

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. A. Rosenwald

**Morphologische Studie zur  
altersabhängigen Expression von  
Autoimmunregulator AIRE im gesunden  
und entzündlich veränderten Thymus**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von

Johanna Friederike Strack  
aus Memmingen

Würzburg, Dezember 2009

Referent: Prof. Dr. med. Philipp Ströbel

Koreferent: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2010

Die Promovendin ist Ärztin

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Funktion des Thymus</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Thymusinvolution und Immunseneszenz</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 APECED</b> .....	<b>2</b>
<b>1.4 AIRE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5 AIRE-Expression in der Nachbarschaft von Hassall-Körperchen</b> .....	<b>5</b>
<b>1.6 Morphologische Veränderungen des entzündeten Thymus</b> .....	<b>6</b>
<b>1.7 AIRE- Expression bei B1-Thymomen</b> .....	<b>7</b>
<b>1.8 Einfluß von AIRE auf die Bildung regulatorischer T-Zellen</b> .....	<b>9</b>
<b>1.9 Myoidzellen im Alter</b> .....	<b>10</b>
<b>1.10 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation</b> .....	<b>12</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Patientendaten</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Immunhistochemische Färbung</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Immunfluoreszenz-Färbung</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4 Mikroskopische Auswertung</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5 Morphometrische Auswertung</b> .....	<b>17</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Altersabhängige Abnahme der Anzahl der AIRE+ Zellen bezogen auf die Thymusfläche</b> .....	<b>18</b>
3.1.1 Normalthymi.....	18
3.1.2 Thymitis.....	20
<b>3.2 Altersabhängige Abnahme der Hassall-Körperchen</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Normalthymi.....	22

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2 Thymitis.....	23
<b>3.3 Anordnung von AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen und Keimzentren.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von 3.1. bis 3.3.....</b>	<b>26</b>
3.4.1 Normalthymi.....	26
3.4.2 Thymitis.....	28
3.4.3 Vergleich zwischen Thymitis-Präparaten mit Normalthymus-Präparaten.....	29
<b>3.5 AIRE-Hassall-Korrelation am Beispiel von B1-Thymomen .....</b>	<b>30</b>
<b>3.6 Überprüfung des örtlichen Zusammenhangs zwischen der Expression von Foxp3+ und AIRE.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7 Altersabhängige Abnahme der Anzahl der Myoidzellen.....</b>	<b>34</b>
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>36</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>42</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>43</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>47</b>
<b>8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>48</b>
<b>9 ANHANG.....</b>	<b>51</b>
<b>9.1 Statistische Berechnungen.....</b>	<b>51</b>
9.1.1 Test auf Normalverteilungen.....	51
9.1.2 Verteilungsdiagramme.....	52
9.1.3 Nichtparametrische Korrelationen.....	54
9.1.4 Parametrische Korrelationen.....	55
9.1.5 Partielle Korrelationen.....	55
9.1.6 Mann/ Whitney U Tests.....	56
9.1.7 T-Test.....	57
9.1.8 A * H Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test.....	58
<b>9.2 Rohdaten.....</b>	<b>59</b>
9.2.1 Rohdaten der Normalthymus-Patienten.....	59
9.2.2 Rohdaten der Thymitis-Patienten.....	62

## Inhaltsverzeichnis

---

<u>9.2.3 Rohdaten der Myoidzellen.....</u>	<u>65</u>
<u>9.2.4 B1-Thymome.....</u>	<u>66</u>
<u>9.2.5 FOXP3 Zellen in der Nähe zu AIRE+ - Zellen.....</u>	<u>67</u>

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

## **1 Einleitung**

### **1.1 Funktion des Thymus**

Die Schlüsselfunktion des Thymus besteht darin sicherzustellen, dass reife T-Zellen ausschließlich über Antigenpräsentation aktiviert werden können. Bei den hiermit verbundenen Reifungsprozessen interagieren die unreifen T-Zellen über diverse Adhäsionsmoleküle mit Antigen-präsentierenden Zellen, im Wesentlichen den Epithelzellen des Thymus sowie dendritischen Zellen. Bei Bindung eines antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors an eine Antigen-präsentierende Zelle sollten Signale empfangen werden können, die zur kontrollierten T-Zell-Aktivierung und Proliferation führen. Eine weitere wichtige Eigenschaft, die im Thymus erlernt wird, ist die Selbsttoleranz. Um einen Angriff auf körpereigene Strukturen zu verhindern, werden vor allem T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptoren eine sehr schwache Affinität zu präsentierten körpereigenen Antigenen aufweisen, nach dem Durchlaufen der Reifung im Thymus ins Blut entlassen (positive Selektion). Dagegen werden bei T-Zellen mit starker Affinität zu körpereigenen Antigenen Signalwege eingeschlagen, die zu programmiertem Zelltod führen (negative Selektion) (Ohashi, 2003). Eine Differenzierung hoch affiner T-Zellen in regulatorische T-Zellen ist möglich (Aschenbrenner, et al., 2007).

### **1.2 Thymusinvolution und Immunseneszenz**

Mit zunehmendem Lebensalter ist eine altersabhängige Involution des Thymus zu beobachten. Dabei verringert sich Thymusepithelgewebe kontinuierlich mit zunehmendem Lebensalter und wird durch Fettgewebe ersetzt (Steinmann, Klaus, & Muller-Hermelink, 1985). Bei abnehmendem Thymusgewebe sinkt die Zahl der exportierten naiven T-Zellen (Douek, et al., 1998). Dies kann zu Schwächen im Abwehrsystem führen. Die vermehrte Anfälligkeit gegenüber lebensbedrohlichen Infektionen im Alter aufgrund lebenslanger Veränderungen des Immunsystems wird allgemein als Immunseneszenz bezeichnet. Auf die Frage hin, welche Untereinheit der im Thymus produzierten T-Zellen zur Immunseneszenz beitrage, führten Luciani und Turchetti die Infektanfälligkeit im

Alter auf eine nach einem stochastischem Modell berechnete Abnahme naiver CD8+ Zellen zurück, die in ihrer Funktion als natürliche Killerzellen den Körper nicht mehr adäquat gegenüber neuen Antigenen verteidigen können (Luciani, et al., 2001). Auch qualitative Veränderungen der T-Zell-Antwort im Alter tragen ihren Teil zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen und zur Entstehung bestimmter Malignome bei (Pawelec, et al., 2002). Am Modell der rheumatoiden Arthritis führt eine altersbedingte verringerte Freisetzung reifer T-Zellen aus dem Thymus zu folgenden Anpassungsmechanismen der peripheren T-Zellen: verändertes klonales Expressionsmuster, veränderte Genexpression und verändertes funktionales Profil der T-Zellen, Verringerung der Diversität der T-Zell-Rezeptoren und eine erhöhter Produktion autoreaktiver T-Zellen (Goronzy & Weyand, 2001).

### **1.3 APECED**

Zum Verständnis der Entstehung von Autoreaktivität unabhängig vom Alter wird zuerst das Bild einer genetisch festgelegten Autoimmunkrankheit mit Antikörpern gegen mehrere Organsysteme besprochen und im nächsten Abschnitt auf die Entstehung der autoreaktiven Zellen eingegangen. Interessante Hinweise auf die Entstehung von Autoreaktivität versus Aufbau und Erhaltung von Selbsttoleranz wurden durch Untersuchungen der seltenen autosomal-rezessiv vererbaren Autoimmunkrankheit APECED (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy) gewonnen. Diese kommt gehäuft in Finnland, Norwegen und Sardinien vor und ist charakterisiert durch autoimmune Polyendokrinopathien, chronische mukokutane Candidiasis und ektodermale Dystrophien.

Einen Überblick dazu geben Tanja Meriluoto und Pärt Peterson (Meriluoto, et al., 2001; Peterson & Peltonen, 2005): zur Diagnosestellung von APECED müssen zwei der drei Kriterien primärer Hypoparathyroidismus, primäre Nebenniereninsuffizienz (Morbus Addison) und mukokutane Candidiasis erfüllt sein. Die chronische mukokutane Candidiasis ist häufig das erste Zeichen einer vorliegenden Erkrankung.

Charakteristische ektodermale Manifestationen sind Zahnschmelzhypoplasien, Nageldystrophie und Alopezie, bei der Antikörper gegen die Tyrosin-Hydroxylase gefunden werden.

Passend zum klinischen Bild der Endokrinopathien lassen sich im Serum der Patienten gewebespezifische Autoantikörper nachweisen. Autoantikörper gegen die für die Steroidsynthese wichtigen Cytochrom P450 Enzyme P450c17 und P450scc können Hypogonadismus verursachen. Patienten, die Antikörper gegen P450c21 aufweisen, zeigen oft das klinische Bild eines M. Addison. Zudem sind hohe Antikörpertiter gegen die Diabetes mellitus-spezifischen Antigene aromatische L-Aminosäure Decarboxylase (AADC), glutamic acid decarboxylase (GAD65) und pankreatische zytoplasmatische Inselantikörper (ICA) vorhanden. Allerdings ist der Nachweis dieser Antikörper nicht konstant mit dem klinischen Auftreten eines IDDM (insulin dependent diabetes mellitus) in Assoziation mit APECED assoziiert.

Gastrointestinale Symptome wie die Autoimmungastritis oder -hepatitis und die Malabsorption können ebenfalls mit APECED assoziiert sein. Dabei können Antikörper gegen CYP1A2 und gegen CYP2A6 klinische Beschwerden im Sinne einer Autoimmunhepatitis hervorrufen. Gastrointestinale Beschwerden werden durch eine Autoimmunreaktion gegen die Tryptophan-Hydroxylase in den Serotonin-produzierenden enterochromaffinen Zellen im Magenantrum und gegen die Histidin-Decarboxylase in den histaminproduzierenden enterochromaffin-ähnlichen Zellen des Magenfundus verursacht.

### 1.4 AIRE

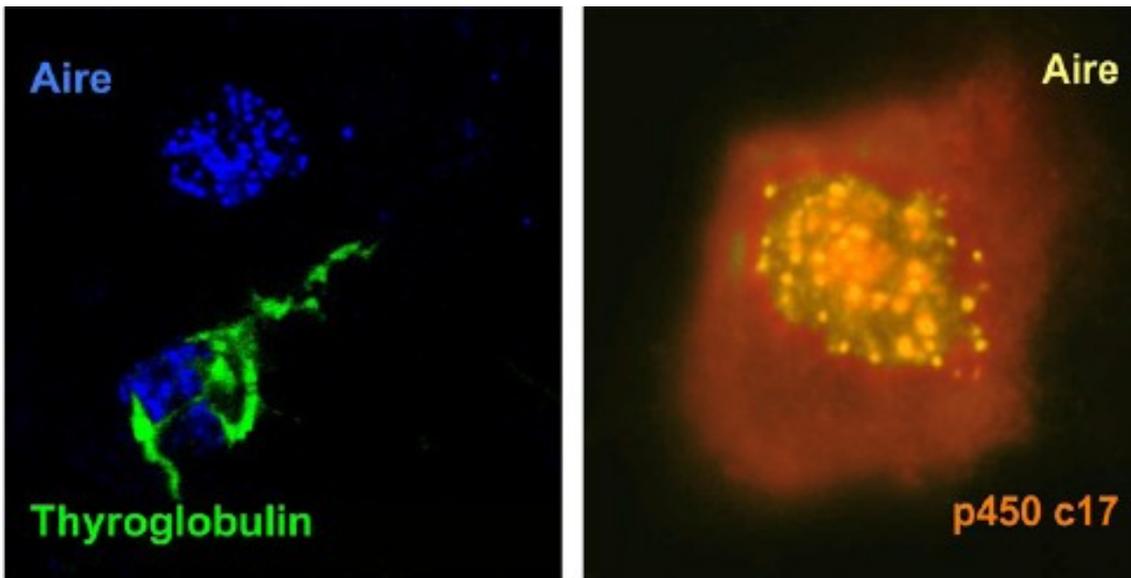
Eine Genmutation auf Chromosom 21q22.3 bei diesen Patienten führte zu der Entdeckung des verantwortlichen *AIRE* (= *autoimmune regulator*) Gens (Nagamine, et al., 1997), das für einen nukleären Transkriptionsfaktor kodiert. Die Proteinexpression des *AIRE*-Gen findet im Thymus in einer Subpopulation medullärer Thymus-Epithelzellen, in der Peripherie in Monozyten und differenzierten dendritischen Zellen statt.

Im Mausmodell reguliert AIRE die Expression gewebespezifischer Antigene auf medullären Epithelzellen (Abb.1), indem es circa 100 bis 300 Gene als Transkriptionsfaktor aktiviert (Anderson et al 2002).

In einem anderen Mausmodell wurde untersucht, welche Rolle ein Ausfall des *AIRE*-Gens für CD4+ T-Zellen mit Spezifität für ein bestimmtes Autoantigen spielt (Liston, Lesage, Wilson, Peltonen, & Goodnow, 2003). Bei Ausfall von AIRE wurden signifikant mehr autoreaktive T-Zellen produziert als bei Anwesenheit von AIRE. Die autoreaktiven T-Zellen konnten von den Tieren nicht neutralisiert werden. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass AIRE die negative Selektion potentiell autoreaktiver T-Zellen reguliert.

Aus diesen und anderen Beobachtungen ergibt sich folgendes Arbeitsmodell zur Beeinflussung der negativen Selektion organspezifischer T-Zellen durch AIRE (Su & Anderson, 2004): AIRE steuert die ektope Expression organspezifischer Selbstantigene in medullären Thymusepithelzellen, die den sich entwickelnden T-Zellen präsentiert werden, und nimmt somit Einfluss auf die negative Selektion hochaffiner T-Zellen.

Da es wie unter 1.2. beschrieben zu einem vermehrten Auftreten von autoreaktiven T-Zellen im Alter kommt (Goronzy & Weyand,2001), könnte dies durch eine starke Abnahme oder ein Fehlen von AIRE erklärt werden.

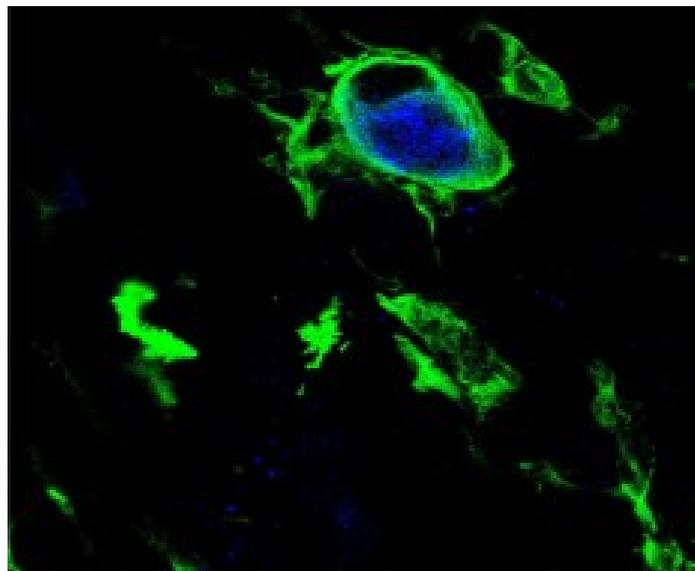


**Abb.1:** Co-Expression von AIRE mit zwei Selbst-Antigenen, Thyreoglobulin und der Cytochrom-Oxidase p450c17 (Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten, Bilder zur Verfügung gestellt von Prof. Philipp Ströbel (Thyreoglobulin) und Prof. Pärt Peterson (p450c17))

### 1.5 AIRE-Expression in der Nachbarschaft von Hassall-Körperchen

Bei der morphologischen Untersuchung der Normalthymus- und der Thymitis-Präparate wurde zudem die Abnahme der Hassall-Körperchen bezogen auf die Thymusfläche in verschiedenen Altersstufen, wie auch die Expression von AIRE<sup>+</sup>-Zellen (= AIRE-positiven Zellen) in der Nähe von Hassall-Körperchen untersucht. Daher soll zuerst auf die Hassall-Körperchen eingegangen werden. Hassall-Körperchen können über die Freisetzung von thymusspezifischem stromalen Lymphopoietin (TSLP = thymic stromal lymphopoietin) durch ihre Epithelzellen in die T-Zell Homöostase eingreifen (Watanabe, et al., 2004). TSLP aktiviert dendritische Zellen, CD80 und CD86 zu exprimieren. CD80 und CD86 sind Oberflächenmarker von Antigen-präsentierenden Zellen, die mit T-Zellen eine Bindung eingehen können, in diesem Fall speziell mit CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen. Die Bindung von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen an CD80 und CD86 der dendritischen Zellen führt zur Proliferation und Differenzierung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen (zur

Bedeutung von Foxp3 s. Campbell & Ziegler, 2007). Auch AIRE, das in medullären Thymusepithelzellen exprimiert wird (siehe Abbildung 2), befindet sich in örtlicher Nähe zu diesen Vorgängen und könnte eine Rolle bei der Bildung regulatorischer T-Zellen spielen (Aschenbrenner, et al., 2007). Daher soll in der Diskussion auf mögliche Erklärungen einer nahen Expression von AIRE+ -Zellen und Hassall-Körperchen und deren Vorzüge bei der Bildung von regulatorischen T-Zellen eingegangen werden.



**Abb. 2:** AIRE positive medulläre Thymusepithelzelle (Immunfluoreszenz Blau: AIRE, Grün: pan-Cytokeratin) (Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. Ströbel, Mannheim)

### 1.6 Morphologische Veränderungen des entzündeten Thymus

Die Expression von AIRE+ -Zellen und eine Anordnung von AIRE+ -Zellen in der Nachbarschaft von Hassall-Körperchen wurde sowohl im Normalthymus als auch bei Thymitis untersucht. Eine morphologisch unterschiedliche Expression der AIRE+ -Zellen in der Nähe von Hassall-Körperchen zwischen beiden Stichproben könnten einen Hinweis auf die Entstehung einer unterschiedlichen Produktion von Auto-Antikörpern zwischen Normalthymus und Thymitis geben.

Die Thymusarchitektur des entzündeten Thymus zeichnet sich vor allem durch die Bildung von B-Zell-Follikeln mit oder ohne Vorhandensein von Keimzentren in der Medulla aus (Strobel, et al., 2008). In den vorliegenden Stichproben war ein Vorhandensein von Keimzentren bei allen Thymitis-Fällen vorhanden. Ein Vorhandensein von Keimzentren ist pathognomonisch für eine Myasthenie-Form, die in 30%-40% vor dem 40. Lebensjahr auftritt und als EOMG (early-onset Myasthenia Gravis) bezeichnet wird. Dagegen ist eine sehr milde Ausprägung kennzeichnend für eine Myasthenie-Form, die in 70 % nach dem 40. Lebensjahr auftritt und als spät einsetzende Myasthenie (LOMG, late-onset Myasthenia Gravis) bezeichnet wird (Strobel, et al., 2008).

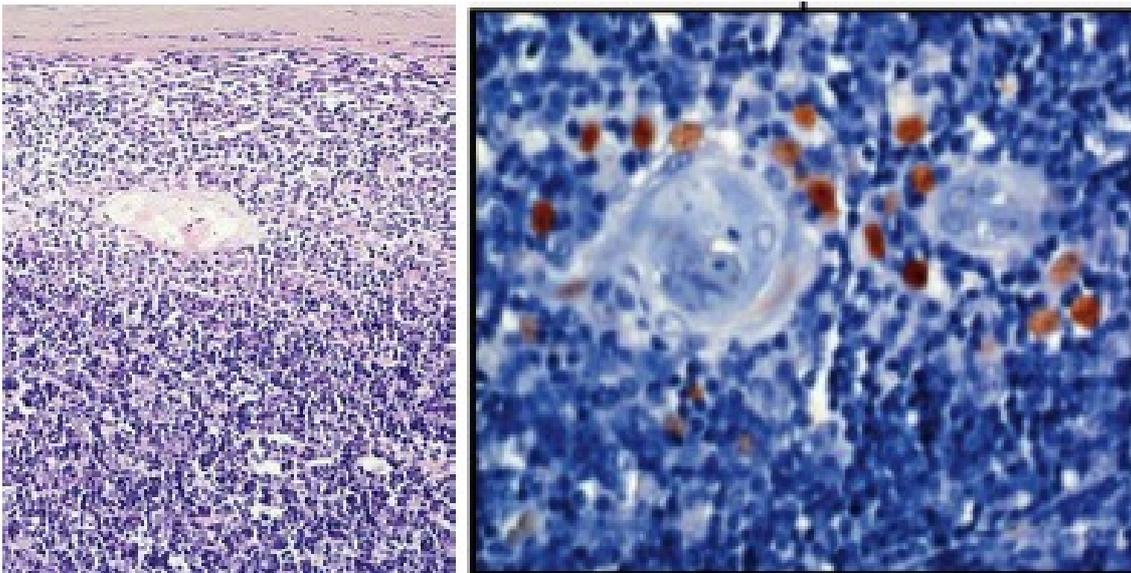
### **1.7 AIRE- Expression bei B1-Thymomen**

Als Kontrollmodell zur Untersuchung des örtlichen Zusammenhangs zwischen Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen beim Menschen wurde eine bestimmte histologische Subgruppe seltener Mediastinaltumoren, WHO Typ B1-Thymome, untersucht. Ein kurzer Überblick im Folgenden soll zum Verständnis der Einteilung von Thymomen und zur Wahl der B1-Thymome für die vorliegenden Untersuchungen beitragen.

Nach der aktuell gültigen WHO-Klassifikation von Tumoren des Thymus werden Thymome nach der Morphologie der neoplastischen Epithelzellen und dem Gehalt an überlagernden (nicht-neoplastischen) unreifen T-Zellen in die Typen A, B und AB unterteilt. Von den Thymomen werden die Thymuskarzinome unterschieden, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Die neoplastischen Epithelzellen der Typ A Thymome sind spindelförmig und sind nur von wenigen unreifen T-Zellen überlagert, während die Epithelzellen der Typ B Thymome eine mehr polygonale Form aufweisen und von sehr zahlreichen unreifen T-Zellen (Thymozyten) überlagert werden. In Thymomen vom Typ AB finden sich neoplastische Epithelzellen mit spindelförmigen als auch solche mit runden Zellkernen sowie ein wechselnder Thymozytengehalt. Thymome vom Typ B lassen sich je nach Anzahl der Lymphozyten und Morphologie der Epithelzellen in die Untergruppen B1, B2 und B3 einteilen. Thymome der WHO-

Kategorie B1 weisen von allen Typen die stärkste morphologische Ähnlichkeit mit dem normalen Thymus auf (siehe Abbildung 3): sie zeigen häufig eine sehr deutliche Ausbildung von kortikalen und medullären Arealen, wobei innerhalb der medullären Areale häufig zahlreiche Hassall-Körperchen ausgebildet werden (Scarpino, et al., 2007). Weiterhin sind sie der einzige Thymom-Subtyp, in dem AIRE+ -Zellen nachgewiesen wurden (Ströbel et al. 2007).

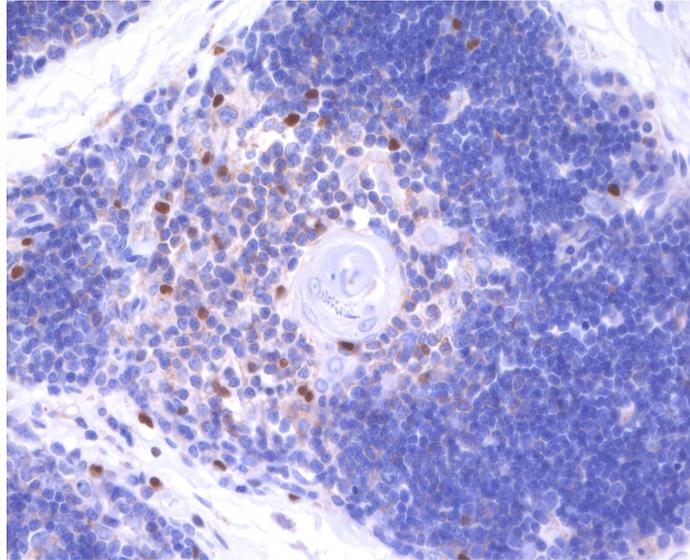
Die B1-Thymome boten daher ein geeignetes Modell, um den örtlichen Zusammenhang zwischen AIRE+ -Zellen und Hassall-Körperchen zu überprüfen, da in B1-Thymomen häufig auch Areale ohne Hassall-Körperchen vorkommen, in denen die Merkmale der regulären Thymusarchitektur aufgehoben waren.



**Abb. 3:** Histologie eines Typ B1 Thymoms (links) mit charakteristischer „organoider“ Gliederung in kortikale (untere Bildhälfte) und medulläre Areale (obere Bildhälfte). In dem medullären Areal Nachweis eines Hassall-Körperchen  
Rechtes Bild: immunhistochemische Darstellung AIRE-positiver medullärer Epithelzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Hassall-Körperchen (Immunperoxidase am Paraffin-Schnitt). Bilder zur Verfügung gestellt von Prof. P. Ströbel, Mannheim.

### **1.8 Einfluß von AIRE auf die Bildung regulatorischer T-Zellen**

Um der Fragestellung einer möglichen Funktion von AIRE nachzugehen, wurde untersucht, ob regulatorische T-Zellen in unmittelbarer Nähe zu AIRE exprimiert wurden. Abbildung 4 vermittelt einen ersten Eindruck von der Expression des Oberflächenmarkers FoxP3<sup>+</sup> (lila- violett eingefärbt) in der Nähe von AIRE<sup>+</sup>-medullären Epithelzellen (braun eingefärbt). Erst vor kurzem wurde nachgewiesen, dass bei der durch AIRE induzierten Expression eines spezifischen Oberflächenproteins auf medullären Epithelzellen eine vermehrte Umwandlung von T-Zellen mit spezifischem Rezeptor für eben dieses Antigen zu spezifischen regulatorischen T-Zellen stattfand (Aschenbrenner, et al., 2007). Die Umwandlung der markierten spezifischen T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen konnte man durch Expression von FoxP3<sup>+</sup> nachvollziehen. Regulatorische T-Zellen mit Expression von Fox P3<sup>+</sup> reagieren bei Bindung an ein spezifisches Antigen anders als Effektorzellen weder mit Proliferation, noch mit der Produktion von Zytokinen. Es wird vermutet, dass dieser proliferative Signalweg durch den Transkriptionsfaktor FoxP3<sup>+</sup> inhibiert wird. Eine andere Fähigkeit von regulatorischen T-Zellen besteht darin, durch Zell-Zell-Kontakte die Aktivität anderer T-Zellen zu unterdrücken (Campbell & Ziegler, 2007).



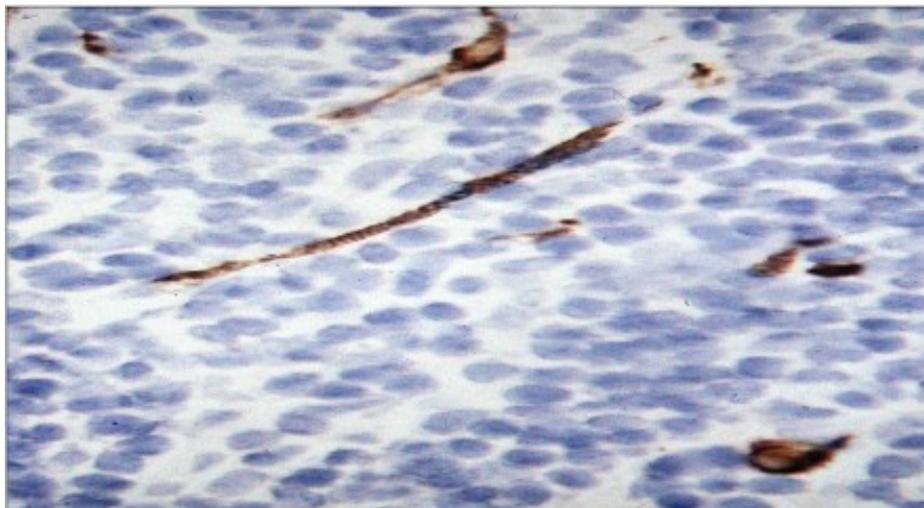
**Abb. 4:** Immunhistochemische Darstellung AIRE-positiver medullärer Epithelzellen und Ausbildung des Oberflächenmarkers FoxP3+ der regulatorischen T-Zellen ( freundlicherweise von Prof. P. Ströbel zur Verfügung gestellt)

### 1.9 Myoidzellen im Alter

Weiterhin wurde das Verhalten von Myoidzellen (in Abbildung 5 dargestellt) bei steigendem Alter systematisch untersucht. Myoidzellen im Thymus werden vor allem mit der Pathogenese der Myasthenia gravis in einen Zusammenhang gebracht. Dabei wird derzeit davon ausgegangen, dass diese in zwei Schritten abläuft. Medulläre Thymusepithelzellen, die Untereinheiten des Acetylcholin-Rezeptors (ACh-Rezeptor) exprimieren, werden Angriffspunkte der Komplementkaskade. In der Folge werden Antikörper gegen diese Untereinheiten des ACh-Rezeptors produziert, die die intakten ACh-Rezeptoren auf benachbarten muskelähnlichen Myoidzellen angreifen und über eine komplement-vermittelte Entzündungsreaktion zur Entstehung von Keimzentren im Thymus führen (Leite, et al., 2007).

Über die Funktion der Myoidzellen im gesunden Thymus wurde lange Zeit gerätselt. Myoidzellen haben im Gegensatz zu Thymusepithelzellen die Fähigkeit, über Zell-Zell-Kontakte Thymozyten vor Apoptose zu schützen. Dies

geschieht dadurch, dass sie die Mechanismen fördern, die das Überleben der Thymozyten sichern (Le Panse & Berrih-Aknin, 2005). Diese Wirkung führte bei einer Kokultur von Myoidzellen und naiven T-Zellen zu einer Proliferation von CD4+ T-Helfer-Zellen und einer Abnahme von CD8+ T-Killer-Zellen. Diese Funktion macht eine Untersuchung der Myoidzellen über verschiedene Altersstufen hinweg in Anbetracht der Thymusinvolution und Immunsenezenz in Normalthymus interessant. Eine Untersuchung der Myoidzellen über verschiedene Altersstufen hinweg könnte auch für die Pathogenese der Myasthenie und ihr Auftreten in unterschiedlichem Alter mit unterschiedlicher Ausprägung von morphologischen Entzündungszeichen wie unter 1.6 beschrieben von Interesse sein.



**Abb. 5:** Immunhistochemische Darstellung von Myoidzellen im menschlichen Thymus mit einem Antikörper gegen Desmin (Peroxidase am Paraffinschnitt) Bild zur Verfügung gestellt von Prof. P. Ströbel, Mannheim.

### **1.10 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation**

Ein Anliegen der vorliegenden Dissertation war es, die Expression von AIRE im Alter zu untersuchen. Eine konkrete Fragestellung war, ob die Subpopulation der medullären Thymusepithelzellen mit Expression von AIRE über das Alter hinweg abnimmt und ob der Kurvenverlauf dem der Thymusfläche entspricht. Diese Fragestellung wurde in dieser Doktorarbeit sowohl bei Thymitis als auch bei Normalthymi untersucht.

Durch den Vergleich von Präparaten von Thymitis und Normalthymi könnte sich eine Beeinflussbarkeit der Expression von AIRE-positiven Zellen (AIRE+ -Zellen) durch eine entzündliche Komponente ergeben.

Weiterhin wurde die Expression von AIRE+ -medullären Thymusepithelzellen im Zusammenhang mit der thymusspezifischen Organarchitektur untersucht. Als Hypothese wurde aufgestellt, dass AIRE+ -medulläre Thymusepithelzellen meist in der Nähe von Hassallschen Körpern exprimiert werden. Auch bezüglich dieser Fragestellung wurde ein Unterschied zwischen Normalthymus-Präparaten und Thymitis-Präparaten untersucht.

Im B1-Thymom-Modell wurde überprüft, ob Hassall-Körperchen häufiger zusammen mit AIRE+ -Zellen exprimiert wurden oder ob sie ebenso häufig ohne AIRE+ -Zellen exprimiert wurden.

Eine weitere Fragestellung in der vorliegenden Arbeit war der Zusammenhang zwischen AIRE und regulatorischen T-Zellen. Insbesondere wurde untersucht, ob sich die Anzahl der regulatorische T-Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe zu AIRE+ -Zellen befanden, von der Anzahl der regulatorischen T-Zellen, die sich nicht in der Nähe von AIRE+ -Zellen befanden, unterschied.

Zudem wurde der Verlauf der Myoidzell-Expression bei steigendem Alter untersucht. Die konkrete Hypothese war, dass der Gehalt an Myoidzellen bei steigendem Alter abnimmt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientendaten**

Die Daten der Patienten, deren Thymuspräparate zur Untersuchung der Fragestellung vorlagen, sind in Tabellen im Anhang (siehe 9.2) zusammengefasst. Es wurde im Rahmen einer thorakalen Operation ein Thymusbiopsat entnommen und dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg zugesandt. Die Diagnose Normalthymus versus Thymitis wurde mikroskopisch anhand des Vorhandenseins von Keimzentren gestellt. Es wurden 30 Normalthymi von Patienten zwischen 0 und 89 Jahren und 17 Thymitis-Präparate von Patienten zwischen 10 und 59 Jahren untersucht. Dabei wurden die Patienten in Dekaden eingeteilt. Zur Erfassung der Patienten wurden die Fallnummer, die Dekade, das Alter, das Geschlecht und die Diagnose in einer Tabelle festgehalten.

### **2.2 Immunhistochemische Färbung**

Das in 10%igem Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Thymusgewebe wurde geschnitten, auf mit Silan beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet, bis es am folgenden Tag mit Xylol 20 Minuten entparaffiniert wurde und mit einer von 100%igem bis 70%igem Alkohol absteigenden Reihe jeweils für einige Minuten rehydriert wurde. Nachdem die Schnitte mit 10 mM Zitronensäure (pH 5,5) für 5 Minuten im Dampftopf gekocht und unter Leitungswasser abgekühlt worden waren, wurden sie in PBS (Phosphat Buffer Saline) Puffer überführt. Im Folgenden wurden die Schnitte mit einem Kit von Zymed gefärbt und daraufhin 15 Minuten mit „Blocking Reagenz“ (Histostain-Plus, Zymed) behandelt.

Der Primär-Antikörper wurde dazugegeben und nach einer Stunde mit PBS (pH 7,4) abgewaschen, der biotinylierte Sekundär-Antikörper wurde nach 20 Minuten damit abgespült. Weiterhin wurden die Schnitte mit Streptavidin und Peroxidase für 20 Minuten inkubiert, dann mit PBS abgespült und mit Diaminobenzidin 10 Minuten lang gefärbt. Gegengefärbt wurde mit Hämalun.

### 2.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Fixierung in Formalin, die Einbettung in Paraffin, das Aufziehen auf die Objektträger, die Entparaffinisierung mit Xylol und die Rehydrierung mit Alkohol wurden wie oben beschrieben vorgenommen. Die Schnitte wurden mit Dako cytation und Tris buffered Saline gekocht, mit dem Kit von Zymed gefärbt und für 15 Minuten mit „Blocking Reagenz“ (Dako) behandelt.

Die Schnitte wurden eine Stunde lang mit den Primär-Antikörpern gegen Foxp3 und AIRE bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal je fünf Minuten mit Tris-Puffer abgewaschen.

Daraufhin wurden die Sekundär-Antikörper eine Stunde lang dazu gegeben und danach dreimal je fünf Minuten gewaschen

Zum Nachweis von Foxp3 wurden Cy5 markierte Sekundärantikörper, für den Nachweis von AIRE Cy3 markierte Sekundärantikörper verwendet.

Antikörper/ Nachweissystem	Verdünnung	Firma
AIRE	1 :1000	
Desmin	1 :400	DAKO
CD45 RA	1 :100	DAKO
Foxp3+	1 :50	
Donkey anti mouse Cy5 (blau)	1 :100	Jackson Immuno Research
Donkey anti rabbit Cy3 (rot)	1 :100	Jackson Immuno Research
Labeling Kit: Zenon Alexa 488 (grün)		Invitrogen
Immunhisto-Nachweissystem Biotin-Streptavidin		Zymed Laboratories

**Tab. 1:** Liste der verwendeten Antikörper und Detektionsreagenzien

## 2.4 Mikroskopische Auswertung

Sowohl bei den Normalthymus-Präparaten als auch bei den Thymitis-Präparaten wurden die Fallnummer und die Dekade der Präparate der Patienten aufgezeichnet. Die dazugehörige Anzahl der AIRE-positiven Zellen wurde gezählt und durch die morphometrisch ermittelte Fläche des Präparates geteilt, so dass die Anzahl der AIRE-positiven Zellen pro Fläche errechnet wurde. Auch die Anzahl der Hassall-Körperchen der Thymitis- und Normalthymus-Präparate wurden notiert und die Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche errechnet. Die genannten Parameter wurden in Tabellenform festgehalten (weitere Tabellen siehe Anhang).

Um der Fragestellung nachzugehen, ob AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen verteilt waren, wurden die Anzahl der AIRE+ -Zellen der Normalthymus- und Thymitis-Präparate, die in unmittelbarer Nähe der Hassall-Körperchen zu sehen waren, notiert. Aus der Anzahl der AIRE+ -Zellen, die um die Hassall-Körperchen gruppiert waren und aus der Absolutzahl der AIRE+ -Zellen des untersuchten Präparates wurde der prozentuale Anteil der AIRE+ -Zellen in unmittelbarer Nähe zu Hassall-Körperchen errechnet. Die Anzahl der AIRE+ -Zellen, die absolute und prozentuale Anzahl der AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen wurden neben der entsprechenden Fallnummer in Tabellenform festgehalten. Bei Thymitis-Präparaten wurden zusätzlich die absolute und prozentuale Anzahl der AIRE+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Keimzentren notiert.

Anhand der B1-Thymome sollte untersucht werden, ob auch im Tumormodell Hassall-Körperchen mit AIRE+ -Zellen assoziiert waren, oder ob diese Assoziation im Tumormodell aufgehoben war. Dazu wurden einzelne Felder der Präparate, die aufgrund des Tumormodells als unabhängige Stichproben gezählt werden konnten, auf diese Frage hin untersucht. Die Anzahl der Felder, in denen Hassall-Körperchen Körper allein (Hassall-positiv, AIRE-negativ = Hassall+ AIRE-), in Kombination mit AIRE+ -Zellen (Hassall-positiv, AIRE-positiv = Hassall+ AIRE+), AIRE+ -Zellen allein (Hassall-negativ, AIRE-positiv = Hassall-AIRE+) oder weder Hassallsche Körper noch AIRE+ -Zellen (Hassall-

negativ, AIRE-negativ = Hassall-AIRE-) gesehen wurden, wurde für jeden Patienten tabellarisch aufgezeichnet. Dazu wurden die entsprechende Fallnummer und die Summenzahl aller ausgezählten Felder eines Präparats notiert.

Anschließend wurde für jede der vier eben beschriebenen Kombinationsmöglichkeiten aus Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen die Summe über alle Patienten hinweg gebildet. Zudem wurden die Quersummen gebildet, das heißt es wurde die Anzahlen aller Hassall-positiven und die Anzahlen aller Hassall-negativen Areale, gleichwohl ob AIRE-positiv oder AIRE-negativ, addiert. Ebenso wurde die Summe aus allen AIRE-positiven und die Summe aus allen AIRE-negativen Arealen, gleichwohl ob Hassall-positiv oder Hassall-negativ, gebildet.

Um die Anzahl der Foxp3+ -Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe der AIRE+ -Zellen befanden, zu erfassen, wurde zuerst ein Abstand der Größe von weniger als zwei AIRE+ -Zellen festgelegt, in dem sich Foxp3+ -Zellen, die um AIRE+ -Zellen verteilt waren, befanden. Von jeder Versuchsperson wurden fünf Präparate untersucht, auf denen Foxp3+ -Zellen und AIRE+ -Zellen angefärbt wurden und fünf Präparate, auf denen Foxp3+ -Zellen, aber keine AIRE+ -Zellen angefärbt wurden. Tabellarisch wurden die Fallnummer, die Anzahl der AIRE+ -Zellen, die Anzahl der Foxp3+ -Zellen und die Anzahl der Foxp3+ -Zellen, die sich im definierten Abstand um AIRE+ -Zellen befanden, notiert. Für die Präparate, in denen keine AIRE+ -Zellen angefärbt wurden, wurden lediglich die Anzahl der Foxp3+ -Zellen aufgezeichnet.

Für die Auswertung der Myoidzellen wurden die Fallnummer, die Anzahl der Myoidzellen und die Fläche der Präparate erfasst. Aus der Anzahl der Myoidzellen und der Fläche wurde die Zahl der Myoidzellen pro Fläche errechnet

### **2.5 Morphometrische Auswertung**

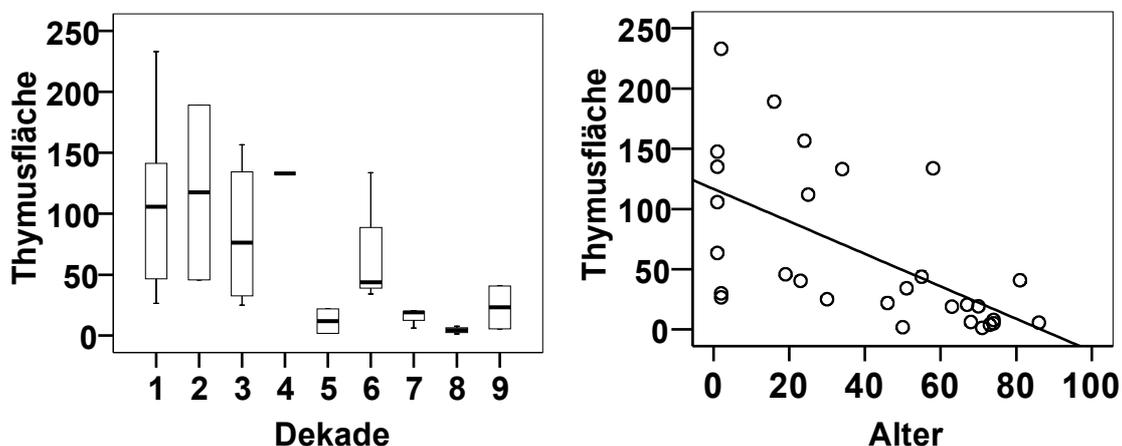
Die morphometrische Auswertung wurde mit einem speziellen Computerprogramm ausgeführt, der sogenannten digitalen Farbdifferenzanalyse. Damit konnte das spezifische Thymusgewebe, zu dem unter anderem die bereits besprochenen kortikalen und medullären Thymusepithelzellen, Hassall-Körperchen, und Myoidzellen gehören, von Fettgewebe, Blutgefäßen oder Bindegewebe unterschieden werden. Dafür wurden mithilfe eines Axioplan-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen) und einer Nikon DXM D1200 Digital Kamera Aufnahmen der Schnitte gemacht. 2,27 cm<sup>2</sup> Thymusfläche wurden auf digitale Bilder einer Größe von 640 mal 512 Pixel abgebildet. Zur Erkennung des spezifischen Thymusgewebes von umgebendem Gewebe, wurde die Fähigkeit des Computerprogramms genutzt, die drei Farben weiß, rot und blau zu unterscheiden. Dabei wurde die Intensität der Farben durch Zahlenwerte kodiert. Im Schnitt war Thymusgewebe bläulich angefärbt, Fettgewebe war kaum angefärbt und Erythrozyten waren ebenfalls nicht angefärbt. Aufgrund ihrer natürlichen chemisch-physikalischen Zusammensetzung waren die Erythrozyten rot zu erkennen. Mittels eines Filters wurde der Kontrast zwischen den Farben verstärkt, was als image processing bezeichnet wurde. Das Programm konnte schließlich durch Anwendung eines weiteren Filters und durch die Kodierung der Werte für blaue Farbe als Thymusgewebe und für weiße Farbe als Fettgewebe einen Flächenwert für das erkannte Thymusgewebe des jeweils Präparates errechnen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Altersabhängige Abnahme der Anzahl der AIRE+ Zellen bezogen auf die Thymusfläche

##### 3.1.1 Normalthymi

Um die altersabhängige Abnahme der AIRE+ -Zellen bezogen auf die Thymusfläche darstellen zu können, wurde zuerst die Abnahme der Thymusfläche im Alter durch standardisierte morphometrische Messungen ermittelt. Es zeigte sich eine Abnahme der Thymusfläche mit steigendem Alter für die untersuchten Normalthymus-Präparate (Spearman Rho  $r=-0,697$ ,  $p<0,01$ , Abbildung 6 rechts). Alle folgenden Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Dabei wurden die Korrelationen bei vorhandener Normalverteilung nach Pearson berechnet und der Wert für die aufgeklärte Varianz angegeben, bei nicht vorhandener Normalverteilung wurde aushilfsweise die Korrelation nach Spearman Rho verwendet.

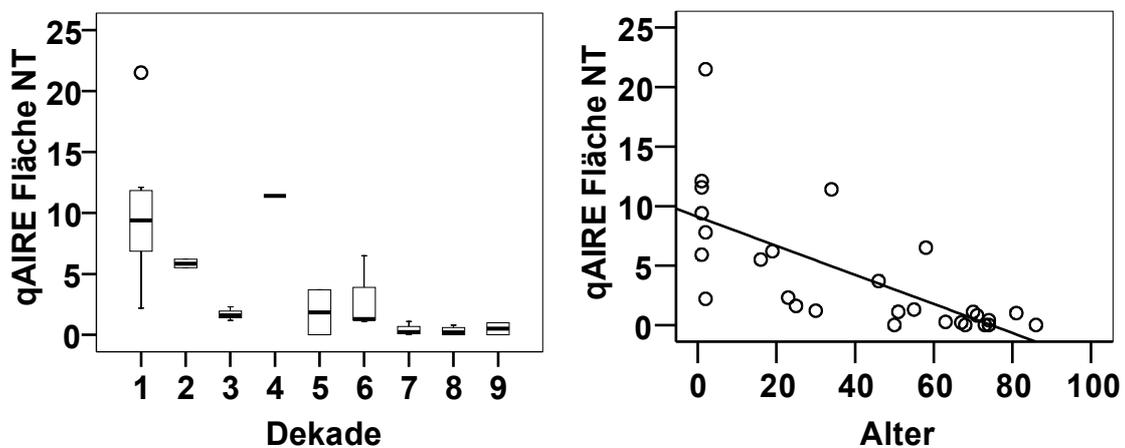


**Abb. 6:** Abnahme der Thymusfläche in Dekaden bei Normalthymi, rechts: Zusammenhang zwischen der Thymusfläche und dem Alter bei Normalthymi

Wie in Abbildung 6 sichtbar ist, war eine breite Streuung der Daten der ersten bis dritten Dekade auffällig. Dabei ist die große Streubreite in der zweiten

## Ergebnisse

Dekade durch die geringe Verfügbarkeit von Präparaten von Patienten in dieser Dekade zu erklären. Während in der vierten Dekade nur ein Präparat mit erstaunlich großer Thymusfläche vorhanden war, und auch die sechste Dekade durch einen Ausreisserwert nach oben beeinflusst wurde, gingen die Werte der Dekaden fünf bis neun in Richtung Nullwert. Ebenso nahm auch die Anzahl der AIRE+ -Zellen, die auf die Fläche des Präparates bezogen war, mit dem Alter ab (Spearman Rho  $r=-0,820$ ,  $p<0,01$ , Abbildung 7 rechts).

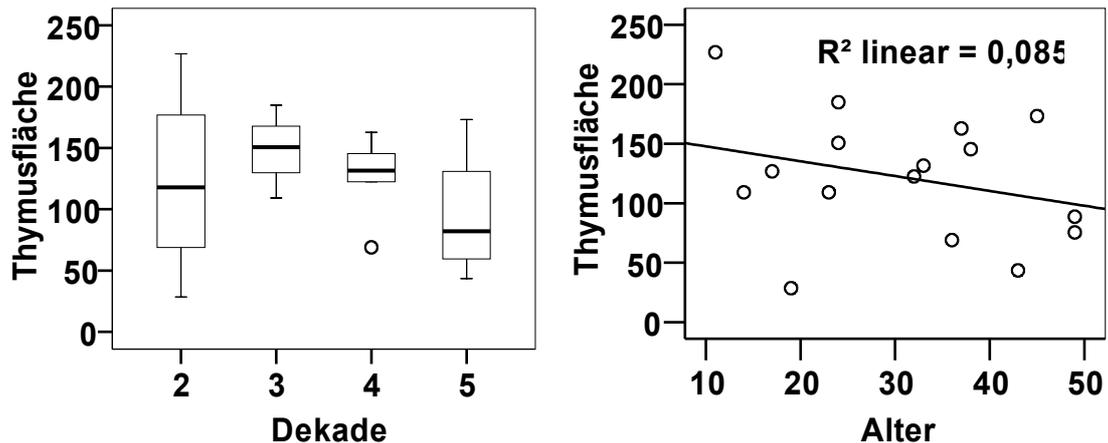


**Abb. 7** links: Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) in Dekaden bei Normalthymi, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) und dem Alter bei Normalthymi

In der ersten Dekade variierten die Werte der Einzelpersonen stärker als in anderen Dekaden (Abbildung 7 rechts). In der zweiten und dritten Dekade waren die Werte homogen verteilt (Abbildung 7 links). Analog zur Auswertung der Thymusfläche wurden in der vierten und in der sechsten Dekade Ausreisserwerte nach oben gefunden. Ab der siebten Dekade war die Streubreite der Daten sehr gering (Abbildung 7 links). Die Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche veränderte sich ab diesem Zeitpunkt nur geringfügig. Festzuhalten ist, dass noch in der achten und neunten Dekade vereinzelt AIRE+ -Zellen gesehen wurden.

### 3.1.2 Thymitis

Thymitis-Fälle waren aus der zweiten bis fünften Dekade vorhanden, wobei in der zweiten und fünften Dekade eine größere Streubreite der Werte auffiel als in der dritten und vierten Dekade (Abbildung 8 links).



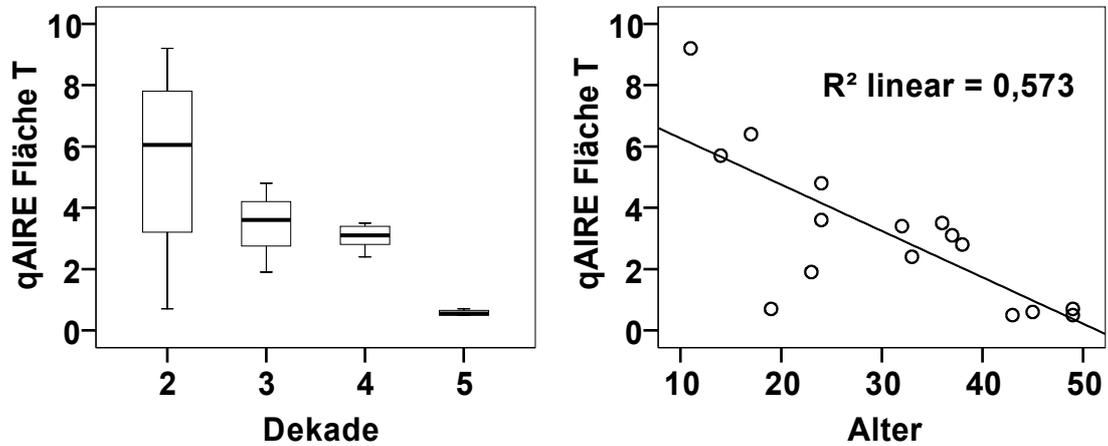
**Abb. 8** links: Abnahme der Thymusfläche in Dekaden bei Thymitis, rechts: Zusammenhang zwischen der Thymusfläche und dem Alter der Patienten mit Thymitis

Eine signifikante Abnahme der Thymusfläche bei steigendem Alter konnte nicht errechnet werden (Pearson  $r = -0,292$ ,  $p = 0,273$ , Abbildung 8 rechts). Unter Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen Thymusfläche und Alter konnte durch Kenntnis der Werte für das Alter wenig über die Unterschiedlichkeit der Werte für die Thymusfläche ausgesagt werden ( $R^2 \text{ linear} = 0,085$ , Abbildung 8 rechts).

Interessanterweise zeigte sich für die Anzahl an AIRE+ Zellen im Gegensatz zur Thymusfläche ähnlich wie bei den Normalthymi eine altersabhängige Abnahme von AIRE (Pearson  $r = -0,889$ ,  $p < 0,01$ , Abbildung 9 rechts). Die Kenntnis des Alters konnte die Unterschiedlichkeit der Werte der AIRE+ -Zellen pro Fläche

## Ergebnisse

unter Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen beiden Variablen, zu 57,3% erklären ( $R^2$  linear=0,573, Abbildung 9 rechts).



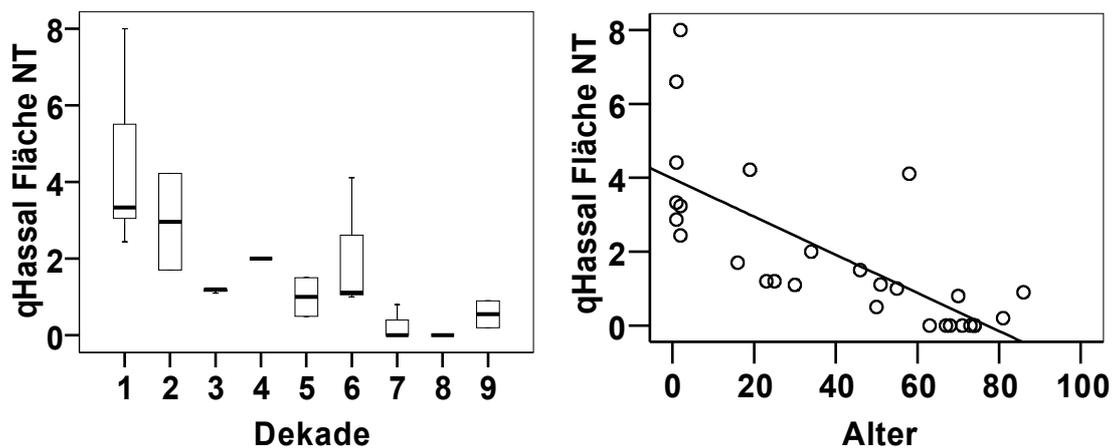
**Abb. 9** links: Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) in Dekaden, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) und Alter

Wie in Abbildung 9 links erkennbar war, erstreckte sich die Verteilung der Werte der zweiten Dekade über einen größeren Zahlenraum als die Verteilung der Werte der dritten und vierten Dekade. In der fünften Dekade unterschieden sich die Werte der AIRE+ -Zellen pro Fläche der einzelnen Versuchspersonen weniger als in den anderen Dekaden.

### 3.2 Altersabhängige Abnahme der Hassall-Körperchen

#### 3.2.1 Normalthymi

In den Normalthymi-Präparaten nahm die Anzahl der Hassall-Körperchen bei steigendem Alter signifikant ab (Spearman Rho  $r=-0,839$ ,  $p<0,01$ , Abbildung 10 rechts).



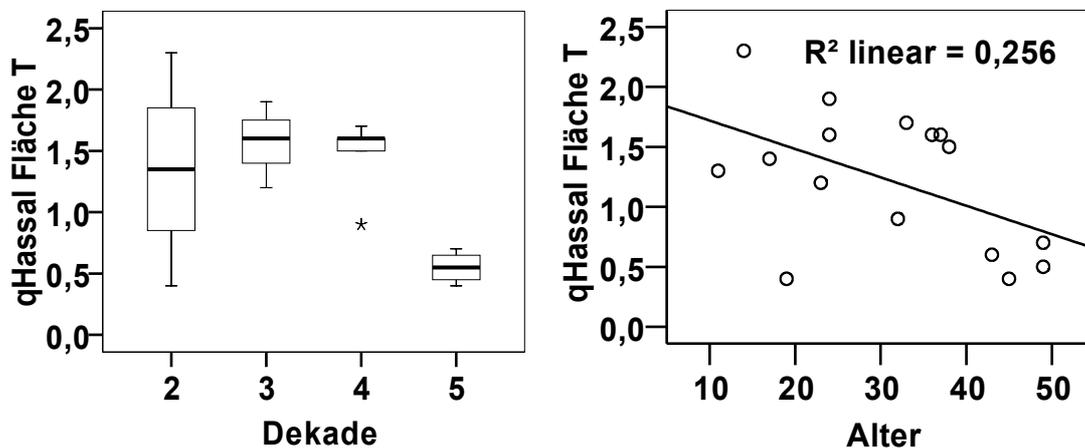
**Abb. 10** links: Abnahme der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche NT) in Dekaden bei Normalthymi, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche NT) und dem Alter bei Normalthymi

Dabei streuten die Werte der Hassall-Körperchen pro Fläche in den ersten beiden Dekaden stärker als in anderen Dekaden, während die einzelnen Werte in Dekade drei wenig divergierten. In der vierten und sechsten Dekade fanden sich die Ausreißerwerte, wie unter 3.1.1. beschrieben. Die Werte von Dekade fünf bis Dekade neun waren deutlich homogener verteilt als in den ersten beiden Dekaden. Die beschriebenen Trends der unterschiedlichen Streubreiten in den ersten beiden und den letzten fünf Dekaden sind auch für die Auswertung der Thymusfläche in Dekaden unter 3.1.1. zu beobachten. Unterschiede beider Verteilungen sind in Dekade drei zu erkennen, insofern als die Werte für die Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche in dieser Dekade wesentlich homogener verteilt sind als die Werte für die Thymusfläche. Es ist

anzumerken, dass noch in der neunten Dekade vereinzelte Hassall-Körperchen vorhanden waren.

### 3.2.2 Thymitis

Es ergab sich eine signifikante Abnahme von Hassall-Körperchen bei Thymitis-Präparaten (Pearson  $r=-0,503$ ,  $p=0,47$ , Abbildung 11 rechts). Unter Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen beiden Variablen konnte aus der Kenntnis der Werte für Alter 25,6 % der Unterschiedlichkeit der Werte der Hassall-Körperchen pro Fläche aufgeklärt werden (Abbildung 11 rechts).

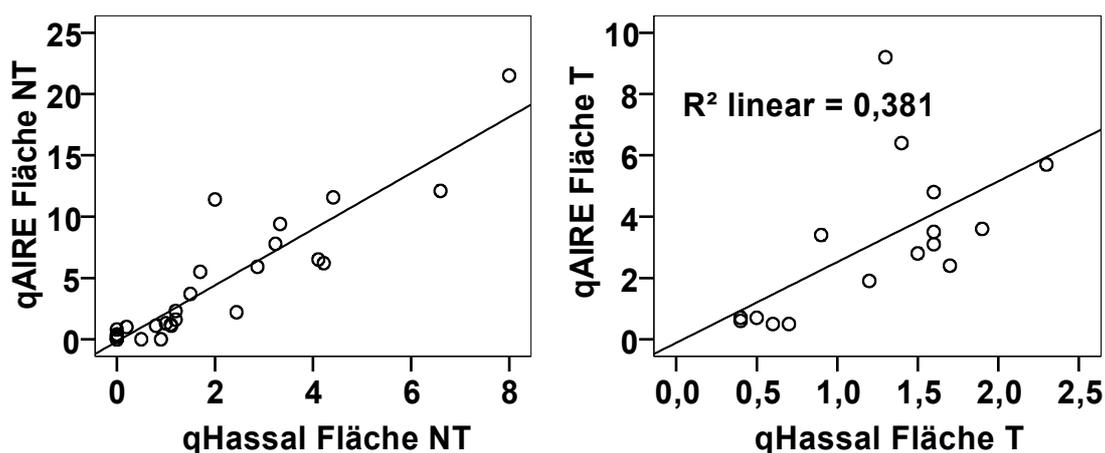


**Abb. 11** links: Abnahme der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche T) in Dekaden bei Thymitis, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche T) und Alter bei Thymitis

In der zweiten Dekade waren größere Unterschiede zwischen den einzelnen Werten erkennbar als in den anderen Dekaden. In der vierten Dekade war ein Ausreißer nach unten auffällig.

### 3.3 Anordnung von AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen und Keimzentren

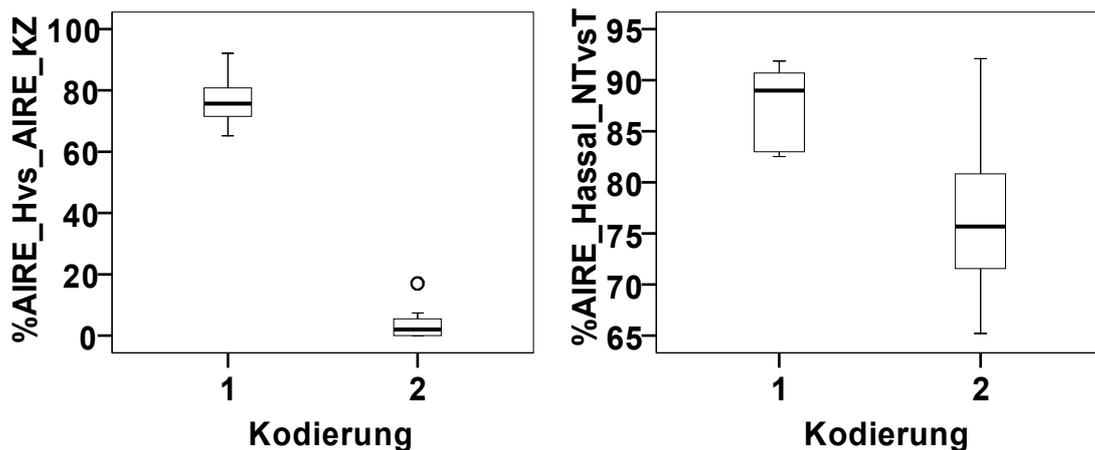
Bei der Untersuchung der Präparate wurde sowohl bei den Normalthymus-Präparaten, als auch bei den Thymitis-Präparaten eine eindeutige Gruppierung der AIRE+ -Zellen um die Hassall-Körperchen deutlich (Korrelation nach Spearman-Rho  $r=0,931$ ,  $p<0.01$  für Normalthymi, Abbildung 12 links). Was die Thymitis-Präparate betraf, zeigte sich eine Korrelation nach Pearson von  $r=0,439$ ,  $p=0,089$ . Die Unterschiedlichkeit zwischen den Einzelwerten der Anzahl von AIRE+ -Zellen pro Fläche wurde bei Thymitis zu 38,1% durch Kenntnis des Wertes der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche aufgeklärt (Abbildung 12 rechts).



**Abb. 12** links: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche bei Normalthymi (= qHassal Fläche NT), rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche T) und der Anzahl der Hassall-Körperchen bei Thymitis (= qHassal Fläche T)

## Ergebnisse

Wie in Abbildung 13 links erkennbar ist, zeigte sich keine häufige Anordnung der AIRE+ -Zellen um Keimzentren. Die Anzahl der AIRE+ -Zellen, die um Hassall-Körperchen angeordnet waren, unterschied sich dabei signifikant von der Anzahl der AIRE+ -Zellen, die um Keimzentren angeordnet waren (T-Test,  $p < 0,00$ ).



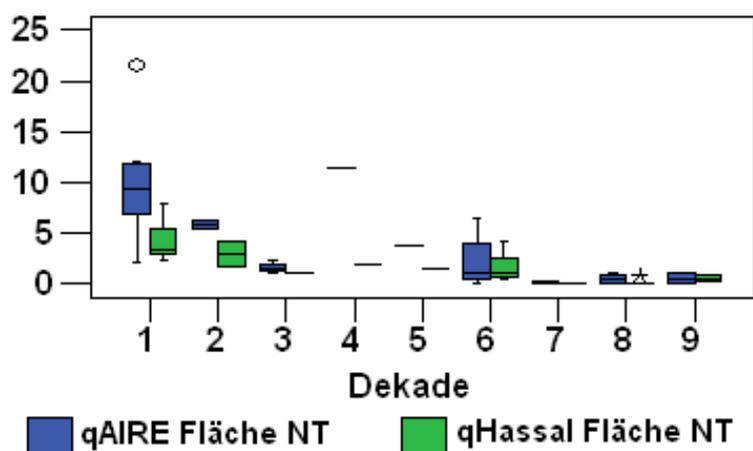
**Abb. 13** links: prozentualer Anteil der AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen (Kodierung 1) und prozentualer Anteil der AIRE+ -Zellen um Keimzentren (Kodierung 2), rechts: prozentualer Anteil der AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen bei Normalthymi (Kodierung 1) und bei Thymitis (Kodierung 2).

Die Thymitis-Präparate und Normalthymus-Präparate unterschieden sich bezüglich der Verteilung von AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen. Dabei war bei den Normalthymus-Präparaten die Anordnung von AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen signifikant höher als bei Thymitis-Präparaten (Abbildung 13 rechts, Mann-Whitney-U=10,  $p=0,02$ )

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von 3.1. bis 3.3.

#### 3.4.1 Normalthymi

Um einen Überblick über das zahlenmäßige Verhältnis der Anzahl der Hassall-Körperchen zur Anzahl der AIRE+ Zellen zu geben, wurden beide Werte über die Dekaden und einzelnen Versuchspersonen hinweg in einer Grafik zusammengestellt.

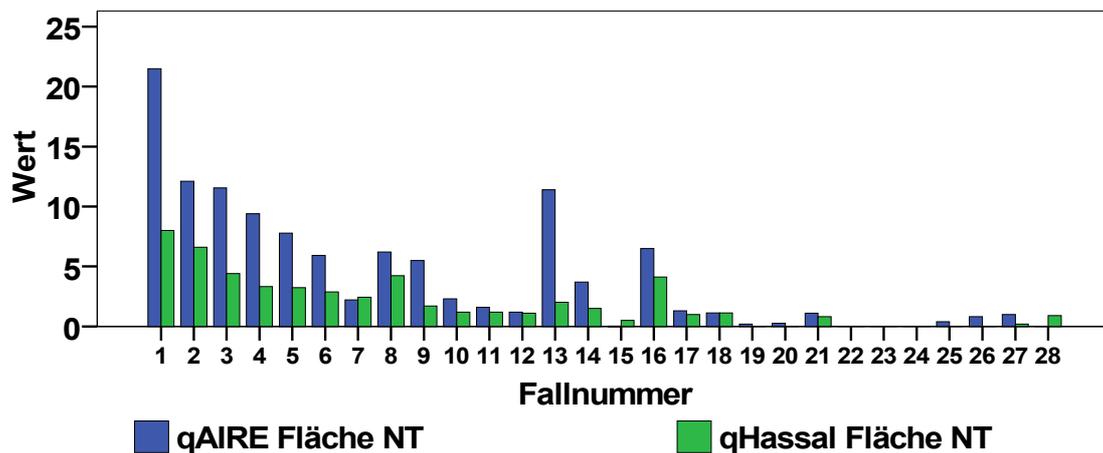


**Abb.14:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche NT) in Dekaden bei Normalthymi

Bei der Anordnung nach Dekaden wird erkennbar, dass in den ersten zwei Dekaden mehr AIRE+ -Zellen pro Fläche als Hassall-Körperchen pro Fläche vorhanden waren. Wie in Abbildung 14 sichtbar ist, war in der dritten Dekade kein deutlicher Unterschied in der Anzahl von Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen zu sehen, während in der vierten und fünften Dekade wieder mehr AIRE+ -Zellen pro Fläche erkennbar waren. In der sechsten bis neunten Dekade glichen sich die Werte der Anzahlen von Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen einander an.

## Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Einzelwerte in Abbildung 15 konnte grafisch in den meisten Fällen ein paralleles Verhalten von AIRE+ -Zellen und Hassall-Körperchen über alle Altersstufen hinweg aufgezeigt werden, was durch die hohe Korrelation nahegelegt wurde ( $r = 0,931$ ,  $p < 0.01$ , siehe 3.3.).



**Abb.15:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche NT) der einzelnen Versuchspersonen mit Normalthymi. Fallnummer 1-7 aus Dekade 1, 8-9 aus Dekade 2, 10-12 aus Dekade 3, 13 aus Dekade 4, 14-15 aus Dekade 5, 16-18 aus Dekade 6, 19-22 aus Dekade 7, 23-26 aus Dekade 8, 27-28 aus Dekade 9

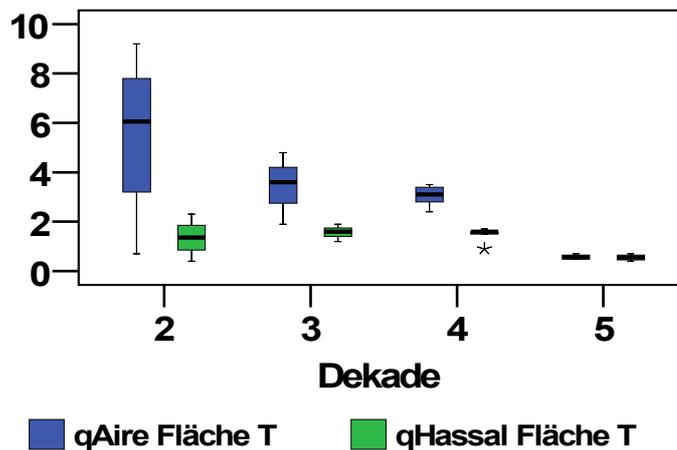
So zeigten Präparate mit vielen AIRE+ -Zellen auch viele Hassall-Körperchen und Präparate mit einer geringen Anzahl an AIRE+ -Zellen auch eine geringe Anzahl an Hassall-Körperchen. Dabei näherten sich im Alter die Werte der AIRE+ -Zellen denen der Hassall-Körperchen an.

Abb. 15 verdeutlicht auch einzelne Ausnahmen von dieser Regel: die Versuchspersonen eins, neun und dreizehn wiesen bezogen auf die Anzahl der Hassall-Körperchen auffallend viele AIRE+ -Zellen pro Fläche auf, während die Versuchspersonen sieben und achtundzwanzig mehr Hassall-Körperchen als AIRE+ -Zellen aufwiesen.

Bei den Versuchspersonen zweiundzwanzig bis vierundzwanzig waren sowohl die Werte für Hassall-Körperchen als auch die Werte für AIRE+ -Zellen sehr gering.

### 3.4.2 Thymitis

Bei der Zusammenfassung der Ergebnisse der Thymitis-Fälle war in den Dekaden zwei bis vier wie bei den Normalthymi die Anzahl der AIRE+ -Zellen größer als die der Hassall-Körperchen, während sich in der Dekade fünf nur geringe Unterschiede zwischen diesen beiden Parametern fanden (Abbildung 16).

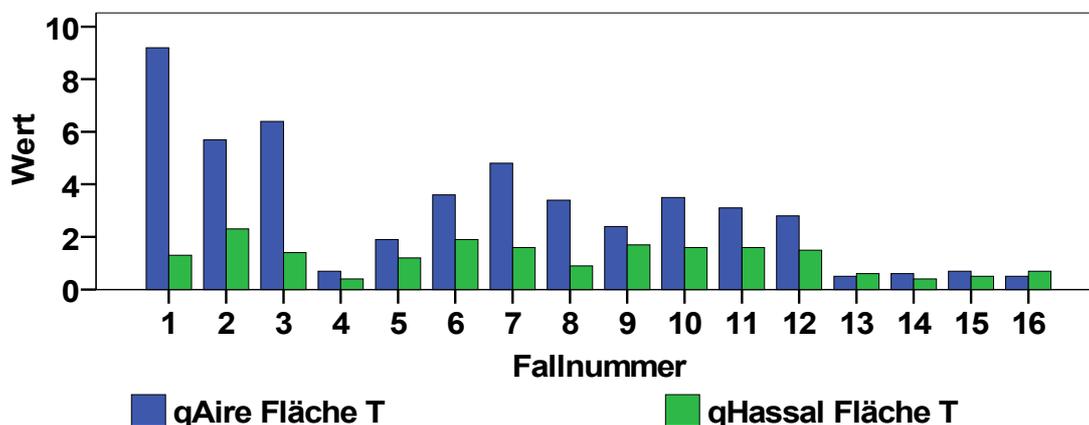


**Abb.16:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche T) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche T) in Dekaden bei Thymitis

Wie bei den Normalthymi fand sich auch bei der Thymitis im Alter eine Annäherung beider Werte gegen Null.

## Ergebnisse

Bei der Darstellung der Einzelwerte in Abbildung 17 wiesen die Versuchspersonen eins und drei eine hohe Anzahl an AIRE+ -Zellen im Verhältnis zur Anzahl der Hassall-Körperchen auf.



**Abb.17:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche T) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (= qHassal Fläche T) der einzelnen Versuchspersonen bei Thymitis. Fallnummer 1-4 aus Dekade 2, 5-7 aus Dekade 3, 8-12 aus Dekade 4, 13-16 aus Dekade 5.

Die Versuchspersonen 13 und 16 zeigten geringfügig mehr Hassall-Körperchen als AIRE+ -Zellen.

### 3.4.3 Vergleich zwischen Thymitis-Präparaten mit Normalthymus-Präparaten

Im Vergleich der Thymitis-Präparate mit den Normalthymus-Präparaten fand sich kein signifikanter Unterschied für die Thymusfläche (Mann-Whitney-U=47,0,  $p=0,169$ ), die Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (Mann-Whitney-U=52,5,  $p=0,490$ ) und die Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (Mann-Whitney-U=57,0,  $p=0,697$ ).

### 3.5 AIRE-Hassall-Korrelation am Beispiel von B1-Thymomen

In B1-Thymomen fanden sich Areale, in denen weder Hassall-Körperchen, noch AIRE+ -Zellen zu sehen waren (H-A-), Areale, in denen AIRE+ -Zellen ohne Hassall-Körperchen zu sehen waren (H-A+), Areale, in denen Hassall-Körperchen, aber keine AIRE+ -Zellen zu sehen waren (H+A-) und Areale, in denen Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen zu sehen waren (H+A+). Im Chi-Quadrat-Test wurde getestet, ob die beschriebenen Kombinationen in signifikant unterschiedlichen Häufigkeiten auftraten. Dazu wurden Summenwerte der Felder-Anzahlen über alle Versuchspersonen hinweg für alle vier möglichen Kombinationen gebildet und diesen prozentuale Häufigkeiten zugeteilt (siehe Tabelle 2). Es wurde errechnet, dass Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen signifikant häufiger zusammen auftraten (n= 343, 91%) als Hassall-Körperchen allein auftraten (n=222, 64,3%) ( $p < 0,01$ ) (siehe Tabelle 2).

Der Test sagte auch aus, dass Areale mit AIRE+ -Zellen ohne Hassall-Körperchen signifikant seltener auftraten (n=34, 9%), als Areale, in denen weder AIRE+ -Zellen noch Hassall-Körperchen zu sehen waren (n=123, 35,7%).

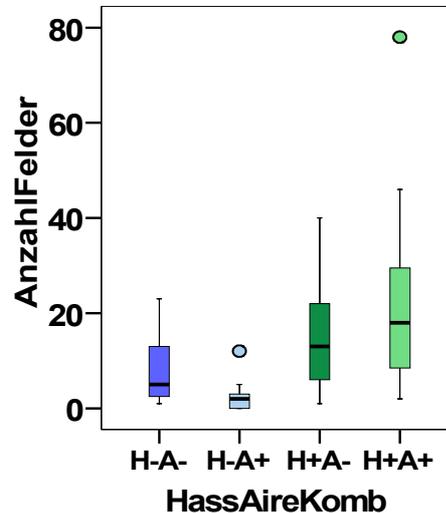
			H		Gesamt
			Negativ	positiv	negativ
A	negativ	Anzahl	123	222	345
		% von AIRE	35,7%	64,3%	100,0%
	positiv	Anzahl	34	343	377
		% von AIRE	9,0%	91,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	157	565	722
		% von AIRE	21,7%	78,3%	100,0%

**Tab. 2:** A: AIRE, A negativ: in diesen Feldern waren keine AIRE+ -Zellen zu sehen, A positiv: in diesen Feldern waren AIRE+ -Zellen zu sehen, H: Hassall-Körperchen, H negativ: in diesen Feldern waren keine Hassall-Körperchen zu sehen, H positiv: in diesen Feldern waren Hassall-Körperchen sichtbar

Auch bei der Verrechnung der einzelnen Werte der vier möglichen Kombinationen über alle Versuchspersonen hinweg in Mittelwert, 25%- und

## Ergebnisse

75%-Quartile und Standardabweichung und bei der Darstellung dieser im Box-Whisker-Plot wurde das unterschiedliche Vorkommen der Kombinationen erkennbar.

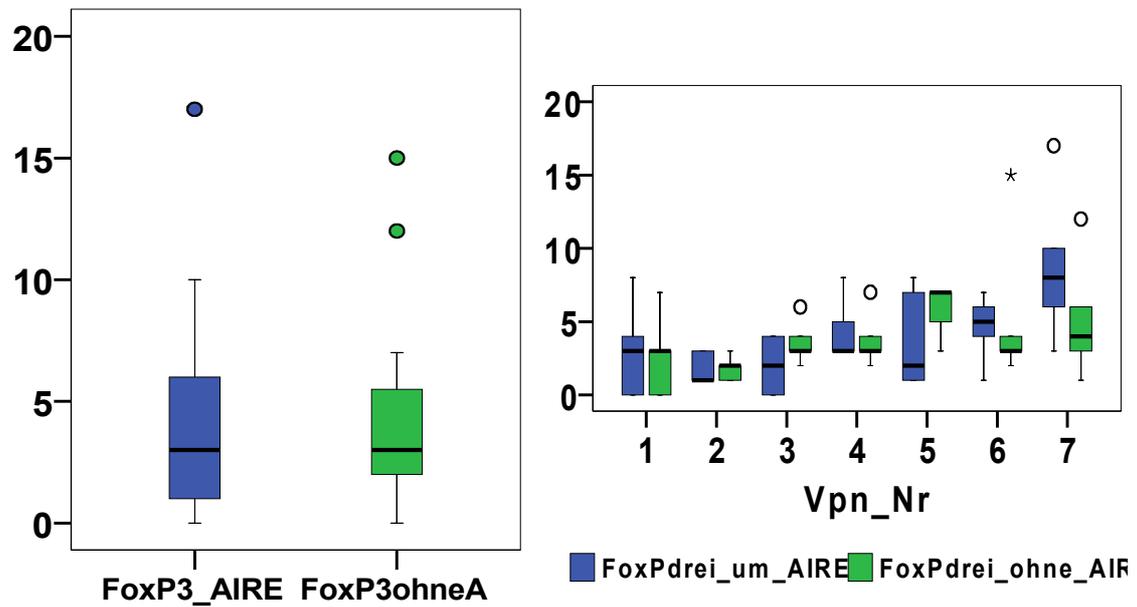


**Abb.18:** Kombinationen des Auftretens von Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen (HassAireKomb), H-: Felder ohne Hassall-Körperchen, H+: Felder mit Hassall-Körperchen, A-: Felder ohne AIRE+ -Zellen, A+: Felder mit AIRE+ -Zellen

In Abbildung 18 ist sichtbar, was bereits im Chi-Quadrat-Test signifikant wurde: es gab mehr Felder mit Hassall-Körperchen und mit AIRE+ Zellen als mit Hassall-Körperchen ohne AIRE+ Zellen. Ebenso wird deutlich, dass AIRE+ Zellen selten ohne Hassall-Körperchen auftraten, Felder ohne Hassall-Körperchen und ohne AIRE+ -Zellen hingegen schon eher vorkommen

### **3.6 Überprüfung des örtlichen Zusammenhangs zwischen der Expression von Foxp3+ und AIRE**

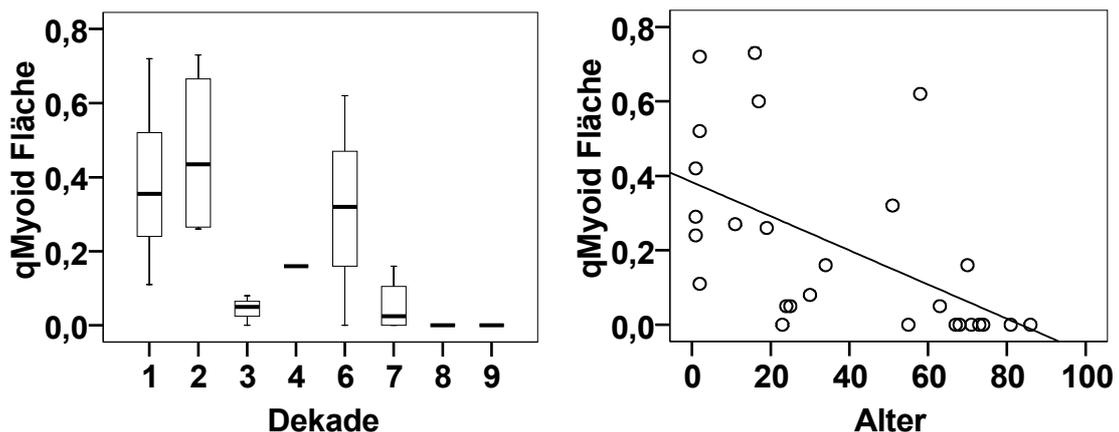
Eine vermehrte Expression von Foxp3+ -Zellen in unmittelbarer Nähe zu AIRE+ -Zellen ließ sich in der vorliegenden Untersuchung nicht nachweisen. Über alle Präparate und alle Versuchspersonen hinweg ergab sich kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U = 606,5,  $p = 0,943$ ) zwischen der Anzahl der Foxp3+ -Zellen, die in definierter Nähe zu AIRE+ -Zellen beobachtet wurden und der Anzahl der Foxp3+ -Zellen, die ohne räumliche Beziehung zu AIRE+ -Zellen vorkamen (siehe Abbildung 19 links). Bei der Auswertung der einzelnen Präparate jeder Versuchsperson (siehe Abbildung 19 rechts) zeigte sich für die meisten Versuchspersonen kein deutlicher Unterschied in der Anzahl der Foxp3+ -Zellen, die um AIRE+ -Zellen exprimiert wurden, und solchen, die nicht um AIRE+ -Zellen exprimiert wurden. Die Versuchspersonen 3 und 5 zeigten bei der Anzahl der Foxp3+ Zellen, die um AIRE+ -Zellen exprimiert wurden eine geringfügig größere Streuung der Daten, Versuchsperson 5 exprimierte im Mittelwert mehr Foxp3+ -Zellen ohne Nähe zu AIRE, während sich bei Versuchsperson 7 die Situation genau entgegengesetzt verhielt.



**Abb. 19** rechts: Anzahl der Foxp3+ -Zellen um AIRE+ -Zellen (FoxPdrei\_um\_AIRE) und Anzahl der Foxp3+ -Zellen ohne örtliche Nähe zu AIRE+ -Zellen (FoxPdrei\_ohne\_AIRE) für die einzelnen Versuchspersonen, links: Anzahl der Foxp3+ -Zellen in unmittelbarer Nähe zu AIRE+ -Zellen (FoxP3\_AIRE) und Anzahl der Foxp3+ -Zellen ohne örtliche Nähe zu AIRE+ -Zellen (FoxP3ohneA) über alle Versuchspersonen hinweg

### 3.7 Altersabhängige Abnahme der Anzahl der Myoidzellen

Wie unter 2.1. ausgeführt, standen für die Auswertung von Myoidzellen Normalthymus-Präparate und zwei Thymitis-Präparate zur Verfügung. In der fünften Dekade stand keine Versuchsperson zur Verfügung. Die Ergebnisse der Auswertung von Thymusfläche und Hassall-Körperchen pro Fläche Normalthymus lassen sich in der Auswertung der Myoidzellen pro Fläche in Abbildung 20 links wiederfinden. So lässt sich eine große Streubreite in den ersten beiden Dekaden, ein Einzelwert in der vierten Dekade und ein Ausreißerwert in der sechsten Dekade beschreiben. Die Daten in der dritten Dekade und in den Dekaden sieben bis neun wichen innerhalb der jeweiligen Dekaden wenig voneinander ab

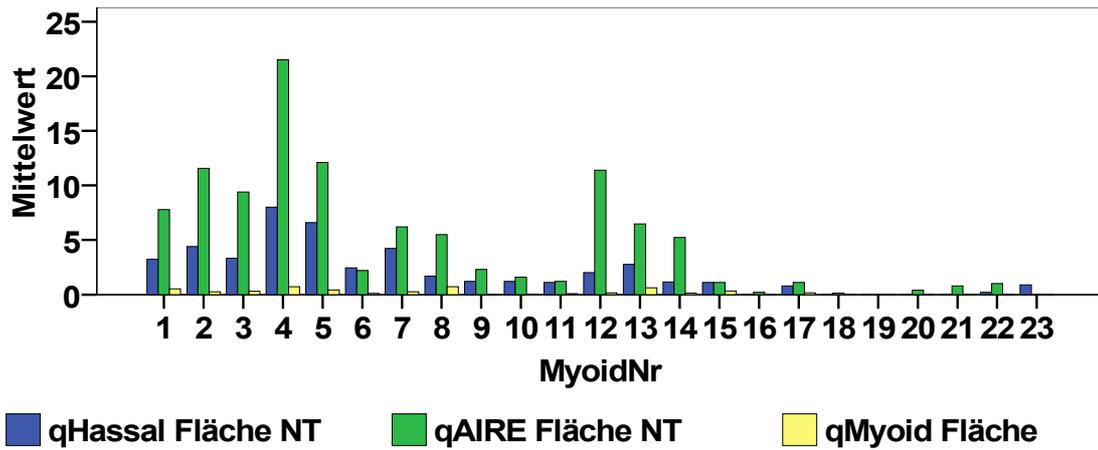


**Abb. 20** links: Abnahme der Anzahl der Myoidzellen pro Fläche in Dekaden, rechts: Zusammenhang zwischen Myoidzellen pro Fläche (qMyoid Fläche) und Alter

Wie in Graphik 20 rechts sichtbar ist, zeigte sich eine Abnahme der Myoidzellen pro Fläche mit zunehmendem Alter (Spearman Rho  $r=-0,697$ ,  $p<0,00$ ).

Im Vergleich der Daten der Myoidzellen mit AIRE+ -Zellen und Hassallschen Körpern wird in Abbildung 21 dargestellt, dass die Anzahl der Myoidzellen jeweils geringer war als die Anzahl von AIRE+ -Zellen oder Hassallschen Körpern.

## Ergebnisse



**Abb.21:** Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (qHassal Fläche NT), der AIRE+ -Zellen pro Fläche (qAIRE Fläche NT) und der Myoidzellen pro Fläche (qMyoid Fläche) bei Normalthymi im Vergleich.

Unter Kontrollierung des Faktors Alters ergab sich eine partielle Korrelation zwischen Myoidzellen pro Fläche und AIRE+ -Zellen pro Fläche von 0,498 ( $p=0,011$ ). Zwischen Myoidzellen pro Fläche und Hassall-Körperchen pro Fläche konnte eine partielle Korrelation von 0,470 ( $p=0,018$ ) errechnet werden.

## 4 Diskussion

Bei der mikroskopischen Untersuchung der immunhistochemisch angefärbten AIRE<sup>+</sup>-Zellen in Thymuspräparaten über verschiedene Altersstufen hinweg sollten Informationen über die Rolle des Autoimmunregulators AIRE im alternden Thymus gewonnen werden. AIRE steuert die ektopische Expression organspezifischer Selbstantigene in medullären Thymusepithelzellen, die den sich entwickelnden T-Zellen präsentiert werden und spielt eine wichtige Rolle bei der negativen Selektion und damit dem Schutz vor Autoimmunität. Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die relative Zahl der AIRE<sup>+</sup>-Zellen bezogen auf die Fläche im humanen Thymus mit dem Lebensalter ändert. Hierfür wurde zunächst die Fläche der untersuchten Thymi in verschiedenen Altersgruppen quantitativ morphometrisch erfasst und mit der Anzahl der AIRE<sup>+</sup>-Zellen in Verhältnis gesetzt.

Die Thymusfläche sowie auch die Anzahl AIRE<sup>+</sup>-Zellen nahmen mit steigendem Alter ab, letztere waren aber auch in hohem Alter vereinzelt noch nachweisbar. Interessanterweise zeigte die Zahl AIRE<sup>+</sup>-Zellen pro Fläche eine deutlich stärkere Korrelation mit dem Alter als die Thymusfläche allein. Ebenso fiel auf, dass die Streubreiten der Werte für Thymusfläche in den meisten Altersdekaden größer waren als die Streubreiten der Werte von AIRE<sup>+</sup>-Zellen. Die Anzahl der AIRE<sup>+</sup>-Zellen ist damit offenbar weniger durch ausgeprägten interindividuelle Schwankungen beeinflusst als die Thymusfläche. Funktionell ließe sich dieser Befund dahingehend interpretieren, dass AIRE im Rahmen des Involutionsprozesses ein stark regulierter Faktor ist. Die Involution des Thymus ist wenig erforscht. Nach einer aktuellen Übersichtsarbeit (Hakim & Gress, 2007) spielen dabei sowohl hormonelle Einflüsse als auch Interaktionen zwischen Thymusepithelzellen und Thymozyten eine Rolle. So kam es in einem Mausmodell unter Einfluss von GH und IGF-1, das auch in Thymusepithelzellen produziert wird, zu einer Zunahme von Thymusepithelzellen und naiven T-Zellen. Die Anwesenheit von IGF-1 förderte eine verstärkte Bildung von Thymusepithelzellen wie auch eine verstärkte Adhäsion zwischen T-Zell-Rezeptor und Thymusepithelzelle. Die abnehmenden Spiegel von GH und IGF-

1 im Alter könnten dementsprechend zu einer Abnahme von Thymusepithelzellen und naiven T-Zellen und zu einer verminderten Adhäsion zwischen T-Zellen und Thymusepithelzellen beitragen. Auch Steroidhormone könnten an der Abnahme von Thymusepithelzellen im Alter beteiligt sein. So führt eine Kastration oder eine Entfernung der Ovarien im Mausmodell zu einer Zunahme des Thymusepithelgewebes und der peripheren T-Zell-Population. Die Gabe von Sexualhormonen dagegen führt zu einer verstärkten Thymusinvolution. Allerdings müssen noch zusätzliche Faktoren gegeben sein, da hypogonadale Mäuse oder Mäuse mit verminderter GH-Produktion keine Verzögerung der Thymusinvolution zeigten (Hakim & Gress, 2007).

Die enge Wechselwirkung zwischen Thymozyten und Thymusepithelzellen bietet ebenfalls interessante Ansatzpunkte. So produzieren Thymusepithelzellen IL7, das für die T-Zell-Reifung benötigt wird. Die altersbedingt reduzierte Anzahl an Thymusepithelzellen kann dadurch zu einer verminderten Produktion von T-Zellen führen. Andererseits fördern bestimmte Botenstoffe der Thymozyten eine Zunahme der Anzahl der Thymusepithelzellen. Einfach und doppelt positive Thymozyten, deren Zahl im Alter abnimmt, produzieren KGF (keratinocyte growth factor), unter dessen Behandlung es bei erwachsenen Mäusen zur Expansion von Thymusepithelzellen kommt (Hakim & Gress, 2007).

Im Unterschied zu der offenbar wichtigen Rolle von AIRE im Prozess der physiologischen Involution ergab sich kein Hinweis auf eine Beteiligung bei der Entstehung der Myasthenia gravis. Die Anzahl der AIRE<sup>+</sup>-Zellen in Thymuspräparaten von Patienten mit Myasthenia gravis (Thymitis) unterschied sich nicht signifikant von der Zahl in Normalthymus-Präparaten. Die Entzündungskomponente hatte also keinen erheblichen Einfluss auf die Regulation der AIRE-Expression in medullären Thymusepithelzellen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, aufgrund morphometrischer Messungen Rückschlüsse über Regulationsmechanismen und Funktion von AIRE<sup>+</sup> Zellen zu erhalten, speziell untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang

zwischen der Lokalisation von AIRE+ -Zellen in Bezug auf Hassall-Körperchen, regulatorische T-Zellen und Myoidzellen. Hierfür wurde die Anzahl der AIRE+ Zellen in räumlicher Beziehung zu Hassall-Körperchen in verschiedenen Alterstufen quantifiziert. Die Ko-Lokalisation von AIRE+ -Zellen und Hassall-Körperchen war besonders bei der Untersuchung der Typ B1 Thymome von Interesse, da die hoch-organisierten Tumoren als einziger bekannter Thymom-Subtyp medulläre Areale, Hassall-Körperchen und AIRE+ Zellen aufweisen. Außerdem sollte durch die Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen in räumlicher Beziehung zu AIRE+ -Zellen geprüft werden, ob AIRE eine Rolle in der Generierung antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen spielt (Aschenbrenner et al.).

Auch die Zahl von Hassall-Körperchen war signifikant mit dem Alter korreliert und nahm mit dem Alter ab. Auf den ersten Blick steht dieses Ergebnis im Kontrast zur Beobachtung von Ströbel und Moritz, die keine wesentliche Veränderung in der Anzahl von Hassall-Körperchen pro medulläre Thymusfläche über verschiedene Altersstufen hinweg fanden. In der vorliegenden Untersuchung wurde nicht nach medullärem und kortikalem Anteil differenziert. Wenn nur die Dekaden 2 bis 5 der Normalthymus-Präparate betrachtet wurden, fand in dieser Zeitspanne kein signifikanter Abfall von Hassall-Körperchen mit steigendem Alter statt. Dieser Befund passt zu der von Ströbel und Moritz geschilderten Beobachtung einer fehlenden Abnahme von Hassall-Körperchen pro Fläche bei steigendem Alter (Strobel, et al., 2008), da sich ab der zweiten Dekade der Anteil der thymusspezifischen Epithelzellen zugunsten der Medulla verschiebt. Was den Abfall der Hassall-Körperchen pro Fläche der Thymitis-Fälle betrifft, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer kleineren Stichprobe von n= 16 gerechnet, während Ströbel und Moritz eine Anzahl n von 129 zur Verfügung hatten.

Ein wesentliches Ergebnis war der räumliche Zusammenhang zwischen AIRE+ -Zellen und Hassall-Körperchen in Normalthymi. Interessanterweise war dieser Zusammenhang signifikant stärker bei Normalthymus-Präparaten ausgeprägt war als bei Thymitis-Präparaten. Dies könnte durch eine Beeinträchtigung der

regulären Thymusarchitektur durch die Entzündungskomponente zu erklären sein.

Als besonders aufschlussreich erwies sich auch die Untersuchung eines speziellen Thymom-Typs (B1 Thymom). Diese Tumoren zeichnen sich durch eine weitgehend erhaltene cortico-medulläre Gliederung aus. Die medullären Areale in manchen B1 Thymomen können Hassall-Körperchen enthalten. Daneben sind B1 Thymome die einzigen Thymom-Subtypen, in denen AIRE<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen wurden (Ströbel et al. 2007). In B1 Thymomen fand sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis AIRE<sup>+</sup> Zellen und Hassall-Körperchen. Dies bedeutet, dass (zumindest beim Menschen) für die Expression von AIRE eine intakte medulläre Thymusarchitektur mit Ausbildung von Hassall-Körperchen vorhanden sein muss.

Bei der Suche nach einem Erklärungsmodell für den räumlichen Zusammenhang zwischen AIRE und Hassall-Körperchen soll auf die in der aktuellen Literatur beschriebenen Eigenschaften von Hassall-Körperchen eingegangen werden. Hassall-Körperchen sind zur Produktion von thymic stromal lymphopoietin = TSLP befähigt. Dieses Zytokin induziert die Bildung dendritischer Zellen, die wahrscheinlich für die effektive Präsentation von Selbstantigenen sehr bedeutsam sind: sie übernehmen organspezifische Selbstantigene von apoptotischen AIRE<sup>+</sup> medullären Thymusepithelzellen, die anschließend über „cross-presentation“ den reifenden T-Zellen präsentiert werden (Gallegos & Bevan, 2004, Mathis & Benoit, ARI 2009). Eine direkte Funktion von AIRE in der Induktion antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen besteht jedoch entgegen ursprünglicher Annahmen (Watanabe, et al., 2005) offenbar nicht. Diese komplexen Vorgänge könnten die Notwendigkeit eines örtlichen Zusammenhangs zwischen Hassall-Körperchen und AIRE<sup>+</sup> -Zellen über das Bindeglied der dendritischen Zellen, die mit beiden in Kontakt stehen, erklären.

Der örtliche Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und AIRE wurde mittels Immunfluoreszenz und confokaler Laser-Scanning Mikroskopie untersucht. Die Ergebnisse ergaben keine signifikant erhöhte Anzahl von regulatorischen Foxp3<sup>+</sup> CD45 RA T-Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu

AIRE+ -Zellen. AIRE scheint in-vivo nicht zu einer zahlenmäßigen Expansion von regulatorischen T-Zellen zu führen. Da auch dendritische Zellen bei der Differenzierung von hochaffinen T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen mitwirken (Gallegos & Bevan, 2004), ist die Frage, ob regulatorische Zellen vermehrt in der Nähe von dendritischen Zellen zu finden sind, interessant. AIRE+ Zellen könnten eine indirekte Rolle spielen und, wie oben erwähnt, für die Mehrzahl der antigenspezifischen regulatorischen T-Zellen als Reservoir für organspezifische Antigene dienen, die aber effektiv durch dendritische Zellen präsentiert werden würden.

Myoidzellen sind einzigartige, nur im Thymus vorkommende Zellen, die quergestreifte Muskulatur enthalten. Myoidzellen im Thymus wurden vor allem mit der Pathogenese der Myasthenia gravis in Zusammenhang gebracht. Nach einem aktuellen Konzept werden lokal im Thymus Antikörper gegen Untereinheiten des Acetylcholin-Rezeptors auf Myoidzellen produziert, die später in peripheren Muskeln zum klinischen Bild der Myasthenie führen (Leite, et al., 2007). Die Anzahl der Myoidzellen nahm bei steigendem Alter signifikant ab. Die Auswertung lässt eine gewisse Ähnlichkeit mit der Auswertung von Thymusfläche und den Hassall-Körperchen erkennen. In den ersten beiden Dekaden war eine große Streubreite vorhanden, während diese in den letzten Dekaden abnahm. Möglicherweise stehen die Myoidzellen in Wechselwirkung mit Thymozyten oder analog zu den Thymusepithelzellen unter dem Einfluss hormoneller Faktoren. Bezüglich der Pathogenese der Myasthenie war von Interesse, dass vor dem 40. Lebensjahr mehr Myoidzellen im Thymus vorkommen als nach dem 40. Lebensjahr. Da aber der größere Anteil der seropositiven Myasthenie Patienten erst nach dem 40. Lebensjahr erkrankt, bleibt offen, ob die Zahl an Myoidzellen einen kritischen Faktor darstellt. Der Thymus bei der sogenannten late onset Myasthenie (LOMG) nach dem 40. Lebensjahr unterscheidet sich vom Thymus bei early onset Myasthenie (EOMG) vor dem 40. Lebensjahr vor allem durch das Fehlen von Keimzentren („Thymitis“). Da es bei der EOMG zu einer aktiven komplementvermittelten Attackierung von (zu diesem Zeitpunkt noch zahlreichen) Myoidzellen kommt, die bei LOMG offenbar fehlt, wäre zu spekulieren, dass die Zahl an Myoidzellen

## Diskussion

---

einen protektiven Faktor darstellt und dass möglicherweise bei der Pathogenese der LOMG ein kritischer Schwellenwert unterschritten wird.

## 5 Zusammenfassung

Die Entdeckung der Autoimmunkrankheit APECED führte zur Entdeckung des verantwortlichen Gens *AIRE* (*autoimmune regulator*), das einen Einblick in die Verhinderung oder Entstehung von Autoreaktivität im Thymus bietet. Durch Aktivierung des *AIRE*-Gens und Expression des AIRE-Proteins werden organspezifische Selbstantigene in medullären Thymusepithelzellen exprimiert und entweder direkt oder nach Transfer auf dendritische Zellen unreifen T-Zellen präsentiert. Durch Elimination autoreaktiver Zellen entsteht Toleranz gegenüber den körpereigenen Geweben. Da das Immunsystem bei steigendem Alter tiefgreifende Veränderungen erfährt, die zum Teil durch die Thymusinvolution bedingt sind, ist es von Interesse, den Verlauf von AIRE über verschiedene Altersstufen hinweg zu untersuchen. Zielsetzungen dieser Arbeit waren daher die quantitative und räumliche Untersuchung der AIRE<sup>+</sup>-Zellen im Alter und im Kontext einer prototypischen organspezifischen Autoimmunerkrankung, der Myasthenia gravis. Diese Fragestellungen wurden bei Normalthymy, entzündlich veränderten Thymy mit assoziierter Myasthenie und an B1-Thymomen untersucht. Als Ergebnis konnte erarbeitet werden, dass der Gehalt an AIRE<sup>+</sup>-Zellen mit dem Alter abnimmt, wobei bis in die neunte Lebensdekade noch AIRE<sup>+</sup>-Zellen vorhanden waren. Der Gehalt an AIRE<sup>+</sup>-Zellen stellte sich als stärker mit dem Lebensalter korreliert dar als beispielsweise die Thymusfläche. AIRE scheint damit ein mit der Thymusinvolution eng assoziiertes Gen zu sein. Es fand sich eine hochsignifikante Co-Lokalisation von AIRE<sup>+</sup>-Zellen und Hassall-Körperchen, die besonders durch die Untersuchungen von Typ B1 Thymomen mit und ohne Hassall-Körperchen bestätigt werden konnte. In Übereinstimmung mit aktuellen Forschungsergebnissen in Mausmodellen fand sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl oder der räumlichen Anordnung regulatorischer T-Zellen und AIRE<sup>+</sup>-Zellen. Myoidzellen nahmen mit zunehmendem Alter ebenfalls ab. Ihre Rolle in der Entstehung der Myasthenie ist bei Patienten mit early und late onset wahrscheinlich unterschiedlich; die abnehmende Zahl an Myoidzellen stellt möglicherweise vor allem bei Patienten mit late onset einen Risikofaktor dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298(5597), 1395-1401.
- Aschenbrenner, K., D'Cruz, L. M., Vollmann, E. H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L. K., et al. (2007). Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*, 8(4), 351-358.
- Aspinall, R., & Andrew, D. (2000). Immunosenescence: potential causes and strategies for reversal. *Biochem Soc Trans*, 28(2), 250-254.
- Campbell, D. J., & Ziegler, S. F. (2007). FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 7(4), 305-310.
- de Mello Coelho, V., Villa-Verde, D. M., Farias-de-Oliveira, D. A., de Brito, J. M., Dardenne, M., & Savino, W. (2002). Functional insulin-like growth factor-1/insulin-like growth factor-1 receptor-mediated circuit in human and murine thymic epithelial cells. *Neuroendocrinology*, 75(2), 139-150.
- Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., et al. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 396(6712), 690-695.
- Erickson, M., Morkowski, S., Lehar, S., Gillard, G., Beers, C., Dooley, J., et al. (2002). Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood*, 100(9), 3269-3278.
- Gallegos, A. M., & Bevan, M. J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med*, 200(8), 1039-1049.
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2001). Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. *Trends Immunol*, 22(5), 251-255.
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2003). Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 5(5), 225-234.
- Gotter, J., & Kyewski, B. (2004). Regulating self-tolerance by deregulating gene expression. *Curr Opin Immunol*, 16(6), 741-745.
- Greenstein, B. D., Fitzpatrick, F. T., Adcock, I. M., Kendall, M. D., & Wheeler, M. J. (1986). Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. *J Endocrinol*, 110(3), 417-422.
- Hakim, F. T., & Gress, R. E. (2007). Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens*, 70(3), 179-189.
- Hermiston, M. L., Xu, Z., & Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 107-137.
- Inoue, M., Starostik, P., Zettl, A., Strobel, P., Schwarz, S., Scaravilli, F., et al. (2003). Correlating genetic aberrations with World Health Organization-defined

histology and stage across the spectrum of thymomas. *Cancer Res*, 63(13), 3708-3715.

Jenkinson, W. E., Jenkinson, E. J., & Anderson, G. (2003). Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J Exp Med*, 198(2), 325-332.

Laeng, R. H., Eimoto, T., Kuo, T. T., Zettl, A., Marx, A., Moschopoulos, M., et al. (2006). Corpuscular thymoma: entity or variant of organotypical thymomas WHO B2/B3? *Pathol Res Pract*, 202(10), 697-704.

Le Panse, R., & Berrih-Aknin, S. (2005). Thymic myoid cells protect thymocytes from apoptosis and modulate their differentiation: implication of the ERK and Akt signaling pathways. *Cell Death Differ*, 12(5), 463-472.

Leite, M. I., Jones, M., Strobel, P., Marx, A., Gold, R., Niks, E., et al. (2007). Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol*, 171(3), 893-905.

Leposavic, G., Obradovic, S., Kosec, D., Pejic-Karapetrovic, B., & Vidic-Dankovic, B. (2001). In vivo modulation of the distribution of thymocyte subsets by female sex steroid hormones. *Int Immunopharmacol*, 1(1), 1-12.

Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., & Goodnow, C. C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 350-354.

Love, P. E., & Chan, A. C. (2003). Regulation of thymocyte development: only the meek survive. *Curr Opin Immunol*, 15(2), 199-203.

Luciani, F., Valensin, S., Vescovini, R., Sansoni, P., Fagnoni, F., Franceschi, C., et al. (2001). A stochastic model for CD8(+)T cell dynamics in human immunosenescence: implications for survival and longevity. *J Theor Biol*, 213(4), 587-597.

Marino, M., & Muller-Hermelink, H. K. (1985). Thymoma and thymic carcinoma. Relation of thymoma epithelial cells to the cortical and medullary differentiation of thymus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 407(2), 119-149.

Mathis, D., & Benoist, C. (2004). Back to central tolerance. *Immunity*, 20(5), 509-516.

Mathis, D., & Benoist, C. (2007). A decade of AIRE. *Nat Rev Immunol*, 7(8), 645-650.

Meriluoto, T., Halonen, M., Pelto-Huikko, M., Kangas, H., Korhonen, J., Kolmer, M., et al. (2001). The autoimmune regulator: a key toward understanding the molecular pathogenesis of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Keio J Med*, 50(4), 225-239.

Min, H., Montecino-Rodriguez, E., & Dorshkind, K. (2006). Reassessing the role of growth hormone and sex steroids in thymic involution. *Clin Immunol*, 118(1), 117-123.

- Montecino-Rodriguez, E., Clark, R., & Dorshkind, K. (1998). Effects of insulin-like growth factor administration and bone marrow transplantation on thymopoiesis in aged mice. *Endocrinology*, *139*(10), 4120-4126.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., et al. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet*, *17*(4), 393-398.
- Napolitano, L. A., Lo, J. C., Gotway, M. B., Mulligan, K., Barbour, J. D., Schmidt, D., et al. (2002). Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS*, *16*(8), 1103-1111.
- Ohashi, P. S. (2003). Negative selection and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, *15*(6), 668-676.
- Pawelec, G., Barnett, Y., Forsey, R., Frasca, D., Globerson, A., McLeod, J., et al. (2002). T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci*, *7*, d1056-1183.
- Pawelec, G., & Larbi, A. (2008). Immunity and ageing in man: Annual Review 2006/2007. *Exp Gerontol*, *43*(1), 34-38.
- Peterson, P., & Peltonen, L. (2005). Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *J Autoimmun*, *25 Suppl*, 49-55.
- Rossi, S. W., Jeker, L. T., Ueno, T., Kuse, S., Keller, M. P., Zuklys, S., et al. (2007). Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood*, *109*(9), 3803-3811.
- Scarpino, S., Di Napoli, A., Stoppacciaro, A., Antonelli, M., Pillozzi, E., Chiarle, R., et al. (2007). Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol*, *149*(3), 504-512.
- Steinmann, G. G., Klaus, B., & Muller-Hermelink, H. K. (1985). The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol*, *22*(5), 563-575.
- Strobel, P., Marx, A., Zettl, A., & Muller-Hermelink, H. K. (2005). Thymoma and thymic carcinoma: an update of the WHO Classification 2004. *Surg Today*, *35*(10), 805-811.
- Strobel, P., Moritz, R., Leite, M. I., Willcox, N., Chuang, W. Y., Gold, R., et al. (2008). The ageing and myasthenic thymus: a morphometric study validating a standard procedure in the histological workup of thymic specimens. *J Neuroimmunol*, *201-202*, 64-73.
- Strobel, P., Murumagi, A., Klein, R., Luster, M., Lahti, M., Krohn, K., et al. (2007). Deficiency of the autoimmune regulator AIRE in thymomas is insufficient to elicit autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS-1). *J Pathol*, *211*(5), 563-571.
- Strobel, P., Rosenwald, A., Beyersdorf, N., Kerkau, T., Elert, O., Murumagi, A., et al. (2004). Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol*, *56*(6), 901-904.

- Su, M. A., & Anderson, M. S. (2004). Aire: an update. *Curr Opin Immunol*, 16(6), 746-752.
- Wang, J., & Xing, F. (2008). Human TSLP-educated DCs. *Cell Mol Immunol*, 5(2), 99-106.
- Watanabe, N., Hanabuchi, S., Soumelis, V., Yuan, W., Ho, S., de Waal Malefyt, R., et al. (2004). Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*, 5(4), 426-434.
- Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Cao, W., & Liu, Y. J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 436(7054), 1181-1185.
- Windmill, K. F., & Lee, V. W. (1998). Effects of castration on the lymphocytes of the thymus, spleen and lymph nodes. *Tissue Cell*, 30(1), 104-111.
- Ziegler, S. F., & Liu, Y. J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat Immunol*, 7(7), 709-714.
- Zuklys, S., Balciunaite, G., Agarwal, A., Fasler-Kan, E., Palmer, E., & Hollander, G. A. (2000). Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol*, 165(4), 1976-1983.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AADC: Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase

ACh – Rezeptor: Acetylcholin-Rezeptor

AIRE: **A**utoimmun**r**egulator

AIRE+ -Zellen: Zellen mit Expression von Autoimmunregulator

APECED: Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy

CD: Cluster of differentiation

CYP: Cytochrom P

EOMG: Early onset myasthenia gravis

FOXP3: Forkhead box P3

GAD: Glutamic acid decarboxylase

GH: Growth hormone

ICA: Islet cytoplasmatic antibodies, pankreatische zytoplasmatische Inselantikörper

IDDM: Insulin dependent diabetes mellitus

IGF: Insulin-like growth factor

IL: Interleukin

LOMG: Late onset myasthenia gravis

NT: Normalthymus

T: Thymitis

TSLP: Thymic stromal lymphopoietin

---

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

**Abb. 1:** Co-Expression von AIRE mit zwei Selbst-Antigenen, Thyreoglobulin und der Cytochrom-Oxidase p450c17 (Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten, Bilder zur Verfügung gestellt von Prof. Philipp Ströbel (Thyreoglobulin) und Prof. Pärt Peterson (p450c17) 5

**Abb. 2:** AIRE positive medulläre Thymusepithelzelle (Immunfluoreszenz Blau: AIRE, Grün: pan-Cytokeratin) (Bild zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. Ströbel, Mannheim) 6

**Abb. 3:** Histologie eines Typ B1Thymoms (links) mit charakteristischer „organoider“ Gliederung in kortikale (untere Bildhälte) und medulläre Areale (obere Bildhälte). In dem medullären Areal Nachweis eines Hassall-Körperchen. Rechtes Bild: immunhistochemische Darstellung AIRE-positiver medullärer Epithelzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Hassall-Körperchen (Immunperoxidase am Paraffin-Schnitt). 8

**Abb. 4:** Immunhistochemische Darstellung AIRE-positiver medullärer Epithelzellen und Ausbildung des Oberflächenmarkers FoxP3+ der regulatorischen T-Zellen ( freundlicherweise von Prof. P. Ströbel zur Verfügung gestellt) 10

**Abb. 5:** Immunhistochemische Darstellung von Myoidzellen im menschlichen Thymus mit einem Antikörper gegen Desmin (Peroxidase am Paraffinschnitt) 11

**Abb. 6:** Abnahme der Thymusfläche in Dekaden bei Normalthymi, rechts: Zusammenhang zwischen der Thymusfläche und dem Alter bei Normalthymi 18

**Abb. 7:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) in Dekaden bei Normalthymi, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (= qAIRE Fläche NT) und dem Alter bei Normalthymi 19

**Abb. 8:** Abnahme der Thymusfläche in Dekaden bei Thymitis, rechts: Zusammenhang zwischen der Thymusfläche und dem Alter der Patienten mit Thymitis 20

**Abb. 9** links: Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche NT}$ ) in Dekaden, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche NT}$ ) und Alter 21

**Abb. 10** links: Abnahme der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche NT}$ ) in Dekaden bei Normalthymi, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche NT}$ ) und dem Alter bei Normalthymi 22

**Abb. 11** links: Abnahme der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche T}$ ) in Dekaden bei Thymitis, rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche T}$ ) und Alter bei Thymitis 23

**Abb. 12** links: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche NT}$ ) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche bei Normalthymi (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche NT}$ ), rechts: Zusammenhang zwischen der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche T}$ ) und der Anzahl der Hassall-Körperchen bei Thymitis (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche T}$ ) 24

**Abb. 13** links: prozentualer Anteil der AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen (Kodierung1) und prozentualer Anteil der AIRE+ -Zellen um Keimzentren (Kodierung 2) , rechts: prozentualer Anteil der AIRE+ -Zellen um Hassall-Körperchen bei Normalthymi (Kodierung 1) und bei Thymitis (Kodierung 2). 25

**Abb. 14:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche NT}$ ) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche NT}$ ) in Dekaden bei Normalthymi 26

**Abb. 15:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche NT}$ ) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche NT}$ ) der einzelnen Versuchspersonen mit Normalthymi. Fallnummer 1-7 aus Dekade 1, 8-9 aus Dekade 2, 10-12 aus Dekade 3, 13 aus Dekade 4, 14-15 aus Dekade

5, 16-18 aus Dekade 6, 19-22 aus Dekade 7, 23-26 aus Dekade 8, 27-28 aus Dekade 9 27

**Abb. 16:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche}$  T) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche}$  T) in Dekaden bei Thymitis 28

**Abb. 17:** Abnahme der Anzahl der AIRE+ -Zellen pro Fläche (=  $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche}$  T) und der Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche (=  $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche}$  T) der einzelnen Versuchspersonen bei Thymitis. Fallnummer 1-4 aus Dekade 2, 5-7 aus Dekade 3, 8-12 aus Dekade 4, 13-16 aus Dekade 5. 29

**Abb. 18:** Kombinationen des Auftretens von Hassall-Körperchen und AIRE+ -Zellen (HassAireKomb), H-: Felder ohne Hassall-Körperchen, H+: Felder mit Hassall-Körperchen, A-: Felder ohne AIRE+ -Zellen, A+: Felder mit AIRE+ -Zellen 31

**Abb. 19:** rechts: Anzahl der Foxp3+ -Zellen um AIRE+ -Zellen ( $\text{FoxPdre}_i_{\text{um\_AIRE}}$ ) und Anzahl der Foxp3+ -Zellen ohne örtliche Nähe zu AIRE+ -Zellen ( $\text{FoxPdre}_i_{\text{ohne\_AIRE}}$ ) für die einzelnen Versuchspersonen, links: Anzahl der Foxp3+ -Zellen in unmittelbarer Nähe zu AIRE+ -Zellen ( $\text{FoxP3\_AIRE}$ ) und Anzahl der Foxp3+ -Zellen ohne örtliche Nähe zu AIRE+ -Zellen ( $\text{FoxP3ohneA}$ ) über alle Versuchspersonen hinweg 33

**Abb. 20** links: Abnahme der Anzahl der Myoidzellen pro Fläche in Dekaden, rechts: Zusammenhang zwischen Myoidzellen pro Fläche ( $q_{\text{Myoid}} \text{ Fläche}$ ) und Alter 34

**Abb. 21:** Anzahl der Hassall-Körperchen pro Fläche ( $q_{\text{Hassal}} \text{ Fläche}$  NT), der AIRE+ -Zellen pro Fläche ( $q_{\text{AIRE}} \text{ Fläche}$  NT) und der Myoidzellen pro Fläche ( $q_{\text{Myoid}} \text{ Fläche}$ ) bei Normalthymi im Vergleich. 35

**Tab. 1:** Liste der verwendeten Antikörper und Detektionsreagenzien 14

**Tab. 2:** A: AIRE, A negativ: in diesen Feldern waren keine AIRE+ -Zellen zu sehen, A positiv: in diesen Feldern waren AIRE+ -Zellen zu sehen, H: Hassall-Körperchen, H negativ: in diesen Feldern waren keine Hassall-Körperchen zu sehen, H positiv: in diesen Feldern waren Hassall-Körperchen sichtbar 30

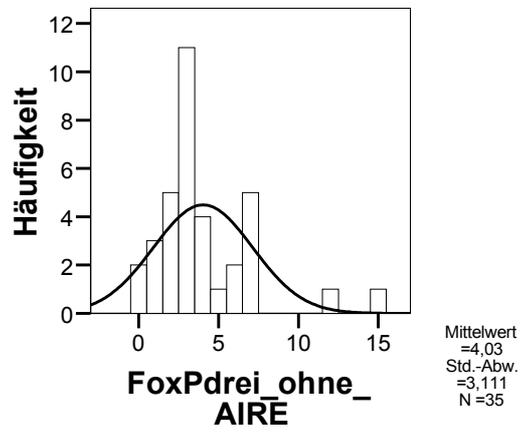
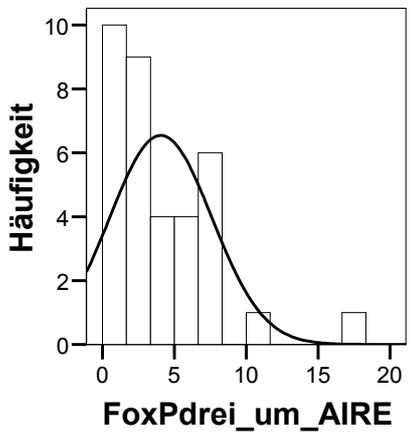
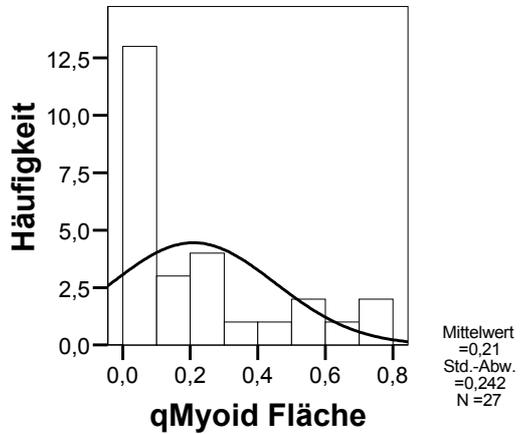
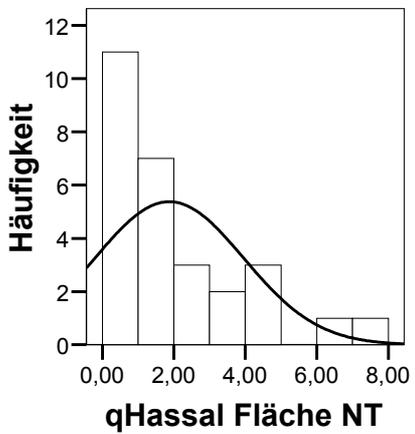
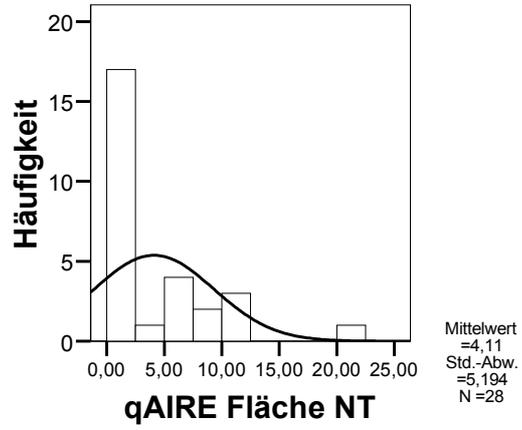
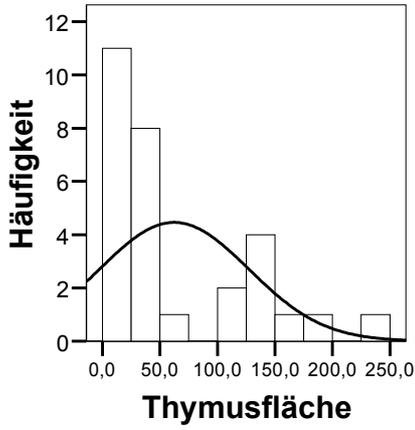
## 9 Anhang

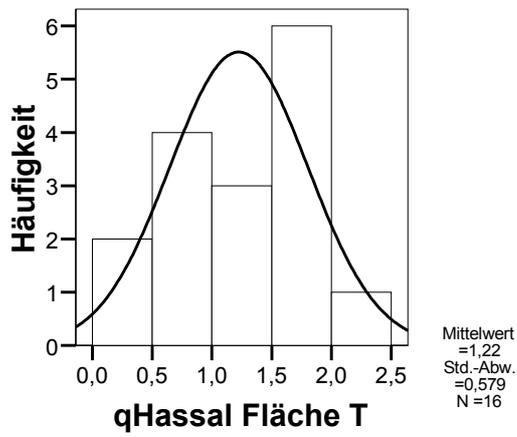
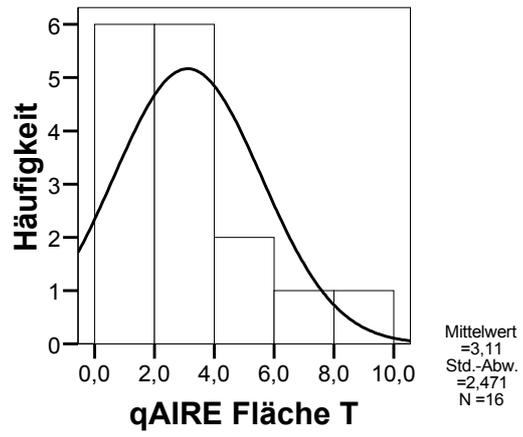
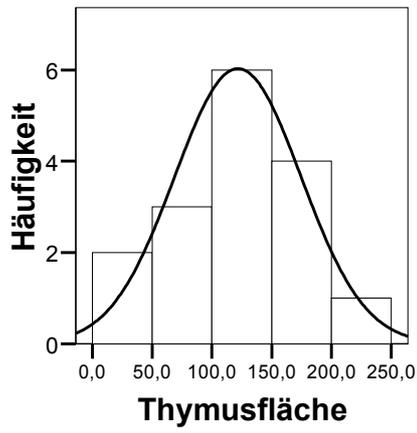
### 9.1 Statistische Berechnungen

#### 9.1.1 Test auf Normalverteilungen

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikan z	Statistik	df	Signifikanz
qHassal Fläche NT	,198	28	,006	,835	28	,000
Thymusfläche	,261	28	,000	,816	28	,000
qAIRE Fläche NT	,243	28	,000	,780	28	,000
	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikan z	Statistik	df	Signifikanz
Thymusfläche	,093	16	,200(*)	,990	16	,999
qHassal Fläche T	,130	16	,200(*)	,937	16	,314
qAIRE Fläche T	,172	16	,200(*)	,898	16	,074
% AIRE um KZ	,217	16	,043	,754	16	,001
	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifika nz	Statistik	df	Signifikan z
Alter	,151	27	,116	,890	27	,008
Myoidzellen pro Fläche	,194	27	,011	,821	27	,000
	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifika nz	Statistik	df	Signifikan z
FoxPdrei_um_AI RE	,164	35	,019	,868	35	,001
FoxPdrei_ohne_ AIRE	,230	35	,000	,830	35	,000

## 9.1.2 Verteilungsdiagramme





### 9.1.3 Nichtparametrische Korrelationen

			Alter	qAIRE Fläche NT	Thymusfläche	qHassal Fläche NT
Spearman-Rho	Alter	Korrelationskoeffizient	1,000	-,820(**)	-,697(**)	-,839(**)
		Sig. (2-seitig)	.	,000	,000	,000
		N	31	28	29	28
	qAIRE Fläche NT	Korrelationskoeffizient	-,820(**)	1,000	,772(**)	,931(**)
		Sig. (2-seitig)	,000	.	,000	,000
		N	28	28	28	28
	Thymusfläche	Korrelationskoeffizient	-,697(**)	,772(**)	1,000	,768(**)
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	.	,000
		N	29	28	29	28
	qHassal Fläche NT	Korrelationskoeffizient	-,839(**)	,931(**)	,768(**)	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,000	.
		N	28	28	28	28

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

			Myoidzellen pro Fläche	Alter
Spearman-Rho	Myoidzellen Fläche	Korrelationskoeffizient	1,000	-,697(**)
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	27	27
	Alter	Korrelationskoeffizient	-,697(**)	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	27	48

#### Dekade 2-5 Normalthymus, Korrelation von Fläche und Alter

			Hass	Alter
Spearman-Rho	Hass	Korrelationskoeffizient	1,000	-,234
		Sig. (2-seitig)	.	,613
		N	7	7
	Alter	Korrelationskoeffizient	-,234	1,000
		Sig. (2-seitig)	,613	.
		N	7	9

### 9.1.4 Parametrische Korrelationen

		Alter	Thymusfläche	qAIRE Fläche T	qHassal Fläche T
Alter	Korrelation nach Pearson	1	-,292	-,889(**)	-,503(*)
	Signifikanz (2-seitig)		,273	,000	,047
	N	17	16	16	16
Thymusfläche	Korrelation nach Pearson	-,292	1	,406	,384
	Signifikanz (2-seitig)	,273		,119	,142
	N	16	16	16	16
qAIRE Fläche T	Korrelation nach Pearson	-,889(**)	,406	1	,439
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,119		,089
	N	16	16	16	16
qHassal Fläche T	Korrelation nach Pearson	-,503(*)	,384	,439	1
	Signifikanz (2-seitig)	,047	,142	,089	
	N	16	16	16	16

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

### 9.1.5 Partielle Korrelationen

Kontrollvariablen			Myoidzellen pro Fläche	qAIRE Fläche NT
Alter	Myoidzellen pro Fläche	Korrelation	1,000	,498
		Signifikanz (zweiseitig)	.	,011
		Freiheitsgrade	0	23
	qAIRE Fläche NT	Korrelation	,498	1,000
		Signifikanz (zweiseitig)	,011	.
		Freiheitsgrade	23	0

Kontrollvariablen			Myoidzellen pro Fläche	qHassal Fläche NT
Alter	Myoidzellen pro Fläche	Korrelation	1,000	,470
		Signifikanz (zweiseitig)	.	,018
		Freiheitsgrade	0	23
	qHassal Fläche NT	Korrelation	,470	1,000
		Signifikanz (zweiseitig)	,018	.
		Freiheitsgrade	23	0

### 9.1.6 Mann/ Whitney U Tests

	N_T	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Fläche	1	16	14,56	233,00
	2	9	10,22	92,00
	Gesamt	25		
qHassall_FI	1	16	11,78	188,50
	2	8	13,94	111,50
	Gesamt	24		
qAIRE_FI	1	16	12,06	193,00
	2	8	13,38	107,00
	Gesamt	24		
		Fläche	qHassall_FI	qAIRE_FI
Mann-Whitney-U		47,000	52,500	57,000
Wilcoxon-W		92,000	188,500	193,000
Z		-1,416	-,706	-,429
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,157	,480	,668
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]		,169(a)	,490(a)	,697(a)

	Var	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
FoxPdr	1	35	35,33	1236,50
	2	35	35,67	1248,50
	Gesamt	70		

	FoxPdr
Mann-Whitney-U	606,500
Wilcoxon-W	1236,500
Z	-,071
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,943

	kod	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
prozA_H_NTvsT	1,00	6	18,83	113,00
	2,00	17	9,59	163,00
	Gesamt	23		

		prozA_H_NTvsT
Mann-Whitney-U		10,000
Wilcoxon-W		163,000
Z		-2,871
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,004
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]		,002(a)

### 9.1.7 T-Test

#### Gruppenstatistiken

	Kodierung	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
proA_Hvs_KZ_T	1,00	17	76,1365	7,25364	1,75927
	2,00	17	3,7000	4,41028	1,06965

#### Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Sign.	T	df	Sign. (2-seitig)
proA_Hvs_KZ_T	Varianzen sind gleich	3,464	,072	35,182	32	,000
	Varianzen sind nicht gleich			35,182	26,407	,000

### 9.1.8 A \* H Kreuztabelle und Chi-Quadrat-Test

			H		Gesamt
			negativ	positiv	
A	negativ	Anzahl	123	222	345
		% von A	35,7%	64,3%	100,0%
	positiv	Anzahl	34	343	377
		% von A	9,0%	91,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	157	565	722
		% von A	21,7%	78,3%	100,0%

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	75,095(b)	1	,000		
Kontinuitätskorrektur (a)	73,538	1	,000		
Likelihood-Quotient	78,273	1	,000		
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	74,991	1	,000		
Anzahl der gültigen Fälle	722				

a Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

b 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 75,02.

## 9.2 Rohdaten

### 9.2.1 Rohdaten der Normalthymus-Patienten

Fallnummer	Dekade	Alter	Geschlecht	Diagnose
6431	1	2	W	NT
6805	1	1	M	NT
29373	1	1	W	NT
16735	1	1	W	NT
3710	1	2	M	NT
11395	1	1	W	NT
7511	1	2	W	NT
15606	2	19	W	NT
18756	2	16	M	NT
18256	3	24	W	NT
2029	3	23	W	NT
2027	3	25	M	NT
22400	3	30	W	NT
12525	4	34	W	NT
12793	5	48	W	NT
7113	5	46	M	NT
7436	5	50	M	NT
6234	6	58	W	NT
5914	6	55	M	NT
8445	6	51	M	NT
29587	7	67	M	NT
3251	7	63	M	NT
8446	7	70	M	NT
30220	7	68	M	NT
30412	8	74	M	NT
5913	8	73	W	NT
7435	8	74	W	NT
29327	8	71	W	NT
8922	9	81	W	NT
6153	9	86	W	NT

**Tab.1:** Patientendaten, Normalthymi (NT), W: weiblich, M: männlich, Dekade 1: 0-9 Jahre, Dekade 2:10-19 Jahre, Dekade 3: 20-29 Jahre, Dekade 4: 40-49 Jahre, Dekade 5: 50-59 Jahre, Dekade 6: 60-69 Jahre, Dekade 7:70-79 Jahre, Dekade 8: 80-89 Jahre, Dekade 9: 90-99 Jahre

Fall- nummer	Dekade	AIRE+ -Zellen	Hassall	Fläche	AIRE/Flä che	Hassall/ Fläche
6431	1	207	86	26,6	7,78	3,23
6805	1	1562	596	135,05	11,57	4,41
29373	1	375	182	63,47	5,91	2,87
16735	1	990	353	105,69	9,4	3,33
3710	1	644	239	29,99	21,5	8
11395	1	1783	971	147,55	12,1	6,6
7511	1	504	569	233	2,2	2,44
15606	2	282	193	45,73	6,2	4,22
18756	2	1045	317	189,11	5,5	1,7
18256	3			156,62		
2029	3	94	48	40,33	2,3	1,2
2027	3	183	130	111,96	1,6	1,2
22400	3	30	28	25,11	1,2	1,1
12525	4	1511	271	133,08	11,4	2
12793	5	62	30			1,5
7113	5	82	32	21,92	3,7	0,5
7436	5	0	1	1,85	0	
6234	6	875	550	133,8	6,5	4,11
5914	6	59	45	43,8	1,3	1
8445	6	38	38	34,2	1,11	1,11
29587	7	5	0	20,5	0,2	0
3251	7	5	0	18,9	0,26	0
8446	7	22	15	19,2	1,1	0,8
30220	7	0	0	6,2	0	0
30412	8	0	0	7,78	0	0
5913	8	0	0	4	0	0
7435	8	2	0	5,1	0,4	0
29327	8	1	0	1,3	0,8	0
8922	9	40	8	40,8	1	0,2
6153	9	0	5	5,6	0	0,9

**Tab. 2:** AIRE+ -Zellen = Anzahl der AIRE+- Zellen, AIRE/Fläche = Anzahl der AIRE+ -Zellen pro gemessene Fläche, Hassall = Anzahl der Hassallschen Körper, Hassall/Fläche = Anzahl der Hassallschen Körper pro gemessene Fläche

Fallnummer	Aire+ -Zellen	Aire+ -Zellen um Hassal	%Aire+ -Zellen um Hassal
6431	207	185	89,37
6805	1562	1404	89,88
29373	375	314	83,33
16735	990	780	78,79
3710	644	557	86,49
11395	1783	1601	89,79
7511	504	469	93,06
15606	282	248	87,94
18756	1045	960	91,87
18256			
2029	94	78	82,98
2027	183	166	90,71
22400	30	27	90
12525	1511	1247	82,53
12793	62	50	80,65
7113	82	74	90,24
7436	0	0	0
6234	875	814	93,03
5914	59	44	74,58
8445	38	34	89,47
29587	5	0	0
3251	5	0	0
8446	22	17	77,27
30220	0	0	0
30412	0	0	0
5913	0	0	0
7435	2	0	0
29327	1	0	0
8922	40	23	57,5
6153	0	0	0

**Tab. 3:** AIRE+ -Zellen = Anzahl der AIRE+ -Zellen, AIRE+ -Zellen um Hassal = Anzahl der AIRE+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Hassallschen Körpern, Aire+ -Zellen um Hassal = Anzahl der Aire+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Hassallschen Körpern, %Aire+ -Zellen um Hassal = prozentualer Anteil von Aire+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Hassallschen Körpern

## 9.2.2 Rohdaten der Thymitis-Patienten

Fallnummer	Dekade	Alter	Geschlecht	Diagnose
2773	2	11	M	Thymitis
19837	2	19	W	Thymitis
11457	2	14	M	Thymitis
27204	2	17	M	Thymitis
1574	3	24	W	Thymitis
11499	3	23	W	Thymitis
7377	3	24	W	Thymitis
47777	3	25	W	Thymitis
6719	4	32	W	Thymitis
11533	4	37	W	Thymitis
10885	4	38	W	Thymitis
9862	4	33	W	Thymitis
1904	4	36	W	Thymitis
7661	5	49	W	Thymitis
20683	5	43	W	Thymitis
3927	5	49	W	Thymitis
4542	5	45	W	Thymitis

**Tab. 4:** Patientendaten der Thymitis- Patienten, W: weiblich, M: männlich, Dekade 1: 0-9 Jahre, Dekade 2: 10-19 Jahre, Dekade 3: 20-29 Jahre, Dekade 4: 40-49 Jahre, Dekade 5: 50-59 Jahre

Fallnummer	Dekade	Aire+ -Zellen	Hassall	Fläche	AIRE/Fläche	Hassall/ Fläche
2773	2	2081	298	226,77	9,18	1,3
19837	2	153	97	28,5	5,37	0,4
11457	2	619	56	109,05	5,68	2,3
27204	2	812	173	126,7	6,41	1,4
1574	3	878	299	184,8	4,75	1,6
11499	3	211	131	109,05	1,93	1,2
7377	3	549	292	150,6	3,64	1,9
47777	3	74	70			
6719	4	417	115	122,44	3,41	0,9
11533	4	506	264	162,76	3,11	1,6
10885	4	406	218	145,29	2,79	1,5
9862	4	312	229	131,5	2,37	1,74
1905	4	244	112	68,9	3,54	1,6
7661	5	38	51	75,4	0,50	0,7
20683	5	23	27	43,4	0,53	0,6
3927	5	58	47	88,6	0,65	0,5
4542	5	110	75	173,1	0,63	0,4

**Tab.5:** AIRE+ -Zellen = Anzahl der AIRE+- Zellen, AIRE/Fläche = Anzahl der AIRE+ -Zellen pro gemessene Fläche, Hassall = Anzahl der Hassallschen Körper, Hassall/Fläche = Anzahl der Hassallschen Körper pro gemessene Fläche

Fallnummer	AIRE+ Zellen	AIRE+ -Zellen um Hassall	% AIRE+ -Zellen um Hassall	AIRE+ -Zellen um KZ	%AIRE+ -Zellen um KZ
2773	2081	1581	75,97	14	0,67
19837	153	120	78,43	0	0
11457	619	536	86,6	4	0,65
27204	812	583	71,8	46	5,66
1574	878	710	80,86	48	5,47
11499	211	151	71,56	4	2
7377	549	464	84,52	0	0
47777	74	56	75,68	5	6,76
6719	417	283	67,86	5	1,2
11533	506	409	80,83	28	5,53
10885	406	316	77,83	69	17
9862	312	231	77,04	23	7,37
1905	244	180	73,77	13	5,33
7661	38	36	92,11	2	5,26
20683	23	15	65,22	0	0
3927	58	39	76,24	0	0
4542	110	77	70	0	0

**Tab. 6:** AIRE+ -Zellen = Anzahl der AIRE+ -Zellen, AIRE+ -Zellen um Hassall = Anzahl der AIRE+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Hassallschen Körpern, %Aire+ -Zellen um Hassall = prozentualer Anteil von Aire+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Hassallschen Körpern, AIRE+ -Zellen um KZ = Anzahl der AIRE+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Keimzentren, %AIRE+ -Zellen um KZ = prozentualer Anteil von Aire+ -Zellen in unmittelbarer Nähe von Keimzentren

### 9.2.3 Rohdaten der Myoidzellen

Fallnummer	Myoidzellen	Fläche	Myoidzellen/ Fläche
6431	14	26,6	0,52
6805	33	135,05	0,24
16735	31	105,69	0,29
3710	42	29,99	0,72
11395	63	147,55	0,42
7511	25	233	0,11
15606	12	45,73	0,26
18756	139	189,11	0,73
18256	8	156,62	0,05
2029	0	40,33	0
2027	6	111,96	0,05
22400	2	25,11	0,08
12525	21	133,08	0,16
12793	4		
6234	83	133,8	0,62
5914	0	43,8	0
8445	11	34,2	0,32
29587	0	20,5	0
3251	1	18,9	0,05
8446	3	19,2	0,16
30220	0	6,2	0
5913	0	4	0
7435	0	5,1	0
29327	0	1,3	0
8922	0	40,8	0
6153	0	5,6	0
27204	0,6	126,7	0,6
2773	0,27	226,77	0,27

**Tab. 7:** Myoidzellen = Anzahl der Myoidzellen, Myoidzellen/Fläche = Anzahl der Myoidzellen pro gemessene Fläche

## 9.2.4 B1-Thymome

Fallnummer	Hassall+/ AIRE+	Hassall-/ AIRE+	Hassall+/ AIRE-	Hassall-/ AIRE-	Summe
H1569/87	18	0	31	7	56
H4143/98	30	4	17	8	60
H3983/98	2	0	1	1	4
H2307/89	3	5	5	3	16
H6010/01	9	0	14	1	24
H3716/97	29	12	6	4	51
10749/96	78	3	2	3	86
269/01	46	3	27	18	94
1508/98	24	3	13	7	47
H6011/01	25	0	6	1	32
5235/98	8	0	40	23	71
H7666/01	16	2	32	19	51
33543/98	8	0	7	2	17
H6998/00	17	0	14	5	36
H3036/00	30	2	7	21	60

**Tab. 8:** Hassall+: Felder mit Hassallschen Körpern, Hassall-: Felder ohne Hassallsche Körper, AIRE+ : Felder mit AIRE+ -Zellen, AIRE-: Felder ohne AIRE+- Zellen

	Hassal+	Hassal-	Summe
AIRE+	343	34	377
AIRE-	222	123	345
Summe	565	157	

**Tab.9:** Hassall+: Felder mit Hassallschen Körpern, Hassall-: Felder ohne Hassallsche Körper, AIRE+ : Felder mit AIRE+ -Zellen, AIRE-: Felder ohne AIRE+- Zellen

## 9.2.5 FOXP3 Zellen in der Nähe zu AIRE+ - Zellen

Fallnummer	AIRE+ -Zellen	Foxp3+ -Zellen	Foxp3+ -Zellen um AIRE+ -Zellen
12793	4	4	0
	6	6	3
	3	1	0
	5	10	4
	9	10	8
		3	
		3	
		0	
		0	
		7	
7113	5	4	3
	2	9	1
	2	2	1
	3	12	1
	3	10	3
		1	
		2	
		1	
		3	
		2	
6234	8	0	0
	9	5	2
	7	2	0
	9	6	4
	10	5	4
		2	
		3	
		6	
		3	
		4	
8445	4	11	7
	4	14	3
	2	5	3
	1	11	2
	2	11	4
		8	
		3	
		3	
		5	
		3	

Fallnummer	AIRE+ -Zellen	Foxp3+ -Zellen	Foxp3+ -Zellen um AIRE+ -Zellen
3710	6	5	3
	8	13	6
	15	11	8
	15	14	17
	18	12	10
		3	
		12	
		4	
		1	
		6	
12525	8	7	6
	4	14	5
	3	8	4
	5	3	1
	3	15	7
		4	
		3	
		2	
		3	
18756	8	5	8
	8	4	1
	19	9	7
	11	5	2
	5	1	1
		7	
		7	
		7	
		5	
		3	

**Tab. 10:** AIRE+ -Zellen = Anzahl der AIRE+ -Zellen, Foxp3+ -Zellen= Anzahl der Foxp3+ -Zellen, Foxp3+ -Zellen um AIRE+ -Zellen = Anzahl der Foxp3+ -Zellen, die sich im Abstand von weniger als zwei AIRE+ -Zellen um AIRE+ -Zellen befanden

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. H. K. Müller – Hermelink, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Institut für Pathologie der Universität Würzburg durchführen zu können.

Dank sagen möchte ich auch Herrn Prof. Dr. A. Rosenwald für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Alexander Marx für die Stellung des interessanten Themas.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Philipp Ströbel für die freundliche Betreuung, insbesondere für die Möglichkeit zur stetigen Ansprechbarkeit bei Fragen und seine kompetenten und hilfreichen Antworten auf Fragen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. H. Harms für die Hilfe bei der Durchführung der computervermittelten Farbdifferenzanalyse

Mein Dank gilt auch Frau Andrea Homburger für die Färbungen und die Hilfsbereitschaft bei der Immunfluoreszenz.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für die jederzeitige Unterstützung während des Studiums und meinem Freund Daniel Mackenrodt für die liebe Begleitung bei der Erstellung der Arbeit.

---

## Lebenslauf

**Name:** Johanna Friederike Strack

**Geburtstag:** 29.09.1980

**Geburtsort:** Memmingen

### **Beruf:**

04/2009                      Universitätsklinikum Gießen, Medizinische Klinik 1  
Klinik für Kardiologie und Angiologie

### **Universitätsausbildung:**

2008                      2. Ärztliche Prüfung

2004                      Ärztliche Vorprüfung

2002                      Immatrikulation für Medizin an der Julius-  
Maximilians-Universität zu Würzburg

2002                      Vordiplom Psychologie

2001-2002                Studium der Psychologie an der Julius-Maximilians-  
Universität zu Würzburg

### **Schulbildung:**

2000                      Abitur am Carl-von-Linde-Gymnasium in Kempten

Gießen, November 2009

Johanna Strack