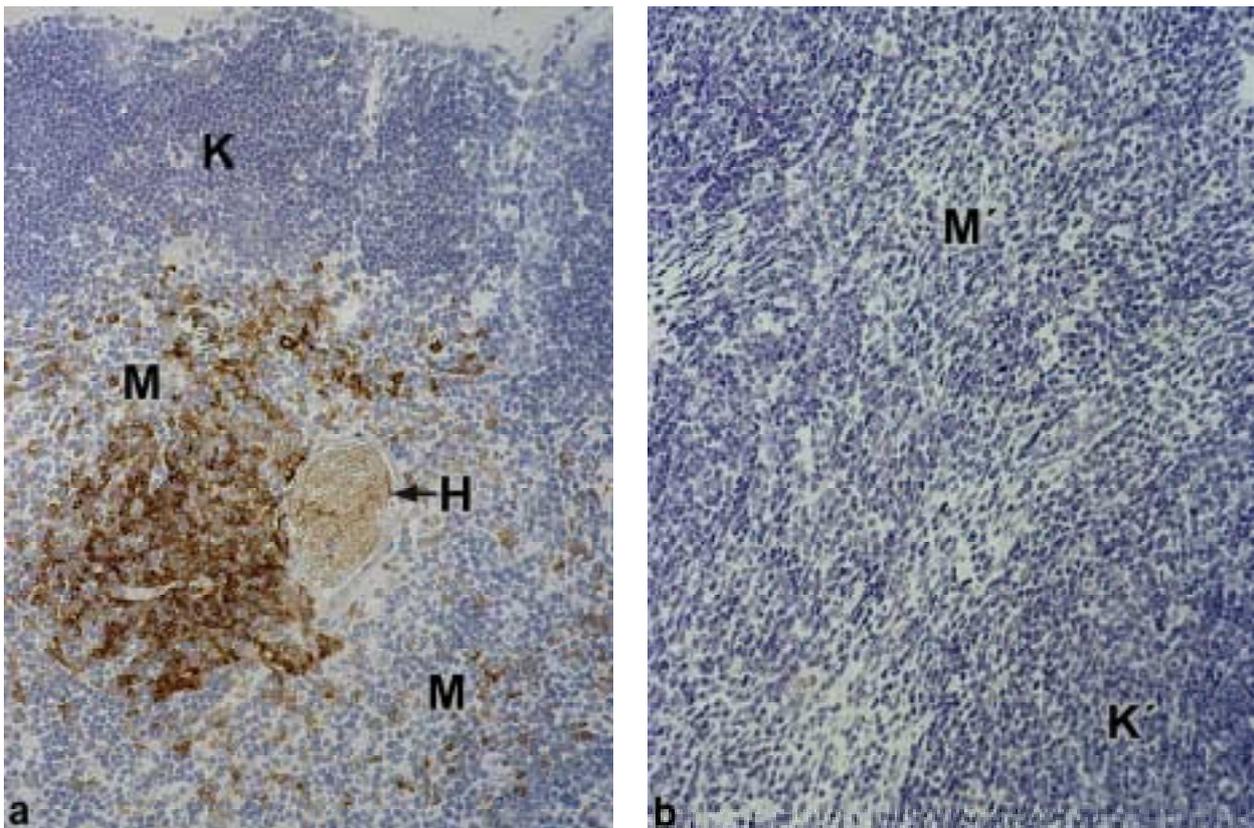
Da sich hinsichtlich der Expression des B-Zell-spezifischen Chemokins BLC anhand der RT-PCR-Ergebnisse Unterschiede in den verschiedenen thymischen Geweben ergaben, wurde mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen die Anzahl der B-Zellen in den Geweben semiquantitativ ermittelt. Die Färbungen erfolgten mit dem B-Zell-spezifischen Antikörper CD22 (DAKO, Hamburg). In Abb. 27 sind exemplarisch die Färbungen für einen Normalthymus und ein Thymom dargestellt. Im Normalthymus ist deutlich ein B-Zell-reiches Areal innerhalb der Medulla zu erkennen (Abb. 27a), wohingegen das Thymom keine B-Zellen enthält (Abb. 27b).

In der folgenden Tabelle 8 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen dargestellt. Es wurden Parallelschnitte zu denjenigen Schnitten gefärbt, die auch mittels der RT-PCR analysiert worden waren (siehe Tabelle 13, im Anhang).

Vergleicht man die in der Tabelle 8 aufgeführten, auf den immunhistochemischen Färbungen basierenden, Bewertungen der B-Zell-Anzahl in den verschiedenen Thymus- und Thymomgeweben mit den Ergebnissen der RT-PCR-Analyse (Abb. 25a), so ergaben sich in den meisten Fällen (17 von 19) Übereinstimmungen. Bei einer Bewertung von (+++) bzw. (++) der B-Zell-Anzahl ließ sich auch durch die RT-PCR ein deutliches BLC-Signal ermitteln (Abb. 25b, Spuren 1+2). Bei einer Bewertung von (+) ergab sich dementsprechend ein schwächeres PCR-Signal (Spuren 3, 8, 13, 14). Bei einer Bewertung von (+/-) bzw. (-) war ein sehr schwaches bzw. gar keine PCR-Bande detektierbar. Lediglich für die Fälle 4 und 15 konnte keine Korrelation zwischen der B-Zell-Anzahl und der BLC-Expression ermittelt werden (Abb. 25b). Im Fall 4 wurden B-Zellen mittels Immunhistochemie angefärbt, jedoch konnte auch bei wiederholter Analyse kein BLC-Signal festgestellt werden. Im Fall 15 enthielt das Gewebe keine B-Zellen, dennoch wurde ein schwaches BLC-Signal mittels PCR detektiert. Eine Korrelation zwischen der B-Zell-Anzahl in den Thymomgeweben und dem MG-Status der Patienten lag offensichtlich nicht vor. Die positive Korrelation zwischen B-Zell-Anzahl und BLC-Genexpression spricht für eine Rolle des Chemokins BLC bei der B-Zell-Migration in den Thymus bzw. das Thymom. Die Ausnahmen von dieser Regel legen jedoch nahe, daß auch noch andere bisher unbekannte Faktoren einen Einfluß auf die B-Zell-Migration haben.

**Tabelle 8: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der B-Zellen und densitrometrischen Quantifizierung der BLC-Expression (siehe Abb. 25a) mittels des Programmes NIH Image 1.59/fat (Apple Macintosh)**

Nr.	Gewebe	Ergebnis der Färbung mit mAK anti-CD22 an Nativgewebe (Verdünnung 1:200)	Bewertung	BLC-Expression
1	NT	Zahlreiche medulläre B-Zellen, keine Follikel	++	87
2	TFH/MG+	Große und viele Follikel, mit Keimzentren (KZ) neben wenigen normalen medullären B-Zell-Arealen	+++	86
3	CT/MG+	3 kleine Follikel, 1 kleines KZ außerhalb des Tumors	+	81
4	CT/MG+	4 intratumoröse mittelgroße Follikel und KZ, ähnlich dicht wie Normalthymus	++	63
5	CT/MG+	Wenige B-Zellen und medulläre Inseln	-/+	61
6	CT/MG+	Wenige B-Zellen und perivaskuläre Räume (PVS)	-/+	63
7	CT/MG+	Wenige B-Zellen und medulläre Inseln	-/+	65
8	WDTC/MG+	5 kleine Follikel, keine KZ	+	77
9	CT/MG+	Wenige B-Zellen, extratumorös	-/+	57
10	MXT/MG+	Einzelne B-Zellen im Randbereich	-/+	55
11	MXT/MG+	5-10 B-Zellen im ganzen Schnitt	-/+	53
12	MXT/MG+	Keine B-Zellen im Schnitt	-	49
13	CT/MG-	Relativ viele B-Zellen in medullären Inseln	+	59
14	CT/MG-	Sehr wenige B-Zellen (< 100)	+	71
15	MXT/MG-	Keine B-Zellen im Schnitt	-	70
16	MXT/MG-	Keine B-Zellen im Tumor, kleiner Herd außerhalb	-/+	38
17	MXT/MG-	10-20 B-Zellen im Schnitt	-/+	39
18	MXT/MG-	Im Tumor keine B-Zellen, 3-4 Follikel ohne KZ im Restthymus	-/+	38
19	MXT/MG-	2 kleine medulläre Inseln mit wenigen B-Zellen	-/+	42



**Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis von B-Zellen in thymischem Gewebe.** (a) Immunhistochemischer Nachweis von unterschiedlich dicht gelagerten B-Zellen in der Medulla (M) eines normalen Thymus mit einem monoklonalen anti-CD22 Antikörper (Verdünnung 1:200). Die braun gefärbten B-Zellen liegen typischerweise in der Nachbarschaft eines Hassall'schen Körperchens (H). Die kräftiger blau gefärbten (zellreicheren) Thymuskortexareale (K) sind in charakteristischer Weise frei von B-Zellen. (b) Fehlender Nachweis von B-Zellen in einem gemischten Thymom, in dem die blassblauen medulla-ähnlichen (M') und dunkleren kortexähnlichen (K') Areale gut voneinander abgrenzbar sind. (Immunoperoxidase, x100).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Identifikation des NF-M-Proteins in Thymomen und Zusammenhang mit der paraneoplastischen MG

Die abnorme Expression eines als p153 bezeichneten Proteins (Marx *et al.*, 1990), welches ein AChR-ähnliches Epitop enthält, wurde für epitheliale Zellen von MG-assoziierten kortikalen Thymomen beschrieben (Kirchner *et al.*, 1988b). Dieses Protein wird durch den Antikörper mAK 155 erkannt, welcher gegen das zytoplasmatische Epitop VICE (very immunogenic cytoplasmic epitope) auf der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR gerichtet ist (Tzartos and Remoundos, 1992). Eine andere Studie konnte außerdem die Überexpression des Neurofilamentes mittleren Molekulargewichtes (NF-M) innerhalb neoplastischer epithelialer Zellen kortikaler Thymome nachweisen (Marx *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß p153 und NF-M identische Proteine sind. Dieser Nachweis wurde zum einen durch eine Western Blot-Analyse zum anderen durch die Bestimmung des AChR-ähnlichen Epitops auf dem NF-M-Protein mittels Peptid-Spotting geführt. Es konnten 5 identische, repetitive Bindungsstellen des mAK 155 auf dem NF-M-Protein mit der Sequenz KSPVEEK ermittelt werden, welche eine Ähnlichkeit zum zytoplasmatischen Epitop VICE (KSAIEGIK) (Tzartos and Remoundos, 1992) auf der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR aufwiesen (siehe Abb. 4c).

Für die Expression des Proteins p153 wurde eine signifikante Assoziation mit dem Vorkommen einer paraneoplastischen MG nachgewiesen (Kirchner *et al.*, 1988b; Marx *et al.*, 1997). Da die beiden Proteine p153 und NF-M identisch sind, ist also auch die Expression des NF-M-Proteins mit der MG assoziiert. Dementsprechend interessierte die Frage, inwiefern NF-M die Autoimmunisierung beeinflusst. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst T-Zell-Proliferationstests mit dem bereits von A. Schultz rekombinant hergestellten Fragment des NF-M-Proteins, welches das Epitop des mAK 155 enthält, durchgeführt. Intratumoröse T-Zellen wurden aus Thymomen bzw. Thymitis isoliert und mit dem Protein stimuliert. Wie in Abb. 13a gezeigt, bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den T-Zell-Antworten von Thymompatienten mit MG verglichen mit Patienten ohne MG ( $p=0.02$ ) oder Thymitispatienten ( $p=0.01$ ). Dieses Ergebnis bedeutet, daß sich nur in Thymompatienten mit MG erhöhte NF-M-Antworten nachweisen liessen. Das Vorkommen NF-M-reaktiver T-Zellen war signifikant mit dem Auftreten einer paraneoplastischen MG korreliert (Abb. 13a). Insbesondere fan-

den sich auch die höchsten Stimulationsindizes und die höchsten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbauraten (cpm-Werte) bei Thymompatienten mit MG.

Dieses Ergebnis ist außerdem vor dem Hintergrund zu bewerten, daß sich in Thymomen im Vergleich zur Thymitis signifikant weniger reife CD3<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> T-Zellen befanden (Abb. 12), welche Antigen-spezifisch proliferieren können (Vanhecke *et al.*, 1995a). Die beschriebene signifikant erhöhte Proliferation gegenüber dem Fragment NF-M-B (459-737) bei Thymompatienten mit MG wird also durch anteilig weniger reife T-Zellen hervorgerufen.

Zusätzlich wurde auch die Proliferation AChR-spezifischer T-Zellen untersucht. Nach der Stimulation mit AChR (301-398) war diese spezifische Proliferation bei Thymompatienten mit MG im Vergleich zu Thymompatienten ohne MG signifikant erhöht ( $p=0.01$ ). Außerdem ergab sich eine Tendenz für höhere anti-AChR-Antworten bei Thymitispatienten im Vergleich zu Patienten ohne MG ( $p=0.08$ ) (siehe Abb. 13b). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden erhöhte T-Zell-Antworten gegen den AChR bereits für MG-Patienten mit und ohne Thymom beschrieben (Sommer *et al.*, 1991; Vincent and Willcox, 1994; Wang *et al.*, 1997; Willcox, 1993). Ähnlich wie bei den NF-M-Antworten wurden auch die höchsten anti-AChR(301-398)-Antworten in Thymompatienten mit MG gefunden, obwohl dieses Fragment der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR nicht als das vorzugsweise immunogene gilt (Nagvekar *et al.*, 1998a). Warum die beiden Proteine NF-M und  $\alpha$ AChR (301-398) vergleichbar T-Zell-Antworten auslösen, ist nicht bekannt. Das lineare Epitop, welches sich in beiden Proteinen befindet (siehe Abb. 4), spielt vermutlich als T-Zell-Epitop keine Rolle, da in T-Zell-Proliferationsassays mit den entsprechenden Peptiden keine erhöhten T-Zellantworten ermittelt werden konnten (A. Schultz, unveröffentlicht). Zusammenfassend lassen sich also AChR-reaktive T-Zellen in MG-Patienten allgemein detektieren, wohingegen signifikant erhöhte NF-M-Antworten nur für MG-Thymompatienten charakteristisch sind.

Der Zusammenhang zwischen der NF-M-Expression in Thymomen und den erhöhten anti-NF-M-Antworten ist zur Zeit noch ungeklärt. Jedoch konnten T-Zell-Antworten gegen NF-M in MG-Patienten mit kortikalen und gemischten Thymomen detektiert werden. In beiden Thymomtypen wird NF-M exprimiert, jedoch in sehr unterschiedlicher Stärke (Marx *et al.*, 1996). In gemischten Thymomen konnte eine NF-M-Expression nur mittels Immunopräzipitation festgestellt werden (unveröffentlicht). Aus diesem Grunde unterstützen die Daten dieser Arbeit eine Assoziation zwischen Thymom-assoziiierter MG und anti-NF-M T-Zell-Autoimmunität, geben jedoch keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen einer erhöhten intratumorösen NF-M-Expression und anti-NF-M Autoimmunität.

Da kortikale und gemischte Thymome Tumoren mit Thymus-ähnlichen Eigenschaften darstellen, in denen reife T-Zellen gebildet werden (Nenninger *et al.*, 1998), könnte die intratumorö-

se Expression des NF-M-Proteins durch eine abnorme positive Selektion innerhalb des Tumors zu der Generierung NF-M reaktiver T-Zellen führen (Marx *et al.*, 1997). Körper eigene Proteine werden mittels thymischer Epithelzellen präsentiert und beeinflussen die positive Selektion unreifer Thymozyten (Hu *et al.*, 1997; Sant'Angelo *et al.*, 1997), wobei die Erkennung der Selbst-Peptide degenerativ ist (Ignatowicz *et al.*, 1996). Aus diesem Grunde könnte durch die Expression des NF-M-Proteins in Thymomen sowohl das NF-M- als auch das AChR-reaktive T-Zell-Repertoire von Thymompatienten beeinflusst werden, speziell also die Generierung AChR-reaktiver T-Zellen zur Folge haben. Dies paßt zu dem Ergebnis einer signifikant positiven Korrelation zwischen den T-Zell-Antworten gegen NF-M und  $\alpha$ AChR (301-398) (siehe Abb. 13c). Zusätzlich bietet die Hypothese einer falsch-positiven Selektion von T-Zellen in Thymomen im Vergleich zu einer normalen Selektion im nicht-neoplastischen Thymus eine Erklärung für das breitere Spektrum autoreaktiver T-Zellen, welche bei Thymompatienten, nicht aber bei Thymitispatienten gefunden werden.

Außerdem könnten abnorm exprimierte Proteine in Thymomen an der Pathogenese der paraneoplastischen MG durch die Aktivierung einer geringen Anzahl reifer Autoantigen-spezifischer T-Zellen innerhalb des Tumors beteiligt sein (Nenninger *et al.*, 1998; Sommer *et al.*, 1990).

Da Autoantikörper in Thymomen nur in sehr seltenen Fällen gebildet werden (Fujii *et al.*, 1984), müssen intratumoröse autoreaktive T-Zellen zu den extratumorösen lymphoiden Organen exportiert werden, um pathogenetisch (myasthenogen) relevant werden zu können (Müller-Hermelink and Marx, 2000). Die Korrelation zwischen dem Vorkommen AChR-reaktiver T-Zellen und seropositiver paraneoplastischer MG unterstützt diese Hypothese (Willcox, 1993). In ähnlicher Weise läßt sich das Vorkommen NF-M-spezifischer T-Zellen bei Thymompatienten mit einer assoziierten MG deuten, insbesondere da NF-M-spezifische Autoantikörper im Serum von MG Thymompatienten nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt.).

Wie die extratumoröse Aktivierung Autoantigen-spezifischer T-Zellen geschieht, ist bisher unklar. Die Diversifikation der T-Zellantwort erfolgt durch intra- bzw. intermolekulares „determinant spreading“ (Kaufman *et al.*, 1993; Vincent *et al.*, 1998b) Die daraus resultierende Heterogenität der T-Zell-Spezifität mag zu dem breiten Autoantikörper-Spektrum beitragen, welches für die paraneoplastische MG beschrieben wird (Cikes *et al.*, 1988; Marx *et al.*, 1992).

Abschließend konnte in diesem Teil der Arbeit nachgewiesen werden, daß NF-M-reaktive T-Zellen speziell bei Thymompatienten mit MG vorkommen und deshalb vermutlich zu der charakteristischen Pathogenese der paraneoplastischen MG beitragen.

*In vitro* Studien bzw. die Analyse transgener Mäuse könnten beweisen, daß die abnorme Präsentation von NF-M-Peptiden durch epitheliale Zellen direkt an der positiven Selektion NF-M- und AChR-reaktiver T-Zellen beteiligt ist. Um festzustellen, ob es sich bei den gegen die zytoplasmatische Domäne des AChR- und den NF-M-reaktiven T-Zellen um dieselben Zellen handelt, müßten Studien mit AChR- und NF-M-Peptiden durchgeführt werden, durch die kreuz-reagierende T-Zellen identifiziert werden könnten. Außerdem wären Proliferationstests mit geklonten T-Zellen hilfreich, um die genaue Spezifität der T-Zellen zu ermitteln; vor allem, da bisher nur T-Zell-Klone gegen extrazelluläre Epitope des AChR etabliert werden konnten (Nagvekar *et al.*, 1998b).

## **5.2 Ermittlung autoreaktiver T-Zellen gegen weitere NF-M-Fragmente und gegen Fragmente der Delta-Untereinheit des AChR**

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit eine signifikant erhöhte T-Zell-Proliferation bei Thymompatienten mit MG nach Stimulation mit dem mittleren Fragment (459-737) des NF-M-Proteins (NF-M-B) festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich überprüft, ob auch autoreaktive T-Zellen gegen andere Bereiche des NF-M-Proteins in MG-Patienten gefunden werden können. Zu diesem Zweck wurden die beiden Fragmente 1-465 und 736-916 kloniert und als rekombinante Fusionsproteine exprimiert (siehe 4.1.2.1 bzw. 4.1.2.2).

Zunächst wurde für beide rekombinante Proteine NF-M(1-465) (NF-M-A) und NF-M(736-916) (NF-M-C) mittels Western Blot-Analyse der Nachweis erbracht, daß es sich um GST-Fusionsproteine handelt (siehe Abb. 9, Spuren 2 + 3) und daß sich in beiden Fragmenten keine Bindungsstelle für den mAK 155 befindet (siehe Abb. 10, jeweils Spur 3). Die Fragmente wurden dann in T-Zell-Proliferationstests eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, daß sich die T-Zell-Antworten intratumoröser und peripherer T-Zellen von Thymompatienten mit MG unterscheiden.

T-Zell-Proliferationstests mit **intratumorösen** T-Zellen von Thymompatienten mit MG ergaben, daß sich sowohl für das Fragment NF-M-A als auch für NF-M-C keine signifikanten Unterschiede zu T-Zellen aus dem Thymus von Thymitispatienten mit MG ermitteln ließen. Da im Gegensatz dazu, intratumoröse T-Zellen von Patienten mit paraneoplastischer MG eine signifikant erhöhte Proliferation nach Stimulation mit dem Fragment NF-M(459-737) (NF-M-B) aufwiesen, scheint dieses NF-M-Fragment ein immundominantes Epitop spezifisch für T-Zellen dieser Patientengruppe zu enthalten. Die gegen dieses Epitop gerichtete verstärkte „initiale“ T-Zell-Antwort (Sercarz, 2000) innerhalb des Thymoms könnte zum einen dadurch hervorgerufen werden, daß es in Thymomen eine größere Anzahl T-Zellen gibt, die dieses

Epitop erkennen können oder daß der TCR der für dieses Epitop spezifischen T-Zellen eine erhöhte Avidität aufweist (Kompetitionsmodell) (Sercarz, 2000). Nach dem molekularen Mimikry-Modell kann es auch zur Bevorzugung einer Determinante führen, wenn diese einer Selbst-Determinante gleicht und dadurch kreuz-reagierende T-Zellen angesprochen werden (Sercarz, 2000). Speziell kann dies auch durch die Ähnlichkeit zweier Selbst-Proteine geschehen. Diese Möglichkeit wurde für die Proteine AChR und NF-M bereits im ersten Teil (siehe 5.1) der vorliegenden Diskussion besprochen.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß sich auf dem NF-M-B-Fragment 459-737 eine „initiale“ dominante T-Zell-Determinante befindet, ist das Ergebnis, daß sich für **periphere** T-Zellen eine signifikant erhöhte T-Zell-Proliferation für das Fragment NF-M-C in Thymompatienten mit MG gegenüber Thymitispatienten nachweisen ließ bzw. sich für das Fragment NF-M-A zumindest eine Tendenz ergab (siehe Abb. 15b). Im Gegensatz dazu war im Blut wie im Thymom von myasthenen Thymompatienten die T-Zell-Proliferation gegenüber dem Fragment NF-M-B gleichermaßen erhöht (siehe Abb. 24a). Dies bedeutet, daß sich innerhalb der Peripherie ebenfalls die ursprüngliche „initiale“ T-Zell-Reaktivität gegenüber dem NF-M-B-Fragment nachweisen ließ, sich zusätzlich jedoch auch Reaktivitäten gegen andere Teile des NF-M-Proteins gebildet haben, die im Thymom noch nicht vorhanden waren. Diese erst außerhalb des Tumors stattfindende Diversifikation kann durch intra- bzw. intermolekulares „determinant spreading“ erklärt werden (Kaufman *et al.*, 1993; Vincent *et al.*, 1998b), bei der einem sogenannten „initialen Driverklon“ ein Einfluß zugesprochen wird (Sercarz, 2000).

Bei einem Vergleich der T-Zell-Reaktivitäten gegen die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit klonierten Fragmente  $\delta$ AChR (313-450) und  $\delta$ AChR (430-496) ergaben sich ebenfalls im **Tumor** nur für das Fragment  $\delta$ AChR (430-496) signifikant erhöhte ( $p=0.009$ ) T-Zell-Proliferationen in Thymompatienten mit MG im Vergleich zu Thymitispatienten (Abb. 14). Im **Blut** dieser Patienten waren dagegen wiederum signifikant erhöhte T-Zellantworten gegen beide Fragmente zu finden (Abb. 15c). Möglicherweise enthält das Fragment  $\delta$ AChR (430-496), vergleichbar wie das mittlere NF-M-B-Fragment, ein Epitop, welches die Bildung eines „Driverklons“ innerhalb des Thymoms unterstützt.

Autoreaktive T-Zellen gegen die  $\delta$ -Untereinheit des AChR wurden bei Myastheniepatienten bereits in verschiedenen Arbeiten detektiert (Manfredi *et al.*, 1993; Protti *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2000b; Wang *et al.*, 1998). Jedoch wurden bei diesen Untersuchungen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ausschließlich periphere T-Zellen mit Peptiden der AChR-Untereinheiten stimuliert und es wurden keine Thymompatienten in die Studien eingeschlos-

sen. Bei einem Vergleich der Mittelwerte der Proliferationsindizes für die verschiedenen Untereinheiten wurden von Wang *et al.* die niedrigsten Werte für die  $\delta$ -Untereinheit ermittelt (Wang *et al.*, 2000b).

Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten (Wang *et al.*, 2000b; Wang *et al.*, 1998), daß die Delta-Untereinheit des AChR bei MG-Patienten ohne Thymom nur in geringem Maße zu autoreaktiver T-Zell-Proliferation führt. Dies steht in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen in Bezug auf die  $\delta$ -Untereinheit, da periphere T-Zellen von MG-Patienten mit einer Thymitis nach Stimulation mit Delta-Fragmenten (Abb. 15c) ebenfalls geringere Stimulationsindizes zeigten als in Bezug auf die  $\alpha$ -Untereinheit (Abb. 15a). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte signifikant erhöhte Proliferation gegen die  $\delta$ -Untereinheit bei Thymompatienten mit einer assoziierten MG (Abb. 14, Abb. 15c) ist daher als thymomspezifischer Befund zu deuten.

Warum nur bei Thymompatienten mit MG eine höhere T-Zell-Reaktivität gegen die  $\delta$ -Untereinheit des AChR gefunden wurde, kann hier nicht abschließend geklärt werden, da in allen bisher untersuchten Thymomen und nicht-neoplastischen Thymusgeweben die mRNA der  $\delta$ -Untereinheit nur in sehr geringem Maße, das Protein mittels Immunhistochemie gar nicht nachgewiesen werden konnte und keine Assoziation zwischen der  $\delta$ -AChR-Expression und dem Vorkommen einer MG besteht (Wilisch *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse legen zusammen mit den hier beschriebenen T-Zell-Reaktivitäten gegen die  $\delta$ -Untereinheit des AChR die Hypothese nahe, daß sich MG-assoziierte und MG-negative Thymome nicht in Bezug auf eine Antigen-spezifische positive Selektion unterscheiden, sondern eine unterschiedlich suffiziente negative Selektion für das Überleben von T-Zellen verantwortlich ist, die eine Spezifität für die AChR  $\delta$ -Untereinheit besitzen.

### **5.3 Untersuchung verschiedener Mikromilieufaktoren in Thymomen und nicht-neoplastischen Thymi**

Mittels eines Expressionsarrays und nachfolgender RT-PCR-Analyse konnte festgestellt werden, daß einige Wachstumsfaktoren, Apoptosefaktoren und Zytokine in Thymomen im Vergleich zu nicht-neoplastischen Thymi hinsichtlich ihrer Expression verändert waren. Für andere Faktoren (u. a. Laminin Rezeptor 37 kD (LamR), transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)) wurde dagegen eine grundsätzlich ähnliche Expression ermittelt (Tabelle 6), in Übereinstimmung mit dem „thymusähnlichen“ Charakter von Thymomen (Müller-Hermelink and Marx, 2000). Im Rahmen

dieser Arbeit konnte für einige Moleküle (LamR, teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF 1), human interferon-inducible peptide 6-16 gene (gene 6-16) bzw. B-cell growth factor 1 (BCGF 1)) zum ersten Mal eine Expression in thymischem Gewebe nachgewiesen werden.

Eine leichte Expressionserhöhung im Restthymus vergleichend zum Thymomgewebe des untersuchten Patienten wurde für die beiden u. a. bei der Apoptose im Thymus beteiligten Proteine Caspase 10 (Jiang *et al.*, 1999) und Tumornekrosefaktor Rezeptor 2 (TNF-R2) (Grell *et al.*, 1998) ermittelt (Tabelle 6), entsprechend dem relativ höheren Anteil an Thymozyten im Restthymusgewebe im Vergleich zum Thymom. Umgekehrt ist die leichte Expressionserhöhung des Strukturproteins Cytokeratin 13 im Thymomgewebe (Tabelle 6) durch einen relativ höheren Anteil an Epithelzellen in diesem Gewebe im Vergleich zum Restthymus zu erklären. Überraschend, aber bei dem verwendeten System (Clontech, Heidelberg) auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (persönliche Mitteilung E. Avots), war die geringe Sensitivität des Arrays. Anders ist nicht zu erklären, daß ausgerechnet das Signal für die Caspase 10 durch den Array ermittelt wurde, wohingegen sich für andere, ebenfalls an der Apoptosekaskade beteiligte Caspasen, wie z.B. die Initiator-Caspasen Caspase 8 oder 9 bzw. weitere Effektor-Caspasen wie Caspasen 3, 6 oder 7 (Bratton *et al.*, 2000), keine Signale ergaben, obwohl die mRNA dieser Caspasen in mindestens gleicher Konzentration vorgelegen haben müßte. Ebenso ist es verwunderlich, daß ein Signal für den TNF-R2 gefunden wurde, nicht jedoch für den Rezeptor 1, da dem Rezeptor 1 allgemein eine dominante Rolle bei der Weiterleitung des TNF-Signals zugesprochen wird (Thoma *et al.*, 1990). Allerdings werden stimulatorische Aktivitäten von TNF bei der T-Zell-Aktivierung (Gehr *et al.*, 1992) und im Antigen-induzierten Zelltod im Thymus (Zheng *et al.*, 1995, Speiser, 1996 #1002) beiden Rezeptoren zugeordnet. Insbesondere konnte anhand von TNF-R1 „knock out“ Mäusen gezeigt werden, daß TNF-R2 alleine für die Stimulation von Thymozyten zur Proliferation und Produktion von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) ausreichte (Grell *et al.*, 1998). Dennoch kann aufgrund der beschriebenen dominanten Rolle des TNF-R1 bei der Weiterleitung des TNF-Signals wahrscheinlich davon ausgegangen werden, daß trotz der fehlenden Hybridisierung für den Rezeptor 1 beide TNF-Rezeptoren auf Thymozyten des Thymus bzw. Thymoms exprimiert werden. Ein Zusammenhang zwischen der TNF-Wirkung und der MG wird diskutiert (Huang *et al.*, 1999). Für den TNF-R1 konnte in „knock out“ Mäusen gezeigt werden, daß er für die Auslösung der EAMG notwendig ist (Wang *et al.*, 2000a). Außerdem wurden auf peripheren T-Zellen von MG-Patienten mehr TNF-R1 Moleküle gefunden als auf denen von Kontrollpersonen, vermutlich hervorgerufen durch den höheren Aktivierungszustand dieser T-Zellen im Blut von MG-Patienten (Bongioanni *et al.*, 1999). Ein Zusammen-

hang zwischen MG und einer veränderten TNF-R2-Expression wurde dagegen bisher nicht beschrieben. Ebenso ist über eine Assoziation zwischen Thymomen und einer veränderten TNF- bzw. TNF-R-Expression bisher nichts bekannt.

Die Ursachen der geringen Sensitivität des Arrays sind bisher unklar. Sowohl technische Faktoren als auch die Qualität der aus Kryoblöcken isolierten RNA dürfte von Bedeutung sein. Dies umso eher, als bei der Untersuchung Operationsmaterial verwendet wurde, das logistisch bedingt erst 1-2 Stunden nach der eigentlichen Entnahme schockgefroren werden konnte. Trotz der geringen Sensitivität des Arrays konnte durch RT-PCR-Untersuchungen für alle detektierten Gene eine hohe Spezifität der Methode nachgewiesen werden. Die Relevanz der Array-Analyse wurde außerdem dadurch unterstrichen, daß sich die erhobenen Befunde mittels RT-PCR auch bei einer ganzen Serie weiterer Thymompatienten bzw. ihrer Tumorgewebe bestätigen ließen. Speziell ergaben sich beim Vergleich von Thymomgewebe mit nicht-neoplastischem Thymusgewebe für einige Gene keine Expressionsunterschiede, für andere konnte ein Unterschied zwischen nicht-neoplastischem und neoplastischem Thymusgewebe ermittelt werden. Für HB-GAM und BCGF 1 ergaben sich außerdem Unterschiede zwischen MG-assoziierten und nicht-assoziierten Thymomgeweben.

Eine vergleichbare Expression im nicht-neoplastischen Thymus- und Thymomgewebe wurde bei den RT-PCR-Untersuchungen für die Gene LamR, TGF $\beta$  und HB-GAM gefunden. Ebenso ergaben sich für BCGF 1 und TDGF 1 keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 19).

Aufgrund der erhöhten Expression in verschiedenen epithelialen Tumoren gegenüber dem entsprechenden Normalgewebe, wurden die Moleküle LamR und TDGF 1 als Tumorstromungsfaktoren beschrieben. Eine erhöhte LamR-Expression wurde vor allem in aggressiven Karzinomen gefunden (Jackers *et al.*, 1996); eine erhöhte TDGF 1-Expression wurde u. a. bei humanem Brustkrebs (Brandt *et al.*, 1994; Niemeier *et al.*, 1998) und im Zervixkarzinom (Ertoy *et al.*, 2000) festgestellt. TDGF 1 wirkt vermutlich als autokriner Wachstumsfaktor, wird also von den Epithelzellen selbst hergestellt (Ebert *et al.*, 2000). Da in der vorliegenden Arbeit weder im Array noch bei der RT-PCR eine Überexpression von LamR oder TDGF 1 detektiert werden konnte, scheinen beide Gene bei der Entwicklung von Thymomen keine unmittelbare Rolle zu spielen.

Ebenfalls scheint die neoplastische Transformation thymischer Epithelzellen das Mikromilieu hinsichtlich der Faktoren TGF $\beta$  und BCGF 1 nicht wesentlich zu beeinflussen. Dies ist besonders bezüglich der TGF $\beta$ -Expression ein wichtiger neuer Befund. Wegen seiner immunsuppressiven Wirkung wirkt sich eine erhöhte TGF $\beta$ -Expression positiv auf verschiedenste Autoimmunerkrankungen u. a. die MG aus (Krause *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1997). Es wurde deshalb postuliert, daß die Expression von TGF $\beta$  in Thymomen, insbesondere in denen, die

nicht mit MG assoziiert sind, gegenüber nicht-neoplastischen Thymi erhöht sein könnte (Helmreich, 1999). Diese Hypothese konnte jedoch durch die vorliegenden RT-PCR Untersuchungen nicht bestätigt werden (Abb. 19a). Außerdem wird TGF $\beta$  eine Rolle bei der Thymozytenreifung zugesprochen. Nach dieser Hypothese sollte in Thymomen die verminderte Expression des proliferationsinhibierenden TGF $\beta$  der Grund für die abnorm vermehrte Zahl von unreifen intratumorösen CD4+CD8-CD3- T-Zellen sein (Nenninger *et al.*, 1998), da bei der Maus gezeigt wurde, daß TGF $\beta$  speziell die Zellteilungsrate des vergleichbaren Thymozytenstadiums bei der Maus reduziert (Takahama *et al.*, 1994b). Auch diese Hypothese konnte mit den vorliegenden PCR-Analysen nicht bestätigt werden.

Einschränkend ist allerdings darauf hinzuweisen, daß mittels PCR auf mRNA-Ebene nicht zwischen inaktivem und aktivem TGF $\beta$  unterschieden werden kann, da TGF $\beta$  in einer latenten, biologisch inaktiven Form, sekretiert wird. Die Aktivierung erfolgt vermutlich durch eine säure- oder enzymatisch-vermittelte (Plasmin, Calpain) Abspaltung eines N-terminalen Peptids (Abe *et al.*, 1998). Eine definitive Entscheidung über die Bedeutung von TGF $\beta$  für die Thymobiologie erfordert daher immunhistochemische Untersuchungen mit Hilfe eines Antikörpers, welcher spezifisch mit der aktiven TGF $\beta$ -Form reagiert.

Die ebenfalls unveränderte Expression von BCGF 1 in Thymomen, vergleichend mit normalem Thymusgewebe, spricht dafür, daß die deutlich geringere Zahl von B-Zellen in Thymomen (Fend *et al.*, 1993) nicht durch eine verminderte lokale Proliferation von B-Zellen bedingt ist.

Im Gegensatz zur Expression der oben erwähnten Faktoren konnte ein Unterschied in der Expression im thymischen Normalgewebe im Vergleich zum Thymomgewebe für das „IFN- $\alpha/\beta$  response Gen“ gene 6-16 ermittelt werden. Die höchsten Expressionswerte für dieses Gen wurden in kortikalen MG-assoziierten Thymomen gefunden (Abb. 18). Das Genprodukt von gene 6-16 bzw. seine Funktion sind nach wie vor unbekannt (Gjermansen *et al.*, 2000). Jedoch läßt die erhöhte Expression von gene 6-16 auch auf eine erhöhte Expression von IFN- $\alpha/\beta$  schließen (Ackrill *et al.*, 1991). Ein Zusammenhang zwischen der Expression von IFN- $\alpha$  und der MG könnte insofern bestehen, als INF- $\alpha$  im Rahmen der MG immunsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben werden. Das Zytokin reguliert die Expression von TH1 und TH2 Zytokinen herunter, welche für das Fortschreiten der Erkrankung mitverantwortlich gemacht werden (Zhang *et al.*, 1997). Gene 6-16 wird außerdem in verschiedenen Tumoren eine Rolle bei der Wachstumsinhibition zugeschrieben. So ist die Expression des Gens z. B. in alternden

Fibroblasten bzw. Brustkrebszellen erhöht (Tahara *et al.*, 1995; Tiwari *et al.*, 1991). Daß gene 6-16 auch in Thymomen diese Funktion übernimmt, ist jedoch eher unwahrscheinlich.

Auch die Expression von HB-GAM war insbesondere in MG-assoziierten kortikalen Thymomen gegenüber normalem Thymusgewebe erhöht (Abb. 19a, b). Bei einem Vergleich der verschiedenen Thymomtypen war die Expression in kortikalen Thymomen höher als in gemischten oder medullären Thymomen (Abb. 19a, b). Der Faktor HB-GAM konnte bereits im Thymusgewebe von Mäusen mittels PCR nachgewiesen werden (Sato *et al.*, 1997), über eine Expression in humanem Thymusgewebe oder in Thymomen war bisher jedoch nichts bekannt. HB-GAM wird eine Rolle als Tumorstromafaktor, u. a. für Epithel- und Endothelzellen, und bei der Angiogenese verschiedener Tumoren zugeschrieben (review unter (Zhang and Deuel, 1999)). Die erhöhte Expression in Thymomen macht eine Beteiligung von HB-GAM bei der Entwicklung von Thymomen wahrscheinlich. Insbesondere könnte HB-GAM aufgrund seiner beschriebenen angiogenen Eigenschaften (Laaroubi *et al.*, 1994) für das thymomspezifische Vorkommen gefäßreicher „perivaskulärer Räume“ mitverantwortlich sein. Diese Räume sind in kortikalen Thymomen im Vergleich zu gemischten und medullären am stärksten ausgebildet, in Übereinstimmung mit der bei der vorliegenden RT-PCR-Analyse gefundenen höchsten HB-GAM-Expression in diesem Thymomtyp. Wahrscheinlich ist außerdem, daß HB-GAM dabei von den neoplastisch-veränderten Thymusepithelzellen des Thymoms hergestellt wird, da in anderen Geweben, wie z.B. Brustepithel ebenfalls die Produktion durch epitheliale Zellen nachgewiesen werden konnte (Ledoux *et al.*, 1997). Auch in Lungenkarzinom-Zell-Linien wurde eine Expression festgestellt (Jager *et al.*, 1997).

Wurden die Thymome hinsichtlich ihrer MG-Assoziation verglichen, so konnten signifikante Unterschiede für die Faktoren BCGF 1 und HB-GAM ermittelt werden. Für BCGF 1 wurde eine signifikant höhere Expression bei Thymompatienten ohne MG gegenüber denen mit ermittelt, umgekehrt war für HB-GAM die Expression in MG-assoziierten Thymomen signifikant höher als in denen ohne MG.

Neben dem Einfluß auf die Entwicklung von Thymomen, der dem Wachstumsfaktor HB-GAM vermutlich zugeordnet werden kann, spricht der Befund einer signifikant erhöhten Expression in MG-assoziierten Thymomen gegenüber Thymomen ohne MG (Abb. 19a) auch für eine Rolle bei der T-Zell-Toleranz-Entwicklung in Thymomen. Inwiefern HB-GAM an der Pathogenese der MG beteiligt ist, ist jedoch unklar. Der Faktor spielt eine Rolle beim AChR Clustering (Daggett *et al.*, 1996), dem Hauptantigen bei der MG. Jedoch ist bekannt, daß komplette AChR-Moleküle in Thymomepithelzellen nicht vorkommen (Siara *et al.*, 1991;

Wilisch *et al.*, 1999). Dies macht einen Zusammenhang zwischen der „Clusteringfunktion“ des HB-GAM und der MG unwahrscheinlich.

Der Zusammenhang zwischen der erhöhten BCGF 1-Expression in Thymomen ohne MG gegenüber MG-assoziierten Thymomen ist ebenfalls unklar. Die Funktion von BCGF 1 als B-Zell-Wachstumsfaktor sowie der zelluläre Produzent *in vivo* sind umstritten (Kovanen *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1987), auch wenn rekombinantes BCGF 1 humane B-Zellen *in vitro* zur Proliferation anregt (Kovanen *et al.*, 1995). Bei der Untersuchung der verschiedenen Thymomgewebe konnte kein Zusammenhang zwischen der B-Zell-Anzahl und der BCGF 1-Expression ermittelt werden. Weder korrelierte die Stärke des PCR-Signals mit der Anzahl der B-Zellen in einzelnen Fällen, noch wurde innerhalb der Gruppe der MG-assoziierten Thymome ein signifikant anderer Anteil an B-Zellen als innerhalb von Thymomgeweben ohne MG ermittelt (Tabelle 8, Fälle 3-12 Thymome mit MG, Fälle 13-19 ohne MG). Ob BCGF 1 in Thymomen einen Einfluß auf B-Zellen oder auf andere Zellen hat, kann demnach nicht abschließend geklärt werden. Die signifikante Expressionserhöhung von BCGF 1 in Thymomen ohne MG macht allerdings einen Einfluß des Faktors auf die Pathogenese der MG wahrscheinlich. Möglich wäre ein indirekter Einfluß auf die intrathymische T-Zell-Toleranzentwicklung über die Beeinflussung Antigen-präsentierender B-Zellen (Arrunategui-Correa *et al.*, 1997).

Zukünftige Untersuchungen sollten auf Proteinebene (Immunhistochemie, *in situ* Hybridisierung) klären, von welchen Zellen in Thymomen die verschiedenen Faktoren exprimiert werden und ob es eine bestimmte Verteilung im Gewebe gibt. Dies ist insbesondere für HB-GAM und BCGF 1 sinnvoll, um die Beteiligung dieser Faktoren an der Pathogenese der MG näher zu untersuchen.

#### **5.4 Einfluß des Thymoms auf die Zusammensetzung und Funktion des peripheren T-Zell-Repertoires**

Intratumoröse T-Zell-Reifung findet in MG-assoziierten Thymomen statt (Nenninger *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1995), wobei Autoantigen-spezifische T-Zellen gegen MG-relevante Antigene entstehen (Nagvekar *et al.*, 1998b; Schultz *et al.*, 1999; Sommer *et al.*, 1990).

Es wurde postuliert, daß diese T-Zellen das Thymom verlassen und an der peripheren Autoimmunkaskade beteiligt sind, welche zu den Myasthenie-Symptomen der Patienten führt (Müller-Hermelink and Marx, 2000). Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der vorlie-

genden Arbeit unterstützt, durch die gezeigt wird, daß sich die spezielle Zusammensetzung der T-Zell-Populationen im Thymom im Blut dieser Patienten widerspiegelt.

Mittels FACS-Analyse konnte eine signifikante Erhöhung des Anteils an zirkulierenden CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen bei Thymompatienten im Vergleich zu Normalpersonen nachgewiesen werden (siehe Abb. 20a, b). Die Erhöhung dieser T-Zell-Population könnte sich auf einen Export reifer intratumoröser T-Zellen in die Peripherie zurückführen lassen, da hauptsächlich naive T-Zellen und „recent thymic emigrants“ den CD45RA<sup>+</sup> Immunophänotyp exprimieren (Bell *et al.*, 1998; Vanhecke *et al.*, 1995a). Diese Schlußfolgerung wird durch die Ergebnisse von Berzin *et al.* (Berzins *et al.*, 1998; Berzins *et al.*, 1999) unterstützt, die zeigen konnte, daß eine Erhöhung der T-Zell-Pool-Größe, hervorgerufen durch die Transplantation thymischer Lappen in Mäusen, beinahe exakt korrelierte mit der Anzahl der aus diesen Transplantaten emigrierenden T-Zellen. Außerdem wurde keine Erhöhung des Anteils der CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von MG-Patienten ohne Thymom gefunden (siehe Abb. 20c). Für den entzündlich veränderten Thymus dieser Patienten wird eine normale Thymopoese beschrieben (Müller-Hermelink and Marx, 2000; Nenninger *et al.*, 1998). Durch dieses Ergebnis wird auch die Möglichkeit ausgeschlossen, daß eine Veränderung der zirkulierenden CD45RA<sup>+</sup> T-Zell-Population für die MG im allgemeinen charakteristisch ist. Einen weiteren Hinweis auf den Einfluß intratumoröser Thymopoese auf die Zusammensetzung der peripheren T-Zell-Populationen gibt das Ergebnis, daß bei Patienten mit medullären Thymomen der Anteil der CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen im Blut im Vergleich zu Normalpersonen unverändert ist. Medulläre Thymome zeigen nur eine minimale intratumoröse Thymopoese und beinhalten dementsprechend nur eine geringe Anzahl reifer T-Zellen, von denen die meisten den CD8<sup>+</sup> Phänotyp zeigen (Nenninger *et al.*, 1997). Zusätzlich unterstützt der Abfall des Anteils zirkulierender CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen direkt nach der Thymektomie (siehe Abb. 23a) die Hypothese eines Exports reifer T-Zellen aus dem Thymom ins Blut. Dieses Ergebnis ist ebenfalls in Übereinstimmung mit Daten von Berzins *et al.*, die einen Abfall des Anteils peripherer naiver T-Zellen nach der Herausnahme thymischer Implantate in Mäusen feststellte (Berzins *et al.*, 1999).

Durch FACS-Analysen konnte außerdem gezeigt werden, daß die meisten Zellen des expandierten CD45RA<sup>+</sup> T-Zell-Pools den CD8<sup>+</sup> Immunophänotyp exprimierten (siehe Abb. 21a). Dieses Ergebnis konnte gleichermaßen für kortikale, gemischte und medulläre Thymome ermittelt werden. Demnach scheint auch minimale intratumoröse Thymopoese mit einer hauptsächlich Generierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Nenninger *et al.*, 1997) auszureichen, um die Zusammensetzung der T-Zell-Populationen im Blut in Richtung der CD8<sup>+</sup> Zellen zu verschieben. Der Anstieg des Anteils zirkulierender CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in Thymom-

patienten ohne MG am höchsten (Abb. 21b). Dieses Ergebnis impliziert, daß diese Thymome relativ mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Peripherie exportieren als MG-assoziierte Thymome. In Übereinstimmung damit führt die Thymomresektion zu einem signifikanten Abfall des Anteils zirkulierender CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, hat jedoch nur einen geringen Einfluß auf den Anteil zirkulierender CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 23b). Tatsächlich geht der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur leicht zurück; ein Ergebnis, welches bereits für MG-Patienten nach der Thymektomie beschrieben wurde (Melms *et al.*, 1993). Diese Veränderungen im Blut stehen in Übereinstimmung mit der T-Zell-Entwicklung im Thymom, welche abnorm in Richtung einer relativ vermehrten Produktion von T-Zellen mit CD8<sup>+</sup> Immunphänotyp verschoben ist (Abb. 22a). Der letztgenannte Befund konnte anhand eines signifikant erniedrigten CD4/CD8-Verhältnisses innerhalb naiver CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen erhoben werden. (Abb. 22b). Diese Ergebnisse unterstützen wiederum die Schlußfolgerung, daß reife T-Zellen das Thymom verlassen und das T-Zell-Repertoire in der Peripherie verändern.

Daß der Abfall im CD4/CD8-Verhältnis innerhalb CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von Thymompatienten ( $p=0.08$ ) weniger ausgeprägt ist als im Thymom ( $p=0.013$ ) (Abb. 22b), kann durch die Tatsache erklärt werden, daß sowohl der Restthymus als auch das Thymom zum peripheren T-Zell-Pool von Thymompatienten beitragen (Douek *et al.*, 1998).

Ein anderes Argument für die Hypothese, daß Thymome das periphere T-Zell-Repertoire verändern können, wird durch die funktionellen Analysen geliefert. Mit Hilfe von T-Zell-Proliferationstests konnten sehr ähnliche Autoantigen-spezifische T-Zell-Antworten sowohl innerhalb intratumoröser als auch peripherer T-Zellen von Thymompatienten mit MG nachgewiesen werden (Abb. 24a). Dieses Ergebnis deutet auf einen Austausch Autoantigen-spezifischer T-Zellen zwischen diesen beiden Kompartimenten hin; jedoch ist noch ungeklärt, ob diese T-Zellen im Thymom gebildet oder aus dem Blut importiert werden und im Thymom akkumulieren. Als Argument für die intratumoröse Generierung dieser T-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß T-Zellen, die außerhalb des Thymus durch eine Impfung mit TT Antigenkontakt hatten, in der Regel nicht innerhalb intratumoröser T-Zellen detektierbar sind (Abb. 24b). Dies spricht für eine Störung des Importes von Gedächtnis-T-Zellen aus dem Blut in das Thymom. Aus diesem Grunde können die ähnlichen Antworten gegen Autoantigene sowohl intratumoröser als auch zirkulierender T-Zellen durch die Bildung Autoantigen-spezifischer T-Zellen im Thymom und ihr anschließender Export in die Peripherie erklärt werden.

Trotz des offensichtlichen Einflusses des Thymoms auf die zirkulierenden T-Zell-Populationen, konnte keine signifikante Änderung in der absoluten Zellzahl der PBL bei den untersuchten Thymompatienten festgestellt werden. Obwohl Thymome oft eine große Ge-

websmenge aufweisen, beherbergen sie eine vergleichbar große absolute Anzahl an reifen T-Zellen wie der Restthymus (Nenninger *et al.*, 1998). Thymome sind deshalb vermutlich vergleichbar mit einem einzigen transplantierten Thymus in der Maus (Berzins *et al.*, 1998). In diesen Mäusen ist der Effekt zusätzlichen „T-Zell-Inputs“ von einem Transplantat auf die Zusammensetzung der peripheren T-Zell-Populationen sehr groß, wohingegen der Einfluß auf die absolute Zellzahl zirkulierender T-Zellen eher vernachlässigbar ist (Berzins *et al.*, 1998; Berzins *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis wird durch bisher nicht eindeutig definierte periphere homeostatische Mechanismen erklärt (Berzins *et al.*, 1998; Berzins *et al.*, 1999). Die vorliegende Arbeit zeigt, daß in ihren Auswirkungen ganz ähnliche homeostatische Mechanismen auch beim Menschen wirksam sind.

Die Mechanismen, durch die intratumoröse Autoantigen-spezifische T-Zellen die Pathogenese der paraneoplastischen MG von Thymompatienten beeinflussen, sind bisher unbekannt. Der T-Zell-Export vom Thymom in die Peripherie wird als ein notwendiger Schritt angesehen, da nur dadurch eine Interaktion zwischen Autoantigen-spezifischen T-Zellen aus dem Thymom und Autoantikörper-produzierenden B-Zellen, welche ausserhalb des Thymoms gefunden werden, ermöglicht wird (Nenninger *et al.*, 1998; Newsom-Davis *et al.*, 1987; Sommer *et al.*, 1990). CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird dabei eine Rolle bei den T/B-Zell-Interaktionen während der Effektorphase der MG zugeschrieben (Hohlfeld *et al.*, 1984). Von der Autoimmunreaktion wird angenommen, daß sie, einmal in der Peripherie initiiert, sich selbst aufrechterhält (Marx and Müller-Hermelink, 1999; Müller-Hermelink and Marx, 2000). Diese Annahme wird durch die Untersuchung unterstützt, daß der Autoantikörpertiter nach der Thymektomie nicht kontinuierlich abnimmt, und durch klinische Beobachtungen, wonach die Thymomresektion nur in seltenen Fällen zu einer Linderung der Myasthenie-Symptome führt (Vincent and Willcox, 1999).

Jedoch kann die vorliegende Arbeit nicht direkt zeigen, daß Thymome CD4<sup>+</sup> T-Zellen exportieren, da alle Patienten, von denen hämatologische Daten vorlagen, eine normale Leukozytenanzahl (siehe Material und Methoden) bzw. einen normalen Anteil naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut aufwiesen (siehe Abb. 21a). Dies schließt jedoch keineswegs aus, daß auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zusammen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Thymom exportiert werden, jedoch in einer relativ geringeren Anzahl als vom normalen Thymus. Auch ein geringer Export von CD4<sup>+</sup> T-Zellen würde sich in der FACS-Analyse, die ja nur relative (prozentuale) Veränderungen erfaßt, als Vermehrung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut darstellen (siehe Abb. 21a). Ein indirekter Hinweis, daß auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen exportiert werden, ergibt sich auch aus den Ergebnissen der funktionellen Analysen (Abb. 24a).

Nach der gleichen Logik muß der relativ erhöhte Anteil CD8<sup>+</sup> positiver T-Zellen im Blut von Thymompatienten ohne MG (siehe Abb. 21b) nicht unbedingt durch den Export einer höheren Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen entstehen, sondern kann auch durch eine absolut geringere Anzahl aus dem Thymom emigrierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen hervorgerufen werden. Wie bei anderen Formen von Immundefizienz könnte eine verminderte CD4<sup>+</sup> T-Zell-Hilfe, verdeutlicht durch ein signifikant erniedrigtes CD4/CD8 Verhältnis im Blut von Thymompatienten ohne MG (siehe Abb. 21b), zu einer verminderten Autoantikörperproduktion führen und damit eine Entwicklung der MG verhindern.

Ungeachtet der zentralen Rolle der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der finalen Effektorphase der MG, wirft die Expansion zirkulierender CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Thymompatienten mit MG (siehe Abb. 21b) die Hypothese auf, daß der Export naiver Autoantigen-spezifischer CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Initiierung der MG in der Peripherie von Thymompatienten beteiligt sein könnte (Vincent and Willcox, 1999). Es gibt bereits mehrere Untersuchungen, bei denen einer erhöhten Anzahl Autoantigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Beteiligung bei verschiedenen hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-abhängigen humanen organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen (z. B: Diabetes, Multiple Sklerose) zugeschrieben wurde (Hehmke *et al.*, 1995; Monteiro *et al.*, 1996). Bei der Ratte ist eine Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG) nachgewiesen worden (Zhang *et al.*, 1996), während direkte Beweise für die Beteiligung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen beim Menschen noch fehlen (Vincent and Willcox, 1999). Als indirekter Hinweis, daß CD8<sup>+</sup> T-Zellen möglicherweise für die Initiierungsphase der Thymom-assoziierten MG beim Menschen bedeutsam sind (Vincent and Willcox, 1999), kann aber die Beobachtung gewertet werden, daß eine signifikante Korrelation der Thymom-assoziierten MG zum HLA-A24 Phänotyp (also MHC Klasse I) gefunden werden konnte, jedoch keine Assoziation zu MHC II-Allelen bestand (Machens *et al.*, 1999). Obwohl in dieser Arbeit gezeigt wurde, daß der Anteil CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen am höchsten bei Thymompatienten ohne MG ist (siehe Abb. 21b), steht dies aus nachfolgend erläuterten Gründen nicht unbedingt im Widerspruch zu verschiedenen Pathogenesemodellen, die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle bei der Auslösung der MG zuschreiben.

Eine Möglichkeit wäre es, daß die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Thymom eine zweifache Funktion erfüllen können: Autoantigen-spezifische Eigenschaften bei Thymompatienten mit MG, regulatorische Funktionen bei denen ohne MG. Eine Erklärung für diese Duplizität wäre das Vorhandensein abnormer Autoantigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei MG Patienten. Normalerweise ist das CD4<sup>+</sup> T-Zell-Repertoire tolerant gegenüber Selbstantigenen und gibt deshalb keine „Hilfe“ an autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen, womit die periphere Toleranz gewahrt bleibt (Guerder and Matzinger, 1992; Kurts *et al.*, 1997). Bei myasthenen Thymompatienten könn-

ten dementsprechend abnorme intratumoröse CD4+ T-Zellen das autoreaktive Potential von CD8+ T-Zellen wirksam werden lassen.

Im Sinne eines solchen Pathogenesemodells wurden intratumoröse autoreaktive CD4+ T-Zellen als charakteristisch für myasthene Thymompatienten, nicht jedoch für Thymompatienten ohne MG beschrieben (Nagvekar *et al.*, 1998b; Schultz *et al.*, 1997; Sommer *et al.*, 1991). Zusätzlich stützt die vorliegende Arbeit die These, daß diese T-Zellen das Thymom verlassen (siehe Abb. 24a).

Ein anderes Modell beschreibt zwei unabhängige Schritte, die beide für die Autoimmunisierung benötigt werden (Vincent and Willcox, 1999). Ein erster Schritt, abhängig von CD8+ T-Zellen, ist notwendig für die Initiierung der Autoimmunkaskade, wodurch sich der Zusammenhang zwischen dem MHC Klasse I-Allel (HLA-A24) und der Entwicklung der MG in Thymompatienten erklären läßt. Ein zweiter Schritt, abhängig von aktivierten CD4+ T-Zellen, wird nach diesem Modell für die Stimulation von B-Zellen zur Autoantikörperproduktion, also für die Effektorphase der MG benötigt. Auch dieses Modell setzt also die Anwesenheit abnormer autoimmuner CD4+ T-Zellen speziell bei Thymompatienten mit MG voraus (Nagvekar *et al.*, 1998b; Sommer *et al.*, 1991).

Zukünftige Untersuchungen bisher unbekannter Antigenspezifität von CD8+ T-Zellen bei Thymompatienten sind erforderlich, um die potentielle Rolle von CD8+ T-Zellen bei der Autoimmunisierung zu klären und zu einem weiteren Verständnis der Pathogenese Thymom-assoziiierter MG zu kommen.

## **5.5 Untersuchung der Expression ausgewählter Chemokine in Thymomen und nicht-neoplastischen Thymi**

Die Zusammensetzung der Zell-Populationen im Thymom- bzw. Thymitisgewebe weist signifikante Unterschiede auf. Hinsichtlich der T-Zell-Populationen ist der Anteil an unreifen Thymozyten in Thymomen größer, der Anteil reifer T-Zellen geringer, als in nicht-neoplastischen Thymi (Nenninger *et al.*, 1998). Zusätzlich scheint die Migration von Gedächtnis-T-Zellen aus der Peripherie in das Thymom gestört zu sein (siehe Abb. 24b). Außerdem ist die MHC II-Expression der Epithelzellen in Thymomen im Vergleich zum nicht-neoplastischen Thymus erniedrigt (Chilosi *et al.*, 1986; Ströbel *et al.*, ; van der Kwast *et al.*, 1985). Die Ursache dieses Befundes ist bislang ungeklärt, aber möglicherweise auf eine verminderte Produktion von IFN- $\gamma$  in den Thymomen zurückzuführen (A. Marx, persönliche Mitteilung). Da sich Epithelzellen und Thymozyten wechselseitig in ihrer Reifung beeinflussen (review in (Manley, 2000)), könnte die veränderte MHC II-Expression auch eine Ursache für die abnor-

für die abnorme T-Zell-Reifung in Thymomen darstellen. Schließlich ist bislang völlig unklar, weshalb sich in Thymomen im Gegensatz zum nicht-neoplastischen Thymusgewebe kaum B-Zellen finden (Fend *et al.*, 1991; Marx and Müller-Hermelink, 1999).

Als Arbeitshypothese wurde von uns postuliert, daß diese verschiedenen Zusammensetzungen der Zellpopulation möglicherweise auf ein unterschiedliches Chemokinprofil innerhalb des Thymom- bzw. Thymitisgewebes zurückzuführen sind, da diese Faktoren maßgeblich die Migration von Zellen beeinflussen. Im speziellen wurden deshalb Chemokine untersucht, für die bereits eine hohe Expression im Thymus bzw. eine Beteiligung an der Thymozytenreifung beschrieben wurde (**M**acrophage-derived chemokine: MDC, **T**hymus-expressed chemokine: TECK) oder deren Expression durch IFN- $\gamma$  beeinflusst wird (**I**nterferon-inducible **T** cell alpha chemoattractant: I-TAC, **M**onokine induced by interferon  $\gamma$ : MIG). Außerdem wurde das B-Zell-spezifische Chemokin **B**-Lymphocyte chemoattractant (BLC) untersucht. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wird die Hypothese teilweise unterstützt, da insbesondere für das Chemokin BLC ein Zusammenhang zwischen der Expressionstärke des Chemokins und der Anzahl der B-Zellen in den verschiedenen Geweben ermittelt werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine Expression der beiden Chemokine MDC und TECK in Thymomen nachgewiesen werden, während deren Expression im normalen Thymusgewebe bereits beschrieben wurde (Godiska *et al.*, 1997; Zabel *et al.*, 1999). Mittels RT-PCR-Analyse wurde gezeigt, daß sowohl MDC als auch TECK in allen untersuchten nicht-neoplastischen Thymi und in verschiedenen Thymomgeweben (kortikal, gemischt und medullär) zu finden waren (Abb. 25a, b).

Die MDC-Expression war in kortikalen und gemischten Thymomen sowie in nicht-neoplastischem Thymusgewebe höher als in medullären Thymomen (Abb. 25a, b). Dies ist hinsichtlich der medullären Thymome ein überraschender Befund, da innerhalb thymischen Gewebes eine MDC-Expression nur von Epithelzellen der Medulla und in den Wänden Hassall'scher Körperchen nachgewiesen werden konnte (Chantry *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2000). Dazu ist allerdings zu bemerken, daß bei den medullären Thymomen das Mikromilieu ausgeprägt pathologisch verändert ist. So sind z.B. medulläre B-Zellen und dendritische Zellen nicht detektierbar und eine kortiko-medulläre Grenzstruktur fehlt (Müller-Hermelink *et al.*, 1996). Ausdruck dieser gestörten medullär-epithelialen Funktion könnte die wesentlich schwächere MDC-Expression in den medullären Thymomen verglichen mit den kortikalen bzw. nicht-neoplastischen Thymi sein (Abb. 25b). Mit dieser Interpretation scheinbar schwer zu vereinbaren ist allerdings der Befund, daß im Gewebe von gemischten Thymomen die

MDC-Expression vergleichbar hoch wie in den kortikalen Thymomen und im Normalthymus liegt (Abb. 25a), obwohl die medullär-erscheinenden Areale in gemischten Thymomen die gleiche Morphologie zeigen wie medulläre Thymome. Diese Diskrepanz zwischen medullären und gemischten Thymomen legt daher die Vermutung nahe, daß jenseits einer ganz ähnlichen Morphologie doch funktionelle Unterschiede zwischen medullären Thymomen und den medullären Arealen in gemischten Thymomen bestehen.

Der Befund, daß in den nicht-neoplastischen Thymi und kortikalen Thymomen eine in etwa gleiche MDC-Expression festgestellt wurde (Abb. 25b), ist dagegen nicht überraschend, da kortikale Thymome nicht nur aus neoplastischen kortikal differenzierten Epithelzellen bestehen, sondern auch neoplastische, sogenannte medulläre Inseln, aufweisen. Innerhalb dieser medullären Inseln ist das Mikromilieu in Bezug auf das Vorkommen von Hassall'schen Körperchen, B-Zellen und dendritischen Zellen dem medullären Mikromilieu im Normalthymus sehr ähnlich.

Letztendlich kann aber auch eine Produktion des Chemokins von Lymphozyten innerhalb des Thymomgewebes, eventuell verursacht durch das durch die Neoplasie der Epithelzellen veränderte Mikromilieu, nicht ausgeschlossen werden, da bekannt ist, daß MDC extrathymisch konstitutiv von dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen produziert wird (Galli *et al.*, 2000).

MDC ist nachweislich an der Migration unreifer, insbesondere doppeltpositiver, Thymozyten (CD4+CD8+) beteiligt (Annunziato *et al.*, 2000). Dem Chemokin wird deshalb eine Rolle bei der Migration von Thymozyten innerhalb des Thymus, insbesondere positiv selektionierter Thymozyten vom Kortex in die Medulla, zugesprochen (Chantry *et al.*, 1999). Möglicherweise hat das Chemokin dadurch auch einen Einfluß auf die negative Selektion, da diese in der Medulla stattfindet (Chantry *et al.*, 1999). Eine veränderte negative Selektion könnte wiederum einen Einfluß auf das Autoimmunitätpotential intratumoröser T-Zellen haben (Müller-Hermelink and Marx, 2000). Diesbezüglich ist aber bemerkenswert, daß keine Korrelation der MDC-Expression in kortikalen und gemischten Thymomen mit dem MG-Status der Patienten ermittelt werden konnte (Abb. 25a).

Der nicht signifikant veränderte intratumoröse Spiegel des TH2 Chemokins MDC in MG-assoziierten gemischten und kortikalen Thymomen im Vergleich zu Thymomen ohne MG paßt außerdem zu der Einschätzung, daß die MG eine TH1-dominierte Erkrankung ist (Moiola *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997). Auch im Mausmodell wurde den TH1 Zytokinen IFN- $\gamma$  und IL-12, im Gegensatz zum TH2 Zytokin IL-4 eine wichtige Rolle bei der Auslösung der EAMG (experimentelle autoimmune MG) zugesprochen (Balasa and Sarvetnick, 2000; Moiola *et al.*, 1998).

Zusammenfassend machen die Befunde es also wahrscheinlich, daß MDC einerseits einen Einfluß auf die TH1/TH2-Balance in Thymomen hat und andererseits ein funktioneller Marker für humane thymische Epithelzellen sein könnte.

Es wird interessant sein, durch zukünftige *in situ* Analysen bzw. Immunhistochemie zu klären, ob die MDC-Expression auf medulläre Epithelzellen der kortiko-medullären Grenzzone konzentriert, auf Subpopulationen von medullären Epithelzellen beschränkt ist oder sogar eine aberrante Expression in den kortikal differenzierten Abschnitten von gemischten Thymomen stattfindet.

Im Gegensatz zu MDC wurde TECK in allen untersuchten Thymus- bzw. Thymomgeweben, unabhängig vom Thymomtyp, in vergleichbarer Stärke exprimiert (Abb. 25a, b). Demgegenüber wurde in den Lymphknoten (Lk)-Biopsaten der Patienten mit Lymphomen unreifer T-Zellen (T-LBL) kein Signal detektiert (Abb. 25b). Diese Befunde passen zu der Beobachtung in der Maus, daß thymische epitheliale Zellen die Hauptquelle für TECK im Thymus darstellen. Das TECK-Protein wurde vor allem in kortikalen Zellen gefunden, kam jedoch auch in einigen medullären Epithelzellen vor (Wurbel *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen daher nahe, daß die TECK-Expression, im Gegensatz zur MDC-Expression, durch die neoplastische Transformation der Epithelzellen nicht wesentlich beeinflußt wird.

TECK wirkt chemotaktisch auf doppeltpositive und einfachpositive reife Thymozyten (Wurbel *et al.*, 2000; Youn *et al.*, 1999). Wie an Thymuszellen der Maus gezeigt, geht die Fähigkeit der Thymozyten auf TECK zu antworten erst beim letzten identifizierbaren Thymozytenstadium verloren, kurz vor der Emigration der T-Zellen in die Peripherie (Campbell *et al.*, 1999). Vermutlich fungiert TECK als ein Faktor, welcher die Thymozyten im Thymus zurückhält und so eine Emigration von T-Zellen verhindert, bevor sie die endgültige Reife erlangt haben (Campbell and Butcher, 2000). Entsprechend dieser Hypothese reagieren periphere T-Zellen nicht auf TECK (Campbell *et al.*, 1999).

In Thymomen ist die intratumoröse T-Zell-Reifung insofern gestört, als sich intratumorös anteilig mehr unreife T-Zellen als in nicht-neoplastischem Thymusgewebe befinden (Nenninger *et al.*, 1998). Die relativ normale TECK-Expression in Thymomen könnte dazu beitragen, daß auch in Thymomen die T-Zellen bis zum letzten Reifungsstadium intratumorös verbleiben und keine unreifen Thymozyten im Blut von Thymompatienten detektierbar sind (siehe Abb. 20a bzw. unter 4.3.1.1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals auch die Untersuchung der Expression der Chemokine I-TAC und MIG in Thymomen. Die Expression von I-TAC im nicht-

neoplastischen Thymus wurde bereits beschrieben (Cole *et al.*, 1998). Die höchsten I-TAC mRNA Level wurden in PBL, Pankreas und Leber, etwas niedrigere in Thymus-, Milz- und Lungengewebe gefunden; als exprimierende Zellen wurden stimulierte Astrozyten bzw. aktivierte Monozyten ermittelt (Cole *et al.*, 1998). MIG dagegen wird von IFN- $\gamma$ -induzierten PBL, Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert (Farber, 1997). Beide Chemokine konnten außerdem in humanen bronchialen Epithelzellen nach IFN- $\gamma$ -Stimulation induziert werden (Sauty *et al.*, 1999).

Die RT-PCR-Analysen in den verschiedenen Thymus- und Thymomgeweben bzw. in Biopsaten von T-LBL Patienten ergaben (Abb. 25a, b), daß sowohl I-TAC als auch MIG in allen Geweben exprimiert wurde. Eine Beziehung zum histologischen Thymomtyp oder zur Anzahl der Lymphozyten in den verschiedenen Thymomgeweben war dabei nicht erkennbar (Abb. 25a, b).

Wurde ein schwächeres Signal für MIG ermittelt, so war auch die Expression von I-TAC in dem entsprechenden Gewebe schwächer (Abb. 25a). Dieser Befund läßt auf eine ähnliche Expressionskontrolle für diese beiden IFN- $\gamma$ -abhängigen Chemokine schließen. Dazu passend stimmen die beiden Chemokine in ihrer Funktion überein. Erstens zeigen beide eine hohe chemotaktische Aktivität für IL-2-stimulierte T-Zellen, zweitens sind sie aber nicht aktiv gegenüber unstimulierten bzw. naiven T-Zellen. Man geht deshalb davon aus, daß mittels eines chemischen Gradienten durch diese beiden Chemokine bei Immunreaktionen Effektorzellen angezogen werden (Luster, 1998). Sowohl MIG als auch I-TAC wirken dabei über den Rezeptor CXCR3, wobei I-TAC mit einer höheren Affinität an diesen Rezeptor bindet als MIG (Cole *et al.*, 1998). Zweitens nehmen beide Chemokine insofern Einfluß auf die TH1/TH2-Balance, als der Rezeptor CXCR3 vorzugsweise auf Effektor- bzw. Gedächtnis-T-Zellen des TH0- bzw. TH1-Typs gefunden wird (Sallusto *et al.*, 1998). Diesbezüglich ist interessant, daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine signifikante Erhöhung des Chemokins I-TAC speziell in MG-assozierten Thymomgeweben gefunden wurde (Abb. 25a, Abb. 26), während das TH2 Chemokin MDC, wie oben diskutiert, keine abnorme Expression aufwies. Diese neuen Befunde passen sehr gut zu älteren Untersuchungen, die in MG-assozierten Thymomen bisher ausschließlich autoreaktive T-Zellen des TH0 oder TH1 Typs nachgewiesen haben (Nagvekar *et al.*, 1998b). Weiterhin spricht für diese Sichtweise der Befund, daß TH2-vermittelte Immunreaktionen wie die Antikörperproduktion durch B-Zellen in Thymomen kaum stattfinden (Newsom-Davis *et al.*, 1987).

Da MIG und I-TAC auf aktivierte T-Zellen chemotaktisch wirken und eine erhöhte I-TAC-Expression in MG-assozierten Thymomen gefunden wurde (Abb. 25a, Abb. 26), könnte vermutet werden, daß sich eine vermehrte Anzahl aktivierter T-Zellen in Thymomen befindet. Es

konnte jedoch gezeigt werden, daß IL-2-Rezeptor (CD25) exprimierende T-Zellen in Thymomen kaum vorkommen (Nenninger *et al.*, 1998), und daß die Migration von Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen gegen das Tetanus Toxoid aus der Peripherie in Thymome im Vergleich zum Thymus verändert ist (Abb. 24b). Ob die signifikante Korrelation zwischen der erhöhten I-TAC-Expression und MG-assoziierten Thymomen Ausdruck einer kausalen, d. h. pathogenetisch relevanten Beziehung ist, muß beim jetzigen Erkenntnisstand daher offenbleiben.

BLC (BCA-1) ist das einzige bisher bekannte Chemokin, welches spezifisch nur auf reife B-Zellen wirkt (Gunn *et al.*, 1998; Legler *et al.*, 1998). In der Maus wird das Chemokin vermutlich von folliculären dendritischen Zellen innerhalb von B-Zell-Follikeln gebildet (Gunn *et al.*, 1998). BLC wird konstitutiv in sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Peyer'sche Plaques) exprimiert (Gunn *et al.*, 1998; Legler *et al.*, 1998). Bei der Untersuchung humaner Gewebe wurde die stärkste BLC-Expression überraschenderweise in Lebergewebe detektiert, obwohl in der Leber keine B-Zellen vorkommen. Eine schwächere Expression war u.a. in Milz- und Lymphknotengewebe zu finden. Eine Expression im humanen Thymusgewebe konnte dagegen bisher (mittels Northern Blot) nicht nachgewiesen werden (Legler *et al.*, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließ sich hingegen mittels der sensitiveren RT-PCR eine Expression im Normalthymus bzw. in entzündlich-verändertem Thymusgewebe (Thymitis) finden (Abb. 25a, Tabelle 8). Außerdem konnte in 4 von 9 kortikalen und 1 von 8 gemischten Thymomgeweben ein PCR-Signal für dieses Chemokin detektiert werden, wohingegen in den 4 untersuchten Fällen medullärer Thymome (Abb. 25b) gar keine Expression gefunden wurde. Was die Intensität der BLC-Expression angeht, so ließ sich folgende Reihenfolge aufstellen: nicht-neoplastischer Thymus > kortikale Thymome > gemischte Thymome > medulläre Thymome (siehe Tabelle 8, Abb. 25). Diese Reihenfolge läßt für zukünftige *in situ* Analysen die Vermutung zu, daß die Produktion von BLC wahrscheinlich durch Lymphozyten im Thymomgewebe erfolgt.

Daß die beobachtete BLC-Expression im Thymus und in Thymomgewebe von biologischer Bedeutung sein könnte, wird durch die Beobachtung nahegelegt, daß die Ergebnisse der RT-PCR-Reaktion (Abb. 25a, Tabelle 8) in den meisten Fällen (17 von 19) mit der Anzahl der B-Zellen korreliert waren, die mit Hilfe der Immunhistochemie in den entsprechenden Geweben dargestellt wurden (Tabelle 8). Dieses Ergebnis paßt gut zu der Ansicht, daß BLC am „homing“ von B-Zellen und der Entwicklung B-Zell-reicher Areale in sekundären lymphatischen Geweben beteiligt ist (Bowman *et al.*, 2000; Legler *et al.*, 1998). Neu ist allerdings aufgrund unserer Befunde (Tabelle 8) die Hypothese, daß BLC diese Rolle auch im Thymus bzw. in Thymomgewebe spielen könnte. Diese Hypothese ist für die Thymusphysiologie von Bedeu-

tung, da bisher unklar ist, ob intrathymische B-Zellen im Thymus entstehen oder aus der Peripherie einwandern (Martin *et al.*, 1996) bzw. welche Rolle die Migration von B-Zellen für die Größe der intrathymischen B-Zell-Population spielt. Die Analyse von BLC „knock out“-Mäusen, evtl. unter Einschluß von Thymustransplantaten könnte für die Beantwortung dieser Frage möglicherweise aufschlußreich sein. Da die Korrelation zwischen BLC-Expression und B-Zell-Anzahl im Thymusgewebe nicht in allen Fällen gegeben war (Abb. 25, Fälle 4 + 15), sind vermutlich auch noch andere Faktoren an der Migration von B-Zellen in thymisches Gewebe beteiligt. Dies wurde auch für die B-Zell-Migration in Lymphknoten bei der Maus postuliert, da nicht in allen Follikeln innerhalb des Lymphknotens eine BLC-Expression nachgewiesen werden konnte (Gunn *et al.*, 1998).

Ob die nachgewiesene Produktion von BLC im Thymus bzw. Thymom auf follikuläre dendritische Zellen oder andere Zellen zurückgeführt werden kann, müßte zudem in weiteren Untersuchungen (Immunhistochemie, *in situ* Hybridisierung) nachgewiesen werden.

Eine Korrelation der intratumorösen BLC-Expression mit dem MG-Status der Thymompatienten konnte nicht festgestellt werden. Auch in der Literatur ist bisher kein Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und einer erhöhten bzw. erniedrigten BLC-Expression beschrieben worden.

Schon die bisher durchgeführten semiquantitativen RT-PCR-Analysen der Chemokinexpression in Thymomen lassen es höchst wahrscheinlich erscheinen, daß Chemokinen eine wesentliche Bedeutung bei der Gestaltung des Mikromilieus im Thymus und in Thymomen zukommt. Zukünftige Studien sollten dabei sowohl weitere Chemokine in die Analyse miteinbeziehen, die ebenfalls an der Thymozytenreifung beteiligt zu sein scheinen wie die Faktoren MIP-3 $\beta$  (Macrophage inflammatory protein beta), SLC (Secondary lymphoid-tissue chemokine), TARC (Thymus and activation-regulated chemokine) und SDF-1 $\alpha$  (Stromal cell derived Factor 1 alpha) (Campbell and Butcher, 2000), als auch quantitative Aspekte sowie die Chemokinproteinexpression betonen. Dabei sind insbesondere auch *in situ* Analysen wichtig, um die zellulären Produzenten der Chemokine und ihre Zielzellen im Normalthymus und in Thymomen zu identifizieren. Schließlich sollten diese Befunde mit Daten zur T-Zell-Reifung und -Funktion korreliert werden, wie sie in der vorliegenden Arbeit mitgeteilt worden sind. Von solchen Untersuchungen sind Hinweise auf Ursachen für das gestörte Mikromilieu und die gestörte Zellmigration in Thymomen zu erwarten. Dabei sollten unbedingt auch bisher nicht berücksichtigte Chemokine beachtet werden, speziell solche, die für die Migration dendritischer Zellen wichtig sind, da diese Zellen ähnlich wie B-Zellen in Thymomen stark

---

reduziert sind und daher möglicherweise Bedeutung für die Entstehung Thymom-assoziiertes Autoimmunität haben.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe M., Oda N. and Sato Y. (1998) Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J Cell Physiol* **174**, 186-93.
- Ackrill A. M., Reid L. E., Gilbert C. S., Gewert D. R., Porter A. C., Lewin A. R., Stark G. R. and Kerr I. M. (1991) Differential response of the human 6-16 and 9-27 genes to alpha and gamma interferons. *Nucleic Acids Res* **19**, 591-8.
- Andreetta F., Baggi F., Antozzi C., Torchiana E., Bernasconi P., Simoncini O., Cornelio F. and Mantegazza R. (1997) Acetylcholine receptor alpha-subunit isoforms are differentially expressed in thymuses from myasthenic patients. *Am.J.Pathol.* **150**, 341-348.
- Annunziato F., Romagnani P., Cosmi L., Beltrame C., Steiner B. H., Lazzeri E., Raport C. J., Galli G., Manetti R., Mavilia C., Vanini V., Chantry D., Maggi E. and Romagnani S. (2000) Macrophage-derived chemokine and EBI1-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection. *J Immunol* **165**, 238-46.
- Arrunategui-Correa V., Dutt J. E. and Foster C. S. (1997) Analysis of T cell receptor V beta gene expression in B cell deficient mice after experimental herpes simplex virus keratitis. *Acta Virol* **41**, 145-52.
- Baggiolini M., Dewald B. and Moser B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* **15**, 675-705.
- Balasa B. and Sarvetnick N. (2000) Is pathogenic humoral autoimmunity a Th1 response? Lessons from (for) myasthenia gravis [see comments]. *Immunol Today* **21**, 19-23.
- Bell E. B., Sparshott S. M. and Bunce C. (1998) CD4+ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen--a unifying concept. *Immunol.Today* **19**, 60-64.
- Berzins S. P., Boyd R. L. and Miller J. F. (1998) The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J.Exp.Med.* **187**, 1839-1848.
- Berzins S. P., Godfrey D. I., Miller J. F. and Boyd R. L. (1999) A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 9787-9791.
- Bongioanni P., Ricciardi R., Pellegrino D. and Romano M. R. (1999) T-cell tumor necrosis factor-alpha receptor binding in myasthenic patients. *J Neuroimmunol* **93**, 203-7.
- Bowman E. P., Campbell J. J., Soler D., Dong Z., Manlongat N., Picarella D., Hardy R. R. and Butcher E. C. (2000) Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *J Exp Med* **191**, 1303-18.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandt R., Normanno N., Gullick W. J., Lin J. H., Harkins R., Schneider D., Jones B. W., Ciardiello F., Persico M. G., Armenante F. and et al. (1994) Identification and biological characterization of an epidermal growth factor-related protein: cripto-1. *J Biol Chem* **269**, 17320-8.

- Bratton S. B., MacFarlane M., Cain K. and Cohen G. M. (2000) Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **256**, 27-33.
- Brockhaus M., Schoenfeld H. J., Schlaeger E. J., Hunziker W., Lesslauer W. and Loetscher H. (1990) Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3127-31.
- Campbell J. J. and Butcher E. C. (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* **12**, 336-41.
- Campbell J. J., Foxman E. F. and Butcher E. C. (1997) Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. *Eur J Immunol* **27**, 2571-8.
- Campbell J. J., Hedrick J., Zlotnik A., Siani M. A., Thompson D. A. and Butcher E. C. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381-4.
- Campbell J. J., Pan J. and Butcher E. C. (1999) Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol* **163**, 2353-7.
- Carden M. J., Schlaepfer W. W. and Lee V. M. (1985) The structure, biochemical properties, and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. *J.Biol.Chem.* **260**, 9805-9817.
- Carlsson B., Wallin J., Pirskanen R., Matell G. and Smith C. I. (1990) Different HLA DR-DQ associations in subgroups of idiopathic myasthenia gravis. *Immunogenetics* **31**, 285-290.
- Castronovo V. (1993) Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis* **13**, 1-30.
- Chantry D., Romagnani P., Raport C. J., Wood C. L., Epp A., Romagnani S. and Gray P. W. (1999) Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood* **94**, 1890-8.
- Chilosi M., Iannucci A., Fiore Donati L., Tridente G., Pampanin M., Pizzolo G., Ritter M., Bofill M. and Janosy G. (1986) Myasthenia gravis: immunohistological heterogeneity in microenvironmental organization of hyperplastic and neoplastic thymuses suggesting different mechanisms of tolerance breakdown. *J.Neuroimmunol.* **11**, 191-204.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**, 156-159.
- Ciccodicola A., Dono R., Obici S., Simeone A., Zollo M. and Persico M. G. (1989) Molecular characterization of a gene of the 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. *Embo J* **8**, 1987-91.
- Cikes N., Momoi M. Y., Williams C. L., Howard F. M., Jr., Hoagland H. C., Whittingham S. and Lennon V. A. (1988) Striational autoantibodies: quantitative detection by enzyme immunoassay in myasthenia gravis, thymoma, and recipients of D-penicillamine or allogeneic bone marrow. *Mayo.Clin.Proc.* **63**, 474-481.

- Clausse N., Jackers P., Jares P., Joris B., Sobel M. E. and Castronovo V. (1996) Identification of the active gene coding for the metastasis-associated 37LRP/p40 multifunctional protein. *DNA Cell Biol* **15**, 1009-23.
- Cohen G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**, 1-16.
- Cole K. E., Strick C. A., Paradis T. J., Ogborne K. T., Loetscher M., Gladue R. P., Lin W., Boyd J. G., Moser B., Wood D. E., Sahagan B. G. and Neote K. (1998) Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* **187**, 2009-21.
- Courty J., Dauchel M. C., Caruelle D., Perderiset M. and Barritault D. (1991) Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* **180**, 145-51.
- Daggett D. F., Cohen M. W., Stone D., Nikolics K., Rauvala H. and Peng H. B. (1996) The role of an agrin-growth factor interaction in ACh receptor clustering. *Mol Cell Neurosci* **8**, 272-85.
- de Jong D., Richel D. J., Schenkeveld C., Boerrigter L. and van't Veer L. J. (1997) Oligoclonal peripheral T-cell lymphocytosis as a result of aberrant T- cell development in a cortical thymoma. *Diagn.Mol.Pathol.* **6**, 244-248.
- DeBeats M. and Vincent A. (1993) Myasthenia gravis. In *Harwood academic publishers* (Edited by Bona C., Siminovitch K., Zenetti M. and Theofilopoulos A.), p. 541-554.
- Delves P. J. and Roitt I. M. (2000) The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-17.
- Douek D. C., McFarland R. D., Keiser P. H., Gage E. A., Massey J. M., Haynes B. F., Polis M. A., Haase A. T., Feinberg M. B., Sullivan J. L., Jamieson B. D., Zack J. A., Picker L. J. and Koup R. A. (1998) Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection [see comments]. *Nature* **396**, 690-695.
- Drachman D. B., Angus C. W., Adams R. N., Michelson J. D. and Hoffman G. J. (1978) Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N.Engl.J.Med.* **298**, 1116-1122.
- Ebert A. D., Wechselberger C., Nees M., Clair T., Schaller G., Martinez-Lacaci I., Wallace-Jones B., Bianco C., Weitzel H. K. and Salomon D. S. (2000) Cripto-1-induced increase in vimentin expression is associated with enhanced migration of human Caski cervical carcinoma cells. *Exp Cell Res* **257**, 223-9.
- Engel A. G., Lambert E. H. and Howard F. M. (1977) Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin.Proc.* **52**, 267-280.
- Ertoy D., Ayhan A., Sarac E., Karaagaoglu E., Yasui W. and Tahara E. (2000) Clinicopathological implication of cripto expression in early stage invasive cervical carcinomas. *Eur J Cancer* **36**, 1002-7.

- Fang W., Hartmann N., Chow D. T., Riegel A. T. and Wellstein A. (1992) Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *J Biol Chem* **267**, 25889-97.
- Farber J. M. (1997) Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* **61**, 246-57.
- Fend F., Kirchner T., Marx A. and Muller Hermelink H. K. (1993) B-cells in thymic epithelial tumours. An immunohistochemical analysis of intra- and extraepithelial B-cell compartments. *Virchows.Arch.B.Cell.Pathol.Incl.Mol.Pathol.* **63**, 241-247.
- Fend F., Nachbaur D., Oberwasserlechner F., Kreczy A., Huber H. and Muller Hermelink H. K. (1991) Phenotype and topography of human thymic B cells. An immunohistologic study. *Virchows.Arch.B.Cell.Pathol.Incl.Mol.Pathol.* **60**, 381-388.
- Fernandes-Alnemri T., Armstrong R. C., Krebs J., Srinivasula S. M., Wang L., Bullrich F., Fritz L. C., Trapani J. A., Tomaselli K. J., Litwack G. and Alnemri E. S. (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7464-9.
- Fink P. J. and Bevan M. J. (1995) Positive selection of thymocytes. *Adv Immunol* **59**, 99-133.
- Frank R. (1992) Spot-Synthesis: An easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support. *Tetrahedron* **48**, 9217-9232.
- Friess H., Yamanaka Y., Buchler M., Kobrin M. S., Tahara E. and Korc M. (1994) Cripto, a member of the epidermal growth factor family, is over-expressed in human pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Int J Cancer* **56**, 668-74.
- Fujii Y., Monden Y., Nakahara K., Hashimoto J. and Kawashima Y. (1984) Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: production by lymphocytes from thymus or thymoma. *Neurology.* **34**, 1182-1186.
- Galli G., Chantry D., Annunziato F., Romagnani P., Cosmi L., Lazzeri E., Manetti R., Maggi E., Gray P. W. and Romagnani S. (2000) Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol* **30**, 204-10.
- Garver R. I., Jr., Radford D. M., Donis-Keller H., Wick M. R. and Milner P. G. (1994) Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer* **74**, 1584-90.
- Gehr G., Gentz R., Brockhaus M., Loetscher H. and Lesslauer W. (1992) Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cell activation. *J Immunol* **149**, 911-7.
- Gjermansen I. M., Justesen J. and Martensen P. M. (2000) The interferon-induced gene ISG12 is regulated by various cytokines as the gene 6-16 in human cell lines. *Cytokine* **12**, 233-8.
- Godiska R., Chantry D., Raport C. J., Sozzani S., Allavena P., Leviten D., Mantovani A. and Gray P. W. (1997) Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for

- monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* **185**, 1595-604.
- Goldflam. (1893) Über einen scheinbar heilbaren bulbär-paralytischen Symptomkomplex mit Beteiligung der Extremitäten. *Dtsch.Z.nervenheilk.* **4**, 312-352.
- Goto Y., Itoh M., Ogawa N., Ohashi H. and Ohno R. (1996) Increased production of B cell growth factor (BCGF) in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* **9**, 545-50.
- Grell M., Becke F. M., Wajant H., Mannel D. N. and Scheurich P. (1998) TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol* **28**, 257-63.
- Grommisch K., Hofmann W. J., Otto H. F., Willgeroth K. and Moll R. (1997) Complex and Differential Cytokeratin Profiles in Thymomas and Correlation with Normal Thymus. In *Epithelial Tumors of the Thymus* (Edited by Marx A. and Müller-Hermelink H. K.), p. 81-89. Plenum Press, New York.
- Guerder S. and Matzinger P. (1992) A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J.Exp.Med.* **176**, 553-564.
- Gunn M. D., Ngo V. N., Ansel K. M., Ekland E. H., Cyster J. G. and Williams L. T. (1998) A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* **391**, 799-803.
- Hampton B. S., Marshak D. R. and Burgess W. H. (1992) Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule. *Mol Biol Cell* **3**, 85-93.
- Harris N. L. and Muller-Hermelink H. K. (1999) Thymoma classification. A siren's song of simplicity. *Am J Clin Pathol* **112**, 299-303.
- Hehmke B., Michaelis D., Gens E., Laube F. and Kohnert K. D. (1995) Aberrant activation of CD8+ T-cell and CD8+ T-cell subsets in patients with newly diagnosed IDDM. *Diabetes* **44**, 1414-1419.
- Helmreich M. (1999) Durchflußzytometrische Analysen von T-Lymphozyten-Populationen aus Thymustumoren im Hinblick auf die Pathogenese der Myasthenia gravis. *Dissertation*. Institut für Pathologie der Universität Würzburg.
- Hohlfeld R., Kalies I., Kohleisen B., Heininger K., Conti Tronconi B. and Toyka K. V. (1986) Myasthenia gravis: stimulation of antireceptor autoantibodies by autoreactive T cell lines. *Neurology* **36**, 618-621.
- Hohlfeld R., Toyka K. V., Heininger K., Grosse Wilde H. and Kalies I. (1984) Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. *Nature* **310**, 244-246.
- Hoyne G. F., Dallman M. J. and Lamb J. R. (2000) T-cell regulation of peripheral tolerance and immunity: the potential role for Notch signalling. *Immunology* **100**, 281-8.
- Hu Q., Bazemore Walker C. R., Girao C., Opferman J. T., Sun J., Shabanowitz J., Hunt D. F. and Ashton-Rickardt P. G. (1997) Specific recognition of thymic self-peptides induces the positive selection of cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. **7**, 221-231.

- Huang D. R., Pirskanen R., Matell G. and Lefvert A. K. (1999) Tumour necrosis factor-alpha polymorphism and secretion in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* **94**, 165-71.
- Ignatowicz L., Kappler J. and Marrack P. (1996) The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*. **84**, 521-529.
- Jackers P., Minoletti F., Belotti D., Clausse N., Sozzi G., Sobel M. E. and Castronovo V. (1996) Isolation from a multigene family of the active human gene of the metastasis-associated multifunctional protein 37LRP/p40 at chromosome 3p21.3 [published erratum appears in *Oncogene* 1997 Feb 6;14(5):627]. *Oncogene* **13**, 495-503.
- Jacobson L., Beeson D., Tzartos S. and Vincent A. (1999) Monoclonal antibodies raised against human acetylcholine receptor bind to all five subunits of the fetal isoform. *J Neuroimmunol* **98**, 112-20.
- Jager R., Noll K., Havemann K., Pfluger K. H., Knabbe C., Rauvala H. and Zugmaier G. (1997) Differential expression and biological activity of the heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in lung cancer cell lines. *Int J Cancer* **73**, 537-43.
- Jameson S. C. and Bevan M. J. (1998) T-cell selection. *Curr Opin Immunol* **10**, 214-9.
- Jamieson B. D., Douek D. C., Killian S., Hultin L. E., Scripture-Adams D. D., Giorgi J. V., Marelli D., Koup R. A. and Zack J. A. (1999) Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* **10**, 569-75.
- Jiang D., Zheng L. and Lenardo M. J. (1999) Caspases in T-cell receptor-induced thymocyte apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 402-11.
- Jolly F. (1895) Über Myasthenia gravis pseudoparalytica. *Berl.Kli.Wschr.*, 1-7.
- Julien J. P. and Mushynski W. E. (1982) Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. *J.Biol.Chem.* **257**, 10467-10470.
- Kaufman D. L., Clare Salzler M., Tian J., Forsthuber T., Ting G. S., Robinson P., Atkinson M. A., Sercarz E. E., Tobin A. J. and Lehmann P. V. (1993) Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes [see comments]. *Nature*. **366**, 69-72.
- Kelly J. M., Porter A. C., Chernajovsky Y., Gilbert C. S., Stark G. R. and Kerr I. M. (1986) Characterization of a human gene inducible by alpha- and beta-interferons and its expression in mouse cells. *Embo J* **5**, 1601-6.
- Kirchner T., Hoppe F., Schalke B. and Muller Hermelink H. K. (1988a) Microenvironment of thymic myoid cells in myasthenia gravis. *Virchows.Arch.B.Cell.Pathol.Incl.Mol.Pathol.* **54**, 295-302.
- Kirchner T., Schalke B., Buchwald J., Ritter M., Marx A. and Muller Hermelink H. K. (1992) Well-differentiated thymic carcinoma. An organotypical low-grade carcinoma with relationship to cortical thymoma. *Am.J.Surg.Pathol.* **16**, 1153-1169.
- Kirchner T., Tzartos S., Hoppe F., Schalke B., Wekerle H. and Muller Hermelink H. K. (1988b) Pathogenesis of myasthenia gravis. Acetylcholine receptor-related antigenic determinants in tumor-free thymuses and thymic epithelial tumors. *Am.J.Pathol.* **130**, 268-280.

- Klein L. and Kyewski B. (2000) Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* **12**, 179-86.
- Kornstein M. J., Asher O. and Fuchs S. (1995) Acetylcholine receptor alpha-subunit and myogenin mRNAs in thymus and thymomas. *Am.J.Pathol.* **146**, 1320-1324.
- Kovanen P. E., Harju L. and Timonen T. (1996) Complementary DNA for 12-kilodalton B cell growth factor: misassigned [letter; comment]. *Science* **274**, 629-31.
- Kovanen P. E., Virtaneva K., Harju L., Kantor C., Gahmberg C. G. and Timonen T. (1995) Expression and characterization of a B cell growth promoting polypeptide derived from the 12 kDa B cell growth factor gene (BCGF 1). *FEBS Lett* **361**, 233-7.
- Kovesdi I., Fairhurst J. L., Kretschmer P. J. and Bohlen P. (1990) Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous, developmentally regulated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **172**, 850-4.
- Krause I., Blank M. and Shoenfeld Y. (2000) Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. *Crit Rev Immunol* **20**, 1-16.
- Kruisbeek A. M. and Amsen D. (1996) Mechanisms underlying T-cell tolerance. *Curr Opin Immunol* **8**, 233-44.
- Kuo T. (2000) Cytokeratin profiles of the thymus and thymomas: histogenetic correlations and proposal for a histological classification of thymomas [see comments]. *Histopathology* **36**, 403-14.
- Kurts C., Carbone F. R., Barnden M., Blanas E., Allison J., Heath W. R. and Miller J. F. (1997) CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J.Exp.Med.* **186**, 2057-2062.
- Kuruc N., Leube R. E., Moll I., Bader B. L. and Franke W. W. (1989) Synthesis of cytokeratin 13, a component characteristic of internal stratified epithelia, is not induced in human epidermal tumors. *Differentiation* **42**, 111-23.
- Laaroubi K., Delbe J., Vacherot F., Desgranges P., Tardieu M., Jaye M., Barritault D. and Courty J. (1994) Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affinity regulatory peptide. *Growth Factors* **10**, 89-98.
- Laaroubi K., Vacherot F., Delbe J., Caruelle D., Barritault D. and Courty J. (1995) Biochemical and mitogenic properties of the heparin-binding growth factor HARP. *Prog Growth Factor Res* **6**, 25-34.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lang B., Richardson G., Rees J., Vincent A. and Newsom Davis J. (1988) Plasma from myasthenia gravis patients reduces acetylcholine receptor agonist-induced Na<sup>+</sup> flux into TE671 cell line. *J.Neuroimmunol.* **19**, 141-148.

- Ledoux D., Caruelle D., Sabourin J. C., Liu J., Crepin M., Barritault D. and Courty J. (1997) Cellular distribution of the angiogenic factor heparin affinity regulatory peptide (HARP) mRNA and protein in the human mammary gland. *J Histochem Cytochem* **45**, 1239-45.
- Legler D. F., Loetscher M., Roos R. S., Clark-Lewis I., Baggiolini M. and Moser B. (1998) B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* **187**, 655-60.
- Lenschow D. J., Walunas T. L. and Bluestone J. A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**, 233-58.
- Levine G. D. and Rosai J. (1978) Thymic hyperplasia and neoplasia: a review of current concepts. *Hum.Pathol.* **9**, 495-515.
- Li Y. S., Milner P. G., Chauhan A. K., Watson M. A., Hoffman R. M., Kodner C. M., Milbrandt J. and Deuel T. F. (1990) Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* **250**, 1690-4.
- Lindstrom J., Shelton D. and Fujii Y. (1988) Myasthenia gravis. *Adv.Immunol.* **42**, 233-284.
- Loutrari H., Kokla A., Trakas N. and Tzartos S. J. (1997) Expression of human-Torpedo hybrid acetylcholine receptor (AChR) for analysing the subunit specificity of antibodies in sera from patients with myasthenia gravis (MG). *Clin.Exp.Immunol.* **109**, 538-546.
- Luster A. D. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**, 436-45.
- Machens A., Loliger C., Pichlmeier U., Emskotter T., Busch C. and Izbecki J. R. (1999) Correlation of thymic pathology with HLA in myasthenia gravis. *Clin.Immunol.* **91**, 296-301.
- Manfredi A. A., Protti M. P., Dalton M. W., Howard J. F., Jr. and Conti Tronconi B. M. (1993) T helper cell recognition of muscle acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Epitopes on the gamma and delta subunits. *J.Clin.Invest.* **92**, 1055-1067.
- Manley N. R. (2000) Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation [In Process Citation]. *Semin Immunol* **12**, 421-8.
- Martin A., Vicente A., Torroba M., Moreno C., Jimenez E. and Zapata A. G. (1996) Increased numbers of CD5+ B cells in the thymus of estradiol benzoate-treated rats. *Thymus* **24**, 111-27.
- Marx A., Kirchner T., Greiner A., Müller-Hermelink H. K., Schalke B. and Osborn M. (1992) Neurofilament epitopes in thymoma and anti-axonal autoantibodies in myasthenia gravis. *Lancet.* **339**, 707-708.
- Marx A. and Müller-Hermelink H. K. (1999) From basic immunobiology to the upcoming WHO-classification of tumors of the thymus. The Second Conference on Biological and Clinical Aspects of Thymic Epithelial Tumors and related recent developments. *Pathol.Res.Pract.* **195**, 515-533.
- Marx A., O'Connor R., Geuder K. I., Hoppe F., Schalke B., Tzartos S., Kalies I., Kirchner T. and Müller-Hermelink H. K. (1990) Characterization of a protein with an acetylcholine receptor epitope from myasthenia gravis-associated thymomas. *Lab.Invest.* **62**, 279-286.

- Marx A., Wilisch A., Schultz A., Gattenlöhner S., Nenninger R. and Müller-Hermelink H. K. (1997) Pathogenesis of Myasthenia gravis. *Virchows Archive* **430**, 355-364.
- Marx A., Wilisch A., Schultz A., Greiner A., Magi B., Pallini V., Schalke B., Toyka K., Nix W., Kirchner T. and Müller-Hermelink H. K. (1996) Expression of neurofilaments and of a titin epitope in thymic epithelial tumors. Implications for the pathogenesis of myasthenia gravis. *Am.J.Pathol.* **148**, 1839-1850.
- Mason D. and Powrie F. (1998) Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr.Opin.Immunol.* **10**, 649-655.
- Melms A., Malcherek G., Gern U., Sommer N., Weissert R., Wietholter H. and Buhning H. J. (1993) Thymectomy and azathioprine have no effect on the phenotype of CD4 T lymphocyte subsets in myasthenia gravis. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* **56**, 46-51.
- Menard S., Castronovo V., Tagliabue E. and Sobel M. E. (1997) New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. *J Cell Biochem* **67**, 155-65.
- Moiola L., Galbiati F., Martino G., Amadio S., Brambilla E., Comi G., Vincent A., Grimaldi L. M. and Adorini L. (1998) IL-12 is involved in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis, an antibody-mediated disease. *Eur J Immunol* **28**, 2487-97.
- Moiola L., Protti M. P., McCormick D., Howard J. F. and Conti-Tronconi B. M. (1994) Myasthenia gravis. Residues of the alpha and gamma subunits of muscle acetylcholine receptor involved in formation of immunodominant CD4+ epitopes. *J Immunol* **152**, 4686-98.
- Monteiro J., Hingorani R., Peroglizzi R., Apatoff B. and Gregersen P. K. (1996) Oligoclonality of CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity.* **23**, 127-138.
- Müller-Hermelink H. K., Marx A. and Kirchner T. (1996) Thymus and Mediastinum. In *Anderson's Pathology* (Edited by Damjanov I. and Linder J.), Vol. 10, p. 1218-1243. Patterson,A.S., St.Louis, Missouri.
- Müller-Hermelink H. K. (1986) *The Human Thymus Histophysiology and Pathology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Müller-Hermelink H. K., Marino M. and Palestro G. (1986) Pathology of thymic epithelial tumors. *Curr.Top.Pathol.* **75**, 207-268.
- Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (1999) Pathological aspects of malignant and benign thymic disorders. *Ann.Med.* **31 Suppl 2:5-14**, 5-14.
- Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (2000) Thymoma. *Curr Opin Oncol* **12**, 426-33.
- Müller-Hermelink H. K., Marx A., Geuder K. and Kirchner T. (1993) The pathological basis of thymoma-associated myasthenia gravis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **681**, 56-65.
- Myers M. W., Lazzarini R. A., Lee V. M., Schlaepfer W. W. and Nelson D. L. (1987) The human mid-size neurofilament subunit: a repeated protein sequence and the relationship of its gene to the intermediate filament gene family. *EMBO J.* **6**, 1617-1626.

- Nagvekar N., Jacobson L. W., Willcox N. and Vincent A. (1998a) Epitopes expressed in myasthenia gravis (MG) thymomas are not recognized by patients' T cells or autoantibodies [In Process Citation]. *Clin.Exp.Immunol.* **112**, 17-20.
- Nagvekar N., Moody A. M., Moss P., Roxanis I., Curnow J., Beeson D., Pantic N., Newsom-Davis J., Vincent A. and Willcox N. (1998b) A pathogenetic role for the thymoma in myasthenia gravis. Autosensitization of IL-4-producing T cell clones recognizing extracellular acetylcholine receptor epitopes presented by minority class II isotypes. *J.Clin.Invest.* **101**, 2268-2277.
- Nenninger R., Schultz A., Hoffacker V., Helmreich M., Wilisch A., Vandekerckhove B., Hünig T., Schalke B., Schneider C., Tzartos S., Kalbacher H., Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (1998) Abnormal thymocyte development and generation of autoreactive T cells in mixed and cortical thymomas. *Lab.Invest.* **78**, 743-753.
- Nenninger R., Schultz A., Vandekerckhove B., Hünig T., Schalke B., Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (1997) Abnormal T Lymphocyte Development in Myasthenia gravis-associated Thymomas. In *Epithelial tumors of the thymus* (Edited by Marx A. and Müller-Hermelink H. K.), p. 165-177. Plenum press, New York, London.
- Newsom-Davis J., Willcox N. and Schlupe M. (1987) Immunological Heterogeneity and Cellular Mechanisms in Myasthenia Gravis. In *Myasthenia Gravis: Biology and Treatment*. (Edited by Drachman D. B.), p. 12-32. The New York Academy of Science, New York.
- Niemeyer C. C., Persico M. G. and Adamson E. D. (1998) Cripto: roles in mammary cell growth, survival, differentiation and transformation. *Cell Death Differ* **5**, 440-9.
- Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V. and Kollias G. (1996) Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response [see comments]. *J Exp Med* **184**, 1397-411.
- Pasparakis M., Alexopoulou L., Grell M., Pfizenmaier K., Bluethmann H. and Kollias G. (1997) Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Aug 19;94(17):9510]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6319-23.
- Protti M. P., Manfredi A. A., Wu X. D., Moiola L., Howard J. F., Jr. and Conti-Tronconi B. M. (1991) Myasthenia gravis. T epitopes on the delta subunit of human muscle acetylcholine receptor. *J Immunol* **146**, 2253-61.
- Rathmell J. C. and Thompson C. B. (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* **17**, 781-828.
- Rauvala H. (1989) An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *Embo J* **8**, 2933-41.
- Rollins B. J. (1997) Chemokines. *Blood* **90**, 909-28.

- Rosai J. and Sobin L. H. (1999) Histological typing of tumours of the thymus. In *World Health Organisation, International Histological Classification of Tumours*, p. 1-65. Springer, Heidelberg.
- Sallusto F., Lenig D., Mackay C. R. and Lanzavecchia A. (1998) Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**, 875-83.
- Sant'Angelo D. B., Waterbury P. G., Cohen B. E., Martin W. D., Van Kaer L., Hayday A. C. and Janeway C. A., Jr. (1997) The imprint of intrathymic self-peptides on the mature T cell receptor repertoire. *Immunity*. **7**, 517-524.
- Sato M., Miyado K., Okazaki M. and Kimura M. (1997) Regulation of osteoblast-specific factor-1 (OSF-1) mRNA expression by dual promoters as revealed by RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 831-7.
- Sato Y., Watanabe S., Mukai K., Kodama T., Upton M. P., Goto M. and Shimosato Y. (1986) An immunohistochemical study of thymic epithelial tumors. II. Lymphoid component. *Am.J.Surg.Pathol.* **10**, 862-870.
- Sauty A., Dziejman M., Taha R. A., Iarossi A. S., Neote K., Garcia-Zepeda E. A., Hamid Q. and Luster A. D. (1999) The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol* **162**, 3549-58.
- Schoepfer R., Luther M. and Lindstrom J. (1988) The human medulloblastoma cell line TE671 expresses a muscle-like acetylcholine receptor. Cloning of the alpha-subunit cDNA. *FEBS Lett.* **226**, 235-240.
- Schultz A. (1997) Zell- und molekularbiologische Untersuchungen zur intrathymischen Pathogenese der paraneoplastischen Myasthenia gravis. *Dissertation*. Institut für Pathologie der Universität Würzburg.
- Schultz A., Hoffacker V., Wilisch A., Nix W., Gold R., Schalke B., Tzartos S., Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (1999) Neurofilament is an autoantigenic determinant in myasthenia gravis. *Ann.Neurol.* **46**, 167-175.
- Schultz A., Wilisch A., Hoffacker V., Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (1997) Neurofilament reactive T cells are characteristic for patients with paraneoplastic myasthenia gravis. *Immunobiology* **197**, 251.
- Sebzda E., Mariathan S., Ohteki T., Jones R., Bachmann M. F. and Ohashi P. S. (1999) Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* **17**, 829-74.
- Sercarz E. E. (2000) Driver clones and determinant spreading. *J Autoimmun* **14**, 275-7.
- Sharma S., Mehta S., Morgan J. and Maizel A. (1987) Molecular cloning and expression of a human B-cell growth factor gene in Escherichia coli. *Science* **235**, 1489-92.
- Siara J., Rudel R. and Marx A. (1991) Absence of acetylcholine-induced current in epithelial cells from thymus glands and thymomas of myasthenia gravis patients. *Neurology*. **41**, 128-131.

- Sommer N., Harcourt G. C., Willcox N., Beeson D. and Newsom Davis J. (1991) Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. *Neurology* **41**, 1270-1276.
- Sommer N., Willcox N., Harcourt G. C. and Newsom Davis J. (1990) Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T cells. *Ann.Neurol.* **28**, 312-319.
- Speiser D. E., Sebзда E., Ohteki T., Bachmann M. F., Pfeffer K., Mak T. W. and Ohashi P. S. (1996) Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur J Immunol* **26**, 3055-60.
- Ströbel P., Helmreich M., Kalbacher H., Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (2000) Evidence for Distinct Mechanisms in the Shaping of the CD4 T Cell Repertoire in Histologically distinct Myasthenia Gravis-Associated Thymomas. *Dev. Immunol.* (in press).
- Tahara H., Kamada K., Sato E., Tsuyama N., Kim J. K., Hara E., Oda K. and Ide T. (1995) Increase in expression levels of interferon-inducible genes in senescent human diploid fibroblasts and in SV40-transformed human fibroblasts with extended lifespan. *Oncogene* **11**, 1125-32.
- Takahama Y., Letterio J. J., Suzuki H., Farr A. G. and Singer A. (1994a) Early progression of thymocytes along the CD4/CD8 developmental pathway is regulated by a subset of thymic epithelial cells expressing transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.* **179**, 1495-1506.
- Takahama Y., Suzuki H., Katz K. S., Grusby M. J. and Singer A. (1994b) Positive selection of CD4+ T cells by TCR ligation without aggregation even in the absence of MHC. *Nature.* **371**, 67-70.
- Takeuchi Y., Fujii Y., Okumura M., Inada K., Nakahara K. and Matsuda H. (1995) Accumulation of immature CD3-CD4+CD8- single-positive cells that lack CD69 in epithelial cell tumors of the human thymus. *Cell.Immunol.* **161**, 181-187.
- Tesch H., Hohlfeld R. and Toyka K. V. (1989) Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in the thymus of myasthenia gravis patients. *J.Neuroimmunol.* **21**, 169-176.
- Thoma B., Grell M., Pfizenmaier K. and Scheurich P. (1990) Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *J Exp Med* **172**, 1019-23.
- Thomas C. R., Wright C. D. and Loehrer P. J. (1999) Thymoma: state of the art. *J Clin Oncol* **17**, 2280-9.
- Tiwari R. K., Wong G. Y., Mukhopadhyay B., Telang N. T., Liu J., Hakes T. B. and Osborne M. P. (1991) Interferon-alpha and gamma mediated gene responses in a human breast carcinoma cell line. *Breast Cancer Res Treat* **18**, 33-41.
- Toyka K. V., Brachman D. B., Pestronk A. and Kao I. (1975) Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science* **190**, 397-399.
- Toyka K. V., Drachman D. B., Griffin D. E., Pestronk A., Winkelstein J. A., Fishbeck K. H. and Kao I. (1977) Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N.Engl.J.Med.* **296**, 125-131.

- Tracey K. J. and Cerami A. (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 317-43.
- Tumilowicz J. J., Nichols W. W., Cholon J. J. and Greene A. E. (1970) Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer.Res.* **30**, 2110-2118.
- Tzartos S. J. and Lindstrom J. M. (1980) Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 755-9.
- Tzartos S. J. and Remoundos M. S. (1992) Precise epitope mapping of monoclonal antibodies to the cytoplasmic side of the acetylcholine receptor alpha subunit. Dissecting a potentially myasthenogenic epitope. *Eur.J.Biochem.* **207**, 915-922.
- van der Kwast T. H., van Vliet E., Cristen E., van Ewijk W. and van der Heul R. O. (1985) An immunohistologic study of the epithelial and lymphoid components of six thymomas. *Hum Pathol* **16**, 1001-8.
- Van Parijs L. and Abbas A. K. (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280**, 243-248.
- Vanhecke D., Leclercq G., Plum J. and Vandekerckhove B. (1995a) Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69+CD3+ thymocytes and identification of thymic emigrants. *J.Immunol.* **155**, 1862-1872.
- Vanhecke D., Verhasselt B., Debacker V., Leclercq G., Plum J. and Vandekerckhove B. (1995b) Differentiation to T helper cells in the thymus. Gradual acquisition of T helper cell function by CD3+CD4+ cells. *J.Immunol.* **155**, 4711-4718.
- Vincent A., Beeson D. and Lang B. (2000) Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission. *Eur J Biochem* **267**, 6717-6728.
- Vincent A., Jacobson L., Plested P., Polizzi A., Tang T., Riemersma S., Newland C., Ghorazian S., Farrar J., MacLennan C., Willcox N., Beeson D. and Newsom-Davis J. (1998a) Antibodies affecting ion channel function in acquired neuromyotonia, in seropositive and seronegative myasthenia gravis, and in antibody-mediated arthrogyrosis multiplex congenita. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **841:482-96**, 482-496.
- Vincent A., Whiting P. J., Schluep M., Heidenreich F., Lang B., Roberts A., Willcox N. and Newsom Davis J. (1987) Antibody heterogeneity and specificity in myasthenia gravis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **505**, 106-120.
- Vincent A. and Willcox N. (1994) Characterization of specific T cells in myasthenia gravis. *Immunol.Today.* **15**, 41-42.
- Vincent A. and Willcox N. (1999) The role of T-cells in the initiation of autoantibody responses in thymoma patients. *Pathol.Res.Pract.* **195**, 535-540.
- Vincent A., Willcox N., Hill M., Curnow J., MacLennan C. and Beeson D. (1998b) Determinant spreading and immune responses to acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Immunol.Rev.* **164:157-68**, 157-168.

- von Boehmer H. (1992) Thymic selection: a matter of life and death. *Immunol.Today* **13**, 454-458.
- Wang H. B., Li H., Shi F. D., Chambers B. J., Link H. and Ljunggren H. G. (2000a) Tumor necrosis factor receptor-1 is critically involved in the development of experimental autoimmune myasthenia gravis [In Process Citation]. *Int Immunol* **12**, 1381-8.
- Wang J., Zheng L., Lobito A., Chan F. K., Dale J., Sneller M., Yao X., Puck J. M., Straus S. E. and Lenardo M. J. (1999) Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**, 47-58.
- Wang Z. Y., Diethelm-Okita B., Okita D. K., Kaminski H. J., Howard J. F. and Conti-Fine B. M. (2000b) T cell recognition of muscle acetylcholine receptor in ocular myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* **108**, 29-39.
- Wang Z. Y., Okita D. K., Howard J., Jr. and Conti-Fine B. M. (1997) Th1 epitope repertoire on the alpha subunit of human muscle acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *Neurology*. **48**, 1643-1653.
- Wang Z. Y., Okita D. K., Howard J., Jr. and Conti-Fine B. M. (1998) T-cell recognition of muscle acetylcholine receptor subunits in generalized and ocular myasthenia gravis. *Neurology*. **50**, 1045-1054.
- Wekerle H., Ketelsen U. P., Zurn A. D. and Fulpius B. W. (1978) Intrathymic pathogenesis of myasthenia gravis: transient expression of acetylcholine receptors on thymus-derived myogenic cells. *Eur.J.Immunol.* **8**, 579-582.
- Wilisch A., Gutsche S., Hoffacker V., Schultz A., Tzartos S., Nix W., Schalke B., Schneider C., Müller-Hermelink H. K. and Marx A. (1999) Association of acetylcholine receptor alpha-subunit gene expression in mixed thymoma with myasthenia gravis. *Neurology* **52**, 1460-1466.
- Willcox N. (1993) Myasthenia gravis. *Curr.Opin.Immunol.* **5**, 910-917.
- Wurbel M. A., Philippe J. M., Nguyen C., Victorero G., Freeman T., Wooding P., Miazek A., Mattei M. G., Malissen M., Jordan B. R., Malissen B., Carrier A. and Naquet P. (2000) The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* **30**, 262-71.
- Xu C., Liguori G., Persico M. G. and Adamson E. D. (1999) Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development* **126**, 483-94.
- Youn B. S., Kim C. H., Smith F. O. and Broxmeyer H. E. (1999) TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* **94**, 2533-6.
- Zabel B. A., Agace W. W., Campbell J. J., Heath H. M., Parent D., Roberts A. I., Ebert E. C., Kassam N., Qin S., Zovko M., LaRosa G. J., Yang L. L., Soler D., Butcher E. C., Ponath P. D., Parker C. M. and Andrew D. P. (1999) Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine

receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* **190**, 1241-56.

Zhang G. X., Navikas V. and Link H. (1997) Cytokines and the pathogenesis of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* **20**, 543-51.

Zhang G. X., Xiao B. G., Bakhiet M., van der Meide P., Wigzell H., Link H. and Olsson T. (1996) Both CD4+ and CD8+ T cells are essential to induce experimental autoimmune myasthenia gravis. *J.Exp.Med.* **184**, 349-356.

Zhang N. and Deuel T. F. (1999) Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors. *Curr Opin Hematol* **6**, 44-50.

Zheng L., Fisher G., Miller R. E., Peschon J., Lynch D. H. and Lenardo M. J. (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* **377**, 348-51.

Zlotnik A., Morales J. and Hedrick J. A. (1999) Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* **19**, 1-47.

## 6 ANHANG

### 6.1 Verwendete Oligonukleotide

BCGF1-FOR	5'	cctataatcccatcactgtgg	'3
BCGF1-REV	5'	cccagccaaagcctctcttt	'3
BLC-FOR	5'	gctgctggtcagcagcctctct	'3
BLC-REV	5'	acactggaactggtagagttgaag	'3
DELTA4-FOR	5'	cgcggatccgccacttccgaacaccagcacc	'3
DELTA4-REV	5'	ggaattccgcggtccactgtgcgggcca	'3
DELTA5-FOR	5'	cgcggatccgcgaccagaacaattacaatgaggag	'3
DELTA5-REV	5'	ggaattccgatgaagcgcttgtcctgcacg	'3
GAPDH-FOR	5'	tgaaggtcggagtcaacggatttggt	'3
GAPDH-REV	5'	gtggaaggactcatgaccacagtc	'3
GENE6-16-FOR	5'	gtgctcggagagctcggaca	'3
GENE6-16-REV	5'	tcgagatacttgtgggtggcg	'3
HBGAM-FOR	5'	gtcgaaaatttgcagctgcctt	'3
HBGAM-REV	5'	tcttctcctgtttcttgccttc	'3
ITAC-FOR	5'	ggctgtgatattgtgtgctacagt	'3
ITAC-REV	5'	cttcgatttgggatttaggcacg	'3
LAMR-FOR	5'	ccggagcccttgatgtcctg	'3
LAMR-REV	5'	ccacaagaagccgtggctcc	'3
MDC-FOR	5'	cgcgtggtgaaacacttctac	'3
MDC-REV	5'	ggcagaggatgggttagagg	'3
MIG-FOR	5'	ctgaggcacatgtcagcaagtcc	'3
MIG-REV	5'	ctaagctggactgagtgaggatg	'3
NFMA-FOR	5'	cggatcccgatgagctacacgttg	'3
NFMA-REV	5'	ggaattccctcatcctccactttg	'3
NFMC-FOR	5'	cggaattccgtcccctgtaaagga	'3
NFMC-REV	5'	ccgctcgagcggagtcactctgggtgac	'3
TDGF1-FOR	5'	atggactgcaggaagatggtc	'3
TDGF1-REV	5'	aatagtagctttgtatagaaaggc	'3
TECK-FOR	5'	caaggtgtctttgaggactgctg	'3
TECK-REV	5'	ctgctgctgatgggattgctaaac	'3
TGFbeta-FOR	5'	aaccacaacgaaatctatgac	'3
TGFbeta-REV	5'	cttctccgtggacctgaagcaa	'3

### 6.2 PCR-Bedingungen

Alle PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 min 94 °C

(Anzahl Zyklen ) x (30 sec 94 °C, 30 sec (Annealing Temp.), 30 sec 72 °C)

2 min 72 °C

∞ 4 °C

**Tabelle 9: RT-PCR-Bedingungen (siehe Abb. 18, Abb. 19 und Abb. 25)**

<b>PCR-Produkt</b>	<b>Größe [bp]</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>	<b>Puffer</b>	<b>Anzahl Zyklen</b>
GAPDH	492	60	F	22
LamR	366	61	PCR (1.5)	42
Gene 6-16	291	60	F	42
BCGF 1	254	58	PCR (2.5)	36
TGFb	532	60	PCR (1.5)	40
TDGF 1	564	61	PCR (2.5)	40
HB-GAM	464	59	F	37
I-TAC	210	66	D	35
MIG	460	67	D	40
BLC	278	65	B	42
MDC	343	60	F	35
TECK	339	67	C	35

Erläuterung zu den Puffern: Die Buchstaben geben den jeweiligen Puffer des PCR Optimizer Kits (Invitrogen, Groningen, Niederlande) an. PCR: Mit der Taq-Polymerase (GIBCO BRL, Eggenstein) mitgelieferter 10-fach Puffer; in Klammern ist die Magnesiumendkonzentration in mM angegeben.

### 6.3 Patientendaten

**Tabelle 10: Klinische und pathologische Daten der Thymom- und Thymitispatienten, deren intratumoröse T-Zellen für Proliferationsassays eingesetzt wurden (siehe Abb. 13 und Tabelle 8: T-Zell-Proliferationstests mit verschiedenen Fragmenten des  $\alpha$ AChR und dem Fragment NF-M-B (459-737))**

Patienten- gruppe	Geschlecht/Alter		Tumor- stadium nach Masaoka	anti-AChR An- tikörpertiter	Immunhistochemie		Immunsuppressive Behandlung
	weiblich	männlich			m AK 155	mAK NN18	
<b>TFH/MG+</b>	11 Fälle 18 - 37 Jahre	5 Fälle 15 - 28 Jahre		<0,5 - 174 nmol/l	alle Fälle negativ	alle Fälle negativ	keine außer 2 Fällen
<b>CT/MG+</b>	7 Fälle 37 - 63 Jahre	3 Fälle 48 - 64 Jahre	II, III, IVa	6 - >20 nmol/l	7 positive Fälle 2 Fälle s <sup>+</sup>	7 positive Fälle 2 Fälle s <sup>+</sup>	keine außer 1 Fall
<b>MXT/MG+</b>	3 Fälle 33 - 75 Jahre	1 Fall 42 Jahre	I, II	5 - >20 nmol/l	alle Fälle negativ	alle Fälle negativ	keine
<b>CT/MG-</b>	3 Fälle 61 - 84 Jahre		III, IVa	<0,5 nmol/l	2 Fälle negativ 1 Fall s <sup>+</sup>	2 Fälle negativ 1 Fall s <sup>+</sup>	keine
<b>MXT/MG-</b>	2 Fälle 37 - 62 Jahre	3 Fälle 56 - 64 Jahre	I, II, III	<0,5 nmol/l	alle Fälle negativ	alle Fälle negativ	keine

AChR: Azetylcholinrezeptor; CT: kortikales Thymom; MG: Myasthenia gravis; MXT: gemischtes Thymom; s<sup>+</sup>: positive Färbung einzelner Zellen; TFH: Thymitis;

**Tabelle 11: Klinische Daten der Thymom- und Thymitispatienten, deren intratumoröse bzw. periphere T-Zellen für Proliferationsassays eingesetzt wurden (siehe Abb. 14 und Abb. 15: T-Zell-Proliferationstests mit den Fragmenten NF-M-A/C und Fragmenten des  $\delta$ AChR)**

**Thymitis/MG+ (n=21)**

<b>Fallnummer</b>	<b>Geschlecht/Alter</b>	<b>Immunsuppressive Therapie</b>
4777/98	F/25	keine
H4051/98	F/27	keine
H1693/98	M/21	keine
11457/98	M/15	keine
9500/99	F/29	keine
5402/98	M/28	keine
H6637/98	M/25	keine
H6718/98	F/25	keine
H7131/98	F/30	keine
29803/98	F/13	keine
16725/99	F/20	keine
24091/99	F/10	nicht bekannt
H6795/98	F/28	nicht bekannt
H2481/98	F/38	nicht bekannt
H787/99	F/38	keine
H876/00	F/18	keine
2172/00	F/23	nicht bekannt
3873/00	F/30	nicht bekannt
H1262/00	F/26	Steroide
16856/00	F/29	keine
H1350/98	F/42	keine

Fortsetzung Tabelle 11:

**Thymom/MG+ (n=21)**

<b>Fall- Nummer</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Masaoka</b>	<b>Geschlecht/ Alter</b>	<b>Immunsuppressive Therapie</b>
H4143/98	<b>CT/MG+</b>	II	M/58	keine
H5735/98		Iva	F/55	Steroide
H8214/97		II	F/68	keine
503/98		II	F/53	keine
H353/98		II	M/75	keine
H1508/98		n.a.	M/38	keine
2577/95		III	M/48	keine
10749/96		II	F/37	keine
10083/96		II	F/56	keine
4858/95		II	M/64	keine
H457/98		II	F/61	keine
13575/99		II	F/39	keine
15286/99		II	F/38	keine
21994/99		II	M/65	keine
780/00		II	F/58	nicht bekannt
15173/94		IVa	M/58	keine
20223/00		II	F/20	nicht bekannt
24864/94	<b>MXT/MG+</b>	II	F/75	keine
28759/99		I	F/66	nicht bekannt
H1263/00		I	M/50	keine

Fortsetzung Tabelle 11:

**Thymom/MG- (n=10)**

<b>Fall- Nummer</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Masaoka</b>	<b>Geschlecht/ Alter</b>	<b>Immunsuppressive Therapie</b>
5186/98	<b>CT/MG-</b>	III	F/69	nicht bekannt
H188/98		II	F/53	keine
6320/99		IVb	M/67	nicht bekannt
12348/99		III	M/54	nicht bekannt
16857/00		II	M/51	nicht bekannt
3437/98	<b>MXT/MG-</b>	II	M/64	keine
17821/94		II	F/37	keine
1495/00		n.a.	F/53	keine
7913/00		n.a.	F/63	keine
H1052/00		II	F/72	keine

**Tabelle 12: Patientendaten des mit semiquantitativer PCR untersuchten Gewebematerials (Laminin-Rezeptor, gene 6-16, siehe Abb. 18)**

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Patient</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Geschlecht/ Alter</b>
1	14161/92	Normalthymus	Thymus	M/20
2	H6637/98	Thymitis/MG+	Thymus	M/25
3	H4051/98	Thymitis/MG+	Thymus	F/27
4	6331/97	WDTC/MG+	Restthymus	F/47
5	10749/96	CT/MG+	Restthymus	F/37
6	6331/97	WDTC/MG+	Thymom	F/47
7	10749/96	CT/MG+	Thymom	F/37
8	H353/98	CT/MG+	Thymom	M/75
9	H4143/98	CT/MG+	Thymom	M/58
10	4858/95	CT/MG+	Thymom	M/64

**Tabelle 13: Patientendaten des mit semiquantitativer PCR untersuchten Gewebematerials (siehe Abb. 19a, Abb. 25a)**

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Patient</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Geschlecht/ Alter</b>
<b>1</b>	14161/92	Normalthymus	Thymus	M/20
<b>2</b>	H6637/98	Thymitis/MG+	Thymus	M/25
<b>3</b>	10083/96	CT/MG+	Thymom	F/56
<b>4</b>	H6694/98	CT/MG+	Thymom	M/57
<b>5</b>	H1508/98	CT/MG+	Thymom	M/38
<b>6</b>	13575/99	CT/MG+	Thymom	F/39
<b>7</b>	H3983/99	CT/MG+	Thymom	F/70
<b>8</b>	6331/97	WD/MG+	Thymom	F/47
<b>9</b>	20286/94	CT/MG+	Thymom	M/33
<b>10</b>	24864/94	MXT/MG+	Thymom	F/75
<b>11</b>	23382/96	MXT/MG+	Thymom	F/62
<b>12</b>	11358/90	MXT/MG+	Thymom	M/70
<b>13</b>	H5018/99	CT/MG-	Thymom	M/67
<b>14</b>	5186/98	CT/MG-	Thymom	F/69
<b>15</b>	3437/98	MXT/MG-	Thymom	M/64
<b>16</b>	15091/95	MXT/MG-	Thymom	M/41
<b>17</b>	17821/94	MXT/MG-	Thymom	F/37
<b>18</b>	12211/95	MXT/MG-	Thymom	F/62
<b>19</b>	5633/98	MXT/MG-	Thymom	M/36

**Tabelle 14: Patientendaten des mit semiquantitativer PCR untersuchten Gewebematerials (siehe Abb. 19b, Abb. 25b)**

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Patient</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Geschlecht/ Alter</b>
<b>21</b>		Tonsille	Lymphozyten	F/16
<b>22</b>	14161/92	Normal-Thymus	Thymus	M/20
<b>23</b>	H6637/98	TFH/MG+	Thymus	M/25
<b>24</b>	2773/97	TFH/MG+	Thymus	F/20
<b>25</b>	H4051/98	TFH/MG+	Thymus	F/27
<b>26</b>	12730/00	T-LBL	LK	M/32
<b>27</b>	78241/97	T-LBL	LK	M/19
<b>28</b>	197151/99	T-LBL	LK	M/73
<b>29</b>	19788/96	T-LBL	Med	M/34
<b>30</b>	28279/98	MED/MG+	Thymom	M/74
<b>31</b>	15076/99	MED/MG-	Thymom	F/77
<b>32</b>	1006/95	MED/MG-	Thymom	F/73
<b>33</b>	788/99	MED/MG-	Thymom	M/65
<b>34</b>	10083/96	CT/MG+	Thymom	F/56
<b>35</b>	H3983/99	CT/MG+	Thymom	F/70
<b>36</b>	6331/97	WDTC/MG+	Thymom	F/47
<b>37</b>	5186/98	CT/MG-	Thymom	F/69

**Tabelle 15: Patientendaten für die FACS-Analysen.**

Abb. Nr.	Diag.	n	F/M	Alter [years] Mittelwert (Bereich)	Tumorstadium nach Masaoka <i>et al.</i> (Anzahl der Fälle)	anti-AChR Anti- körper­titer [nmol/l] Mittelwert (Bereich)	Behand- lung(Anzahl der Fälle)	Histologische Thymomtypen			
								CT MG+	MXT MG+	CT MG-	MXT MG-
Abb. 20	Tm	15	9/6	55.1 (33-75)	II (12); III (1); IVa (2)	60.2 (3-342)	keine	8	1	4	2
	TFH	11	10/1	25.9 (13-36)	-----	24.7 (0.5-87)	keine	-----	-----	-----	-----
Abb. 21	Tm	15	9/6	55.1 (33-75)	II (12); III (1); IVa (2)	60.2 (3-342)	keine	8	1	4	2
	TFH	7	7/0	27.2 (13-36)	-----	33.0 (1-87)	keine	-----	-----	-----	-----
Abb. 22a	ResT	9	7/2	52.4 (33-79)	I (2); II (6); IVa (1)	25.7 (10-70)	Steroide (2)	8	1	-	-
	Tm	19	14/5	54.1 (33-79)	I (2); II (13); III(2); IVa (2)	30.6 (3-71)	Steroide (1)	10	3	3	3
	TFH	11	10/1	25.9 (13-36)	-----	24.7 (0.5-87)	keine	-----	-----	-----	-----
Abb. 22b	Tm	9	6/3	57.8 (36-79)	II (7); III(1); IVa (1)	34.3 (17-67)	Steroide (1)	2	1	3	3
	TFH	7	7/0	27.2 (13-36)	-----	33.0 (1-87)	keine	-----	-----	-----	-----
Abb. 23a	Tm	12	7/5	54.2 (33-75)	II (10); IVa (2)	64.6 (2-342)	keine	7	1	1	3
	TFH	3	3/0	21.7 (13-32)	-----	26.0 (12-44)	keine	-----	-----	-----	-----

Fortsetzung Tabelle 15:

Abb. Nr.	Diag.	n	F/M	Alter [years] Mittelwert (Bereich)	Tumorstadium nach Masaoka <i>et al.</i> (Anzahl der Fälle)	anti-AChR Anti- körper­titer [nmol/l] Mittelwert (Bereich)	Behand- lung(Anzahl der Fälle)	Histologischer Thymomtyp			
								CT MG+	MXT MG+	CT MG-	MXT MG-
Abb. 23b	Tm	10	6/4	53.2 (33-75)	II (9); IVa (1)	72.2 (3-342)	keine	5	1	1	3
Abb. 24	AChR	20	13/7	53.6 (29-75)	I (2); II (15); III (2); IVa(1)	20.8 (3-70)	Steroide (2)	16	4	-	-
	NF-M	16	12/4	52.3 (29-68)	I (1); II (12); III (2); IVa(1)	19.0 (3-65)	Steroide (2)	14	2	-	-
	TT	14	10/4	57.6 (33-75)	I (2); II (9); III (3)	18.2 (3 – 62)	Steroide (2)	10	4	-	-
	Med	6	3/3	67.8 (60-74)	I (2); II (4)	n.b.; MG+ (3 Fälle)	Steroide (3)	-----	-----	-----	-----

Die Antikörpertiter beziehen sich auf myasthene Patienten. (Alle nicht-myasthenen Patienten hatten Titer < 0.5 nmol/l).

AChR: Azetylcholinrezeptor; CT: kortikale Thymome; Med: medulläre Thymome; MG: Myasthenia gravis; MXT: gemischte Thymome;

n: Anzahl der Fälle; n.b.: nicht bestimmt; NF-M: Neurofilament mittleren Molekulargewichts; Tm: Thymom; TT: Tetanus Toxoid;

Überschneidungen zwischen Patienten, für deren Zellen FACS-Analysen bzw. Proliferationstests durchgeführt wurden: PBL von 4 von 9 und Thymozyten

von 10 von 13 myasthenen Thymompatienten sowie PBL von 6 gesunden Kontrollpersonen wurden in FACS-Analysen und Standard-T-Zell-

Proliferationstests eingesetzt..

## 6.4 Übersicht über Struktur und Funktion der Genprodukte der mittels Expressionsarray ermittelten Gene

### Caspase 10

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die im Rahmen der Apoptose aktiviert werden (Cohen, 1997). Der Caspase 10 wird eine Rolle beim CD95- bzw. TNF-vermittelten Apoptoseweg zugeschrieben (Cohen, 1997). Das 55 kd Enzym wurde aus Jurkat-T-Zellen kloniert (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996). Die Caspase 10 wird in den meisten Geweben exprimiert (Cohen, 1997). Caspasen sind auch bei der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Apoptose im Thymus beteiligt, mit deren Hilfe bei der negativen Selektion inadäquate bzw. autoreaktive Thymozyten eliminiert werden (Jiang *et al.*, 1999). Der Caspase 10 wird eine Rolle als Effektor-caspase am Ende der Stress-vermittelten Apoptosekaskade zugesprochen; die Caspase kann jedoch auch bei anderen Rezeptorvermittelten Apoptosewegen als apikale Caspase auftreten (Bratton *et al.*, 2000).

Ein Zusammenhang zwischen der Caspase 10-Aktivität und Autoimmunität besteht insofern, als eine „missense“ Mutation im Caspase 10-Gen für die Entstehung des autoimmunen lymphoproliferativen Syndroms Typ II verantwortlich gemacht wird, bei dem verschiedenste Autoimmunphänomene auftreten. Die Caspase 10-Mutanten zeigten eine stark herabgesetzte Caspaseaktivität, was zu einer Störung der Apoptose führte (Wang *et al.*, 1999).

Über einen Zusammenhang zwischen Veränderungen in der Caspase 10-Expression und der Entwicklung von Thymomen bzw. der MG ist bisher nicht berichtet worden.

### Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNF-R2)

TNF-alpha bzw. TNF-beta gelten als Mediatoren für sehr unterschiedliche Funktionen, darunter immunologische und entzündliche Reaktionen bzw. Anti-Tumor-Effekte (Tracey and Cerami, 1993). Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Organogenese lymphoider Organe (Pasparakis *et al.*, 1996; Pasparakis *et al.*, 1997) und der Apoptose (Speiser *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1995). Es wurden zwei homologe Membran-Rezeptoren für TNF gefunden, TNF-R1 bzw. TNF-R2 (Brockhaus *et al.*, 1990). Die TNF-Bindung an den Rezeptor 1 ist notwendig und ausreichend für die meisten bekannten zellulären Funktionen von TNF (Thoma *et al.*, 1990). Hinsichtlich der TNF-Wirkung auf Thymozyten wird jedoch dem TNF-R2 eine entscheidende Funktion zugesprochen (Grell *et al.*, 1998).

In Bezug auf die MG wird ein Zusammenhang zwischen der TNF-Wirkung und Auslösung der Autoimmunerkrankung diskutiert. Es konnte in TNF-R1 „knock out“-Mäusen gezeigt werden, daß der Rezeptor für die Auslösung der EAMG notwendig ist (Wang *et al.*, 2000a).

Außerdem wurden auf PBL von MG Patienten signifikant mehr TNF-R1-Moleküle gefunden als auf Zellen von Kontrollpersonen. Dieser Befund dürfte jedoch eher Folge als Ursache des höheren Aktivierungszustandes der Effektor-T-Zellen im Blut von MG Patienten sein (Bongioanni *et al.*, 1999). Schließlich gibt es Hinweise auf eine Assoziation zwischen bestimmten TNF-Allelen und dem MG-Risiko bei solchen MG-Patienten, deren Erkrankung vor dem 40sten Lebensjahr eingesetzt hat (Huang *et al.*, 1999). Ein Zusammenhang zwischen TNF-Wirkung und Thymom-assoziiierter MG wurde dagegen bisher nicht beschrieben.

### **Cytokeratin 13**

Das humane Cytokeratin 13 ist eines der am häufigsten vorkommenden Intermediärfilamente in verschiedenen Epithelien (Kuruc *et al.*, 1989). In Mäusen wurde Cytokeratin 13 eine Rolle bei der epidermale Carzinogenese zugesprochen, welche jedoch für den Menschen nicht bestätigt werden konnte (Kuruc *et al.*, 1989).

Mittels einer Studie, bei der das Cytokeratinprofil im normalen Thymusgewebe und in verschiedenen Thymomen vergleichend untersucht wurde, konnte gezeigt werden, daß im nicht-neoplastischen Thymusgewebe alle untersuchten Cytokeratine zu finden waren. Im Gegensatz dazu wurde in den 3 untersuchten Fällen mit WDTC, der Thymomgruppe zu der auch das für den Array eingesetzte Gewebe gehört, vor allem die Cytokeratine 8, 18 und 19 exprimiert. Das Cytokeratin 13 ließ sich in einem Fall gar nicht und in den anderen beiden Fällen bei 1-20% der Epithelzellen detektieren (Grommisch *et al.*, 1997). Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte diese Ergebnisse weitestgehend bestätigen. Im nicht-neoplastischen Thymus wurde das Cytokeratin 13 vor allem innerhalb der Hassall'schen Körperchen gefunden. Es wurden 9 WDTC-Fälle untersucht, von denen ebenfalls der Großteil für Cytokeratin 13 negativ war bzw. nur eine leichte Expression zeigte (Kuo, 2000).

### **Laminin-Rezeptor 37 kd (LamR)**

Die Laminine sind ein Hauptbestandteil von Basalmembranen (Castronovo, 1993). Die Laminine werden an der Zelloberfläche von Laminin-Rezeptoren gebunden. Bei der Tumordinvasion spielen Interaktionen zwischen den Tumorzellen und den Lamininen eine große Rolle. Diese Interaktionen werden durch Laminin-Rezeptoren vermittelt (Castronovo, 1993; Menard *et al.*, 1997). Dementsprechend ist eine Überexpression des Rezeptors in Tumorzellen beobachtet worden (Clausse *et al.*, 1996; Jackers *et al.*, 1996). Über eine spezielle Rolle von LamR in thymischen Gewebe oder ein Zusammenhang mit Autoimmunität ist nichts bekannt.

**Human interferon-inducible peptide (6-16) gene (gene 6-16)**

Gene 6-16 codiert für eine mRNA von ca. 1 kb. Die transkriptionelle Expression von gene 6-16 wird durch die Stimulation humaner Zellen mit alpha- und beta-Interferonen induziert, nicht jedoch durch die Stimulation mit gamma-Interferon (Ackrill *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1986). Das Genprodukt von gene 6-16 bzw. seine Funktion sind nach wie vor unbekannt (Gjermandsen *et al.*, 2000). Die Expression des Gens ist im Zusammenhang mit der Wachstumsinhibition z. B. in alternden Fibroblasten bzw. Brustkrebszellen erhöht (Tahara *et al.*, 1995; Tiwari *et al.*, 1991). Das Gen wird außerdem nach IFN- $\alpha$ -Stimulation in verschiedenen humanen Zell-Linien vermehrt exprimiert, insbesondere in B-lymphoiden Zell-Linien (Daudi, Nalm-6) und einer epithelialen Zell-Linie (HeLa) (Gjermandsen *et al.*, 2000).

Ein Zusammenhang zwischen der Expression von IFN- $\alpha$  und Myasthenia gravis besteht insofern, daß INF- $\alpha$  im Rahmen der MG immunsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben werden. Das Zytokin reguliert die Expression von TH1 bzw. TH2 Zytokinen herunter, welche für das Fortschreiten der Erkrankung mitverantwortlich gemacht werden (Zhang *et al.*, 1997). Über eine spezielle Rolle des Gens in thymischem Gewebe wurde bisher nicht berichtet.

**B-cell growth factor 1 (BCGF 1)**

Der 12 kd große Wachstumsfaktor wurde erstmalig von Sharma *et al.* 1987 kloniert und charakterisiert. Laut dieser Arbeit wird BCGF 1 von Mitogen-aktivierten peripheren T-Zellen produziert und unterstützt die klonale Proliferation von B-Zellen (Sharma *et al.*, 1987). Rekombinantes GST-BCGF 1 stimuliert die Proliferation aktivierter humaner B-Zellen in konzentrationsabhängiger Weise (Kovanen *et al.*, 1995). Der Genlocus konnte auf dem Chromosom 16 q kartiert werden (Kovanen *et al.*, 1995).

Ein Zusammenhang zur Autoimmunität wurde für das Sjögren-Syndrom, einer systemischen Autoimmunerkrankung, beschrieben. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen wird innerhalb peripherer T-Zellen dieser Patienten mehr BCGF 1 produziert. Dies wird als Ursache für die abnorme B-Zell-Aktivierung, welche für die Erkrankung charakteristisch ist, diskutiert. (Goto *et al.*, 1996).

1996 wurde ebenfalls von Kovanen *et al.* gezeigt, daß sich mittels Northern Blot bzw. RNA Protection Assay keine BCGF 1 mRNA in Mitogen-stimulierten PBL nachweisen ließ. Die unterschiedlichen Befunde wurden auf die verschiedenen Sequenzen der Oligos zurückgeführt, welche für die Hybridisierungen von dieser Arbeitsgruppe bzw. Sharma *et al.* benutzt wurden (Kovanen *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1987). Kovanen *et al.* führten ihre Versuche mit einem Oligo des BCGF 1 Gens durch, welches keine Alu-Sequenzen enthielt (Aminosäuren

189-317). Aufgrund dieser Befunde wurde angezweifelt, daß stimulierte T-Zellen wirklich eine Quelle für BCGF 1 darstellen (Kovanen *et al.*, 1996).

Nach diesen Veröffentlichungen ist nach wie vor unklar, ob es sich bei der BCGF 1-Sequenz tatsächlich um einen B-Zell-Wachstumsfaktor handelt bzw. von welchen Zellen er hergestellt wird. Andererseits wurde im Rahmen des humanen Genprojektes (veröffentlicht in der Datenbank des NIH [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) BCGF 1 auf dem Chromosom 16 inklusive einer Proteinsequenz angegeben; ein Beleg dafür, daß dieses Gen als ein funktionelles angesehen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb davon ausgegangen, daß es sich bei BCGF 1 um ein funktionelles Gen handelt. Das PCR-Produkt codierte für die Aminosäuren 77-324, enthielt also im Anfangsbereich einen geringen Teil einer Alu-Sequenz. Um PCR-Artefakte auszuschließen, wurden deshalb alle RNA-Proben vor der cDNA-Synthese mit DNase behandelt. Eine Kontamination der Proben durch genomische DNA konnte dadurch ausgeschlossen werden (Abb. 17). Über eine spezielle Rolle des Gens in thymischem Gewebe bzw. über eine Expression in Thymomen wurde bisher nicht berichtet. Ebenso ist über einen Zusammenhang mit MG nichts bekannt.

### **Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )**

TGF $\beta$  wird zu den TH3 Zytokinen gezählt. Es wird in einer latenten, biologisch inaktiven Form sekretiert. Die Aktivierung erfolgt vermutlich durch eine säure- oder enzymatisch-vermittelte (Plasmin, Calpain) Abspaltung eines N-terminalen Peptids (Abe *et al.*, 1998).

Sowohl bei der MG als auch bei der EAMG (experimentelle autoimmune myasthenia gravis) konnten für TGF $\beta$ , ähnlich wie für Interferon- $\alpha$ , immunsuppressive Effekte nachgewiesen werden, da durch dieses Zytokin TH1 bzw. TH2 Zytokine herunterreguliert wurden (Zhang *et al.*, 1997). Eine Verstärkung der Expression von TGF $\beta$  wurde deshalb zur Verbesserung des klinischen Ausgangs dieser Autoimmunerkrankung diskutiert (Zhang *et al.*, 1997).

TGF $\beta$  ist bei verschiedenen experimentellen Autoimmunerkrankungen ein wichtiger Vermittler von oraler Toleranz, bei der durch die orale Gabe eines Autoantigens eine periphere Toleranz reifer Lymphozyten induziert wird (Krause *et al.*, 2000).

Außerdem konnte für unreife Thymozyten der Maus gezeigt werden, daß TGF $\beta$  speziell auf die Zellteilung unreifer CD4-CD8+CD3+ T-Zellen wirkt und damit deren Zahl und die Anzahl des nachfolgenden Reifungsstadiums, der CD4+CD8+CD3- T-Zellen, vermindern kann. TGF $\beta$  wird dabei von kortikalen thymischen Epithelzellen produziert (Takahama *et al.*, 1994a). Da in humanen Thymomen die Anzahl der Thymozyten des mit der Maus vergleichbaren Stadiums (CD4+CD8-CD3-) gegenüber nicht-neoplastischen Thymi erhöht ist, ist eine Bedeutung von TGF $\beta$  für die frühe Reifungsstörung der intratumorösen Thymopoese disku-

tiert worden (Helmreich, 1999; Nenninger *et al.*, 1998). Nach dieser Hypothese sollte in Thymomen die Expression des proliferationsinhibierenden TGF $\beta$  vermindert sein und zu einer größeren Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> T-Zellen führen (Nenninger *et al.*, 1998). Die Befunde der vorliegenden Arbeit stützen diese Hypothese nicht.

### **Teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1, Cripto-1 protein (CR-1))**

Das aus 188 Aminosäuren bestehende Protein TDGF1 wurde aus einer humaner Teratocarcinoma-Zelllinie kloniert (Ciccodicola *et al.*, 1989). Es weist Sequenzhomologien zu EGF (epidermal growth factor) und TGF $\alpha$  auf, und gehört deshalb zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (Ciccodicola *et al.*, 1989). Die Weiterleitung des TDGF 1-Signales erfolgt unabhängig vom EGF-Rezeptor-Pathway (Brandt *et al.*, 1994). Welcher Rezeptor für die Weiterleitung verantwortlich ist, ist jedoch bisher unbekannt. Dem Wachstumsfaktor TDGF1 wird eine Rolle im neoplastischen Prozeß z.B. beim Bauchspeicheldrüsenkrebs zugesprochen. In diesen Tumorzellen wurden im Vergleich zu normalen Kontrollen eine erhöhte mRNA-Expression von TDGF 1 detektiert (Friess *et al.*, 1994). Außerdem wurde auch eine Beteiligung bei humanem Brustkrebs (Brandt *et al.*, 1994; Niemeyer *et al.*, 1998) und Zervixkarzinomen (Ertoy *et al.*, 2000) festgestellt. In epithelialen Zellen des Zervixkarzinoms führte TDGF 1 zu einer erhöhten Expression des Intermediärfilamentes Vimentin und beeinflusste außerdem die Migration dieser Zellen (Ebert *et al.*, 2000). TDGF 1 wirkt vermutlich als autokriner Wachstumsfaktor, wird also von den entsprechenden epithelialen Zellen selbst gebildet (Niemeyer *et al.*, 1998).

Außer bei der Karzinogenese wird TDGF 1 in der Embryonalentwicklung exprimiert und hat dabei einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung des Herzens. „Knock out“ Mäuse für dieses Gen werden dementsprechend tot geboren (Xu *et al.*, 1999).

Über eine Expression im Thymus oder Thymom bzw. ein Zusammenhang mit Autoimmunität wurde bisher nicht berichtet.

### **Heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)**

Bei HB-GAM handelt es sich um ein Heparin-bindendes Molekül von 18 kd, welches eine Rolle beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung spielt. Es gehört zur Familie der Heparin-bindenden Wachstums-Faktoren (Laaroubi *et al.*, 1995). Der Faktor wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen entdeckt und besitzt verschiedene Bezeichnungen: pleiotrophin (PTN) (Garver *et al.*, 1994), heparin affin regulatory peptide (HARP) (Courty *et al.*, 1991), heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) (Hampton *et al.*, 1992) oder heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) (Kovesdi *et al.*, 1990). Ursprünglich aus neonatalem

Rattenhirn isoliert, wurde dem Molekül zunächst eine Funktion bei der neuronalen Entwicklung zugeschrieben (Rauvala, 1989). Später wurde der Faktor auch in anderen Geweben entdeckt und es wurde gezeigt, daß er die Proliferation von Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen induzieren konnte (Courty *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1990). Außerdem wurde HB-GAM als angiogener Wachstumsfaktor beschrieben (Laaroubi *et al.*, 1994). Geringe Expression des Faktors wurde durch RT-PCR auch im Thymusgewebe der Maus nachgewiesen (Sato *et al.*, 1997).

Der Faktor scheint eine weitere Funktion im Rahmen des Clustering des AChRs an der neuromuskulären Endplatte zu spielen. Dabei interagiert er mit dem Heparan-Sulfat Proteoglykan Agrin, welches das Clustering vermittelt (Daggett *et al.*, 1996).

## 6.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	<u>Viola</u> Josefa Maria Hoffacker
Geburtsdatum	12. Februar 1967
Geburtsort	Langenfeld/Rhld.

### Schulbildung

1973 – 1977	Don Bosco Grundschule, Langenfeld
1977 – 1986	Marienschule (Gymnasium), Leverkusen
1986	Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung

1986 – 1989	zur Mathematisch-Technischen Assistentin Bayer AG, Leverkusen
-------------	--

### Studium

Oktober 1989	Beginn des Studiums der Biologie (Universität Düsseldorf)
Oktober 1991	Diplomvorprüfung (Universität Düsseldorf)
Oktober 1991	Fortsetzung des Biologiestudiums (Universität Bonn)
Dezember 1993	Diplomhauptprüfung (Universität Bonn)
Januar –Dezember 1994	Diplomarbeit am Institut für physiologische Chemie der Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. H. Egge. Thema: „Anreicherung und Charakterisierung einer GPI-spezifischen Phospholipase C und Phospholipase A aus <i>Trypanosoma brucei brucei</i> “
Februar 1997 – Februar 2001	Dissertation am Institut für Pathologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink und PD Dr. G. Pflugfelder. Thema: “Abnormes Mikromilieu und gestörte Thymopoese in Thymomen als Grundlage der Autoimmunisierung im peripheren Immunsystem“

Würzburg, im März 2001

## 6.6 Publikationen

**Hoffacker V.**, Schultz A., Tiesinga J.J., Gold R., Schalke B., Nix W., Kiefer R., Müller-Hermelink H.K., Marx A. (2000). Thymomas alter the T-cell subset composition in the blood: a potential mechanism for thymoma-associated autoimmune disease. *Blood*. Dec 1; 96(12):3872-3879.

**Hoffacker V.**, Schultz A., Nenninger R., Tzartos S., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (2000). Abnormal Thymocyte Development and Neurofilament-Reactive Thymocytes in Thymoma. In Christadoss P. (Ed): Myasthenia Gravis: Disease mechanisms and immunointervention. New Delhi (India): New Publishing House:51-57.

Gutsche S., Wilisch A., **Hoffacker V.**, Schultz A., Tzartos S., Nix W., Schalke B., Schneider C., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (2000). Expression of the Acetylcholine Receptor  $\alpha$ -Subunit Gene is Associated with paraneoplastic Myasthenia Gravis in Mixed Thymoma. In Christadoss P. (Ed): Myasthenia Gravis: Disease mechanisms and immunointervention. New Delhi (India): New Publishing House:42-50.

Marx A., Wilisch A., Gutsche S., **Hoffacker V.**, Schultz A., Tzartos S., Nix W., Schalke B., Schneider C., Müller-Hermelink H. K. (2000). Low Levels of Acetylcholine Receptor Delta-Subunit Message and Protein in Human Thymus suggests the Occurrence of 'Triplet Receptors' in Thymic Myoid Cells. In Christadoss P. (Ed): Myasthenia Gravis: Disease mechanisms and immunointervention. New Delhi (India): New Publishing House:28-34.

Schultz A., **Hoffacker V.**, Wilisch A., Nix W., Gold R., Schalke B., Tzartos S., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (1999). Neurofilament is an autoantigenic determinant in myasthenia gravis. *Ann. Neurol.* Aug, 46(2):167-175.

Wilisch A., Gutsche S., **Hoffacker V.**, Schultz A., Tzartos S., Nix W., Schlake B., Schneider C., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (1999). Association of acetylcholine receptor alpha-subunit gene expression in mixed thymoma with myasthenia gravis. *Neurology*. Apr 22;52(7):1460-1466.

Nenninger R., Schultz A., **Hoffacker V.**, Helmreich M., Wilisch A., Vandekerckhove B., Hünig T., Schalke B., Schneider C., Tzartos S., Kalbacher H., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (1998). Abnormal thymocyte development and generation of autoreactive T cells in mixed and cortical thymomas. *Lab. Invest.* 78(6):743-753.

### **Posterveröffentlichungen und Vorträge**

**Hoffacker V.**, Schultz A., Tiesinga J. J., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (2000). Thymome verändern die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen im Blut. *Der Pathologe*. (In press)

**Hoffacker V.**, Schultz A., Schneider C., Nix W., Schalke B., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (1999). Thymomas skew the peripheral T cell repertoire composition in paraneoplastic myasthenia gravis. *Immunobiology*. 200, No.3-5.

**Hoffacker V.**, Schultz A., Nenninger R., Tzartos S., Müller-Hermelink H. K., Marx A. (1999). T-cell Maturation and autoreactive Thymocytes in paraneoplastic myasthenia gravis. *Pathol. Res. Pract.* 195(5):306.

Schultz A., Wilisch A., **Hoffacker V.**, Müller-Hermelink H. K., Marx A. (1997). Neurofilament reactive T cells are characteristic for patients with paraneoplastic myasthenia gravis. *Immunobiology*. 197, No.2-4.

## **Erklärungen**

(gem. § 4, Abs. 3, S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung)

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß

1. die vorliegende Dissertation von mir selbständig angefertigt wurde und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.
2. diese Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. ich bisher den akademischen Grad „Diplom-Biologin“ (Universität Bonn) besitze, ansonsten aber keinen weiteren akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 7. März 2001

.....

Viola Hoffacker