

**Ontogenese und funktionelle Charakterisierung
immunregulatorischer T-Zellen in einem
transgenen Mausmodell**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Yanina Sorge
geboren am 4. September 1973 in Uelzen.

2005

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Matthias W. Hoffmann

Tag der Promotion: 19. April 2005

Des-TZR x K^{b-lo} Mäuse exprimieren das MHC-Molekül K^b in geringer Dichte und haben gleichzeitig T-Zellen mit einem T-Zellrezeptor, der gegen das Molekül gerichtet ist. Die Tiere zeigen trotzdem keine Anzeichen von Autoimmunreaktionen, vielmehr können die T-Zellen, in andere Mäuse übertragen, eine parallel induzierte GvH-Reaktion unterdrücken. Aufgrund dieser Wirkung wurden Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer Ontogenese und Funktionsweise charakterisiert. Die T-Zellen wurden durch eine Negativselektion angereichert und ihr Phänotyp bestimmt. Eine Aktivierung durch die Aufreinigungsprozedur fand nicht statt. Die transgenen T-Zellen exprimierten den T-Zellrezeptor entweder in intermediärer Dichte und keinen CD8-Korezeptor (Des-TZR^{int}CD8⁻) oder beide Moleküle in niedriger Dichte (Des-TZR^{lo}CD8^{lo}). Beide Populationen exprimierten CD44, CD122, und der CD8-Korezeptor wurde teilweise in seiner CD8 $\alpha^+\beta^-$ -Form exprimiert. Durch diesen Phänotyp, aber auch durch den Nachweis einer hohen Produktionsrate an IFN γ gelang die Zuordnung der T-Zellen zu den intermediären T-Zellen, zu denen auch NKT-Zellen gezählt werden. Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen befinden sich in einem teil-anergen Zustand und zeigen eine besondere thymische Entwicklung: Des-TZR^{lo}CD8^{lo} Thymozyten differenzieren sich vergleichsweise schnell und nur in den ersten Lebensstagen der Maus, durchlaufen die negative Selektion ohne ein doppelt-positives Stadium, und sind in Thymi adulter Tiere nicht mehr nachweisbar, während sich Des-TZR^{int}CD8⁻ (DN) Thymozyten auch in adulten Tieren noch entwickeln und ein doppelt-positives Stadium durchlaufen. Die T-Zellen sind zur homeostatischen Proliferation fähig und dabei von der Expression des K^b -Moleküls abhängig, zeigen sich jedoch *in vitro* sehr empfindlich und werden innerhalb von 24 h apoptotisch. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte die folgende Hypothese aufgestellt werden: autoreaktive Des-TZR^{lo}CD8^{lo} T-Zellen konnten der Selektion im noch unreifen Thymus entkommen; diese Zellen werden von den nachfolgenden DN T-Zellen mit Toleranz infiziert, so daß beide Populationen diese Toleranz im GvH-Modell übertragen können. Die Marker CD44, CD122 und die CD8 $\alpha^+\beta^-$ -Form des Korezeptors werden aufgrund der Wechselwirkung mit dem selektionierenden Antigen exprimiert und dienen in der Peripherie zur Regulation der Zellen.

Schlagnworte: intermediäre T-Zellen, regulatorisch, infektiöse Toleranz

Double transgenic Des-TZR x K^{b-lo} mice express ubiquitously the MHC molecule K^b in low density and although their T cells express a receptor which is directed against the K^b molecule the mice show no autoimmune reaction. Even more, if the T cells are transferred to other mice they can suppress a parallel induced GvHD reaction. On the basis of these results Des-TZR x K^{b-lo} T cells were characterised concerning their phenotype, ontogenesis and abilities. The T cells were enriched with the help of negative selection and their phenotype was identified. The cells were not activated through the enrichment procedure. The transgenic cells expressed the T cell receptor either in intermediate density without the CD8 co-receptor (Des-TZR^{int}CD8⁻) or both molecules in low density (Des-TZR^{lo}CD8^{lo}). Both populations expressed CD44, CD122, and the CD8 co-receptor was partially expressed in its CD8 $\alpha^+\beta^-$ version. Not only because of this phenotype, but also because of the high production rate of IFN γ it was possible to classify the T cells as intermediate T cells, which also includes NKT cells. Des-TZR x K^{b-lo} T cells are partially anergic and show a special thymic development: Des-TZR^{lo}CD8^{lo} thymocytes differentiate comparatively fast and only in the first days after birth. They go through negative selection without a double positive state and are not detectable in adult thymi, while Des-TZR^{int}CD8⁻ (double negative) thymocytes still develop in adult mice and pass through a double positive state. Des-TZR x K^{b-lo} T cells are capable of homeostatic proliferation and at the same time depending on the expression of the K^b molecule, but *in vitro* the cells are highly sensitive and become apoptotic with 24 h. Following the results it can be hypothesised that autoreactive Des-TZR^{lo}CD8^{lo} T cells could escape negative selection in the young and immature thymus; these cells are infected with tolerance from the following double negative T cells. In the end, both populations can transfer these tolerance in the GvHD model. The cell markers CD44, CD122 and the CD8 $\alpha^+\beta^-$ version of the co-receptor are expressed due to the interaction with the negative selecting antigen and serve the regulation of the cells in the periphery.

Key words: intermediate T cells, regulatory, infectious tolerance

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Einleitung.....	3
1.1.1 Die Herausbildung des T-Zell Repertoires.....	3
1.1.2 T-Zell-Homeostase.....	6
1.1.3 Periphere Toleranz.....	7
1.1.4 Regulatorische T-Zellen	8
1.1.5 Das Modell MHC-Klasse-I (H-2K ^b) und anti-K ^b T-Zellrezeptor doppelt transgener Mäuse.....	13
1.2 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	16
2.1.1 Tierschutzrechtliche Bestimmungen.....	16
2.1.2 Verwendete Mausstämme.....	16
2.1.3 H-2K ^b transgene Mäuse.....	16
2.1.4 T-Zellrezeptor-transgene Mäuse.....	17
2.1.5 nicht-transgene Mäuse.....	17
2.1.6 Tierhaltung.....	18
2.2 Narkotika.....	18
2.3 Medien und Puffer.....	19
2.3.1 Kulturmedium.....	19
2.3.2 Kulturmedium mit ³ H-Thymidin.....	19
2.3.3 Medium 199.....	19
2.3.4 Dulbecco's phosphatgepufferte Saline (DPBS).....	19
2.3.5 Hämolysepuffer.....	20
2.3.6 Trypanblau-Lösung.....	20
2.4 Puffer und Lösungen für die Aufreinigung und Konjugation von Antikörpern.....	20
2.4.1 Waschpuffer.....	20
2.4.2 Elutionspuffer.....	20
2.4.3 Neutralisationspuffer.....	20
2.4.4 Regenerationspuffer I.....	20
2.4.5 Regenerationspuffer II.....	20
2.4.6 Kopplungspuffer für die Biotinylierung und FITC-Konjugation.	21
2.4.7 Biotin-Stammlösung.....	21
2.4.8 FITC-Stammlösung.....	21
2.5 Lösungen und Antikörper für die durchflußzytometrische Analyse.....	22
2.5.1 FACS-Puffer.....	22

2.5.2	Fertiglösungen für die Durchflußzytometrie.....	22
2.5.3	CFSE-Lösung.....	22
2.5.4	Antikörper.....	22
2.6	Antikörper-Aufreinigung.....	23
2.7	Konjugation der Antikörper.....	25
2.7.1	Biotinylierung.....	25
2.7.2	Konjugation mit FITC.....	25
2.8	Organentnahme.....	26
2.8.1	Blutentnahme.....	26
2.8.2	T-Zell-Depletion im Tier.....	26
2.8.3	Entnahme von Lymphknoten und Milz.....	27
2.8.4	Entnahme des Thymus beim adulten Tier.....	28
2.8.5	Entnahme des Thymus beim neonatalen Tier.....	28
2.8.6	Thymektomie.....	28
2.9	Durchflußzytometrische Anwendungen.....	29
2.9.1	Färbung mit fluoreszenz-markiertem Antikörper.....	29
2.9.2	Färbung mit anti-Caspase-3-Antikörper.....	30
2.9.3	CFSE-Färbung.....	30
2.10	Zellkultur.....	31
2.10.1	Einfrieren von Hybridomzellen.....	31
2.10.2	Auftauen von Hybridomzellen.....	31
2.11	<i>in vitro</i> Testverfahren.....	32
2.11.1	Aktivierung von T-Zellen durch vernetzende Antikörper.....	32
2.11.2	ELISA.....	32
2.12	Isolierung und Separation k^b-positiver T-Lymphozyten durch Dynabeads.....	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Phänotyp der Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen.....	35
3.1.1	Anreicherung von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen durch indirekte Negativselektion am Beispiel von Lymphknotenzellen.....	35
3.1.2	Anreicherung von Des-TZR transgenen T-Zellen durch indirekte Negativselektion am Beispiel von Lymphknotenzellen.....	35
3.1.3	Expression von Aktivierungsmarkern.....	36
3.1.4	Expression von NKT-Zellmarkern.....	39
3.2	Zytokinproduktion von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper.....	40

3.2.1	Aktivierung von Des-TZR Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper.....	41
3.2.2	Aktivierung von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper.....	42
3.2.3	Aktivierung von B10.BR Lymphknotenzellen durch Vernetzende Antikörper.....	44
3.2.4	Sekretion von IL-10 von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper, verglichen mit aktivierten Des-TZR-Lymphknotenzellen und B10.BR Lymphknotenzellen.....	45
3.2.5	Sekretion von IL-2 von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper, verglichen mit aktivierten Des-TZR-Lymphknotenzellen und B10.BR-Lymphknotenzellen.....	47
3.2.6	Sekretion von $IFN\gamma$ und TGF- β durch Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper, verglichen mit aktivierten Des-TZR-Lymphknotenzellen und B10.BR-Lymphknotenzellen.....	49
3.3	Nachweis einer thymusabhängigen Entwicklung von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen.....	50
3.3.1	Verfolgung der Rekonstitution des T-Zell-Repertoires in T-Zell-depletierten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäusen.....	50
3.3.2	Phänotyp des T-Zell-Repertoires nach Thymektomie und T-Zell-Depletion.....	53
3.4	Rekonstitution des T-Zell-Repertoires von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Mäusen nach Depletion mit einem anti-Thy1 Antikörper.....	55
3.4.1	Rekonstitution des T-Zell-Repertoires von Des-TZR transgenen Mäusen.....	55
3.4.2	Rekonstitution des T-Zell-Repertoires von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäusen.....	56
3.5	Homeostatische Proliferation von Des x K^{b-lo} T-Zellen.....	57
3.5.1	T-Zell-Depletion mit Hilfe eines anti-Thy1.2 Antikörpers im Empfängertier.....	58
3.5.2	Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen eine homeostatische Proliferation in lymphopenen Empfängern mit positiv-selektionierendem Hintergrund.....	58
3.5.3	Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen eine homeostatische Proliferation in lymphopenen Empfängern mit negativ-selektionierendem Hintergrund.....	59
3.5.4	Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen keine homeostatische Proliferation in lymphopenen Empfängern mit nicht-selektionierendem Hintergrund.....	60

3.5.5	Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen keine homeostatische Proliferation in nicht-lymphopenen Empfängern mit negativ-selektionierendem Hintergrund.....	60
3.6	Vergleich der Vitalität von Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Lymphknotenzellen <i>in vitro</i>.....	61
3.6.1	Vitalität von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Lymphknotenzellen <i>in vitro</i>	62
3.6.2	Vitalität von Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen <i>in vitro</i>	63
3.7	Positive und negative Selektion im Thymus von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen und Des-TZR transgenen Thymozyten beim adulten Tier.....	66
3.7.1	Expression von CD4 und CD8 durch Des-TZR x K^{b-lo} transgene und Des-TZR transgene Thymozyten.....	66
3.7.2	Expression des Des-TZR-Klonotyps bei Des-TZR x K^{b-lo} transgene und Des-TZR transgene Thymozyten.....	67
3.7.3	Des-TZR ⁺ CD8 ⁻ Thymozyten in adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren sind doppelt negativ.....	67
3.8	Unterschiede in der Differenzierung zwischen Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Thymozyten.....	69
3.8.1	Unterschiede in der Expression von CD4 und CD8 zwischen neonatalen Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR Thymozyten.....	69
3.8.2	Unterschiede in der Expression des Des-TZR-Klonotyp zwischen neonatalen Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR Thymozyten.....	70
3.8.3	Phänotyp der Des ^{hi} CD8 ^{lo} und Des ^{int} CD8 ^{lo} Thymozyten.....	71
3.8.4	Des-TZR ⁺ CD8 ⁺ Thymozyten sind in adulten Des-TZR x K^{b-lo} Tieren nicht mehr nachweisbar.....	72
3.8.5	Des-TZR ⁺ CD8 ⁻ T-Zellen sind in adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren doppelt negativ	73
4	Diskussion.....	75
4.1	Phänotyp der Des x K^{b-lo} transgenen T-Zellen.....	75
4.2	Zytokinproduktion von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper.....	78
4.3	Homeostatische Proliferation von Des x K^{b-lo} T-Zellen.....	81
4.4	Des x K^{b-lo} T-Zellen zeigen eine thymusabhängige Entwicklung.....	83
4.5	Wirkmechanismus der Des x K^{b-lo} regulatorischen T-Zellen.....	94
5	Literatur.....	96
	Lebenslauf.....	112
	Danksagung.....	115
	Erklärung.....	116

<i>A.bidest</i>	bidestilliertes Wasser
CD	Differenzierungscluster
CFDA, SE	Succinimidylester des Fluoresceinisothiocyanats, genannt CFSE
CFSE	<i>siehe</i> CFDA
cpm	<i>counts per minute</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
d	Tag(e)
Des-TZR	anti-K ^b -T-Zellrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN T-Zellen	doppelt-negative T-Zellen
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
x g	Gravitation (9,81 m/s ²)
GITR	<i>Glucocorticoid-induced Tumor-necrosis Factor Receptor Family- related Protein</i>
GvH-Reaktion	<i>Graft-versus-Host-Reaktion</i>
h	Stunde(n)
hi	in hoher Dichte exprimiert
IFN _γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
int	in intermediärer Dichte exprimiert
l	Liter
lo	in geringer Dichte exprimiert
μg	Mikrogramm
M	Molar

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min.	Minute, Minuten
ml	Milliliter
m/v	Massenprozent
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
pg	Picogramm
TGF β	<i>Tumor Growth Factor β</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tetrahydroxymethylaminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
v/v	Volumenprozent

1.1 Einleitung

1.1.1 Die Herausbildung des T-Zell-Repertoires

Als Teil des adaptiven Immunsystems haben T-Zellen die Aufgabe, von intrazellulären Pathogenen befallene Zellen zu erkennen. Ein wichtiges Merkmal dieser Erkennung ist dabei der Kontakt des T-Zellrezeptors mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex, MHC*) auf der Zielzelle. Diese haben die Aufgabe, intrazelluläre Peptide zu binden und sie an der Zelloberfläche als Antigene zu präsentieren [1, 2].

Bei diesem Kontakt muß die T-Zelle in der Lage sein, körpereigene Antigene von fremden unterscheiden zu können: handelt es sich um ein fremdes Antigen, muß die T-Zelle reagieren. Ist es dagegen ein körpereigenes Antigen, könnte eine Aktivierung eine Autoimmunreaktion und damit die Zerstörung körpereigenen Gewebes auslösen, d.h. die T-Zelle darf nicht reagieren. Die Resistenz gegenüber einer Aktivierung durch Antigene bezeichnet man dabei als Toleranz [3]. Die Herausbildung eines funktionellen, aber selbsttoleranten Repertoires von T-Zellen ist essentiell für das Überleben eines Organismus und erfolgt im Thymus durch Wechselwirkungen der unreifen T-Zelle (Thymozyt) mit MHC-Molekülen innerhalb zweier Prozesse, der positiven und der negativen Selektion [4].

Die Entwicklung einer T-Zelle im Thymus erfolgt dabei aus Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark einwandern. Diese Vorläuferzellen exprimieren weder den T-Zellrezeptor, noch die für T-Zellen charakteristischen Korezeptormoleküle CD4 oder CD8, und werden mit Bezug auf die Korezeptormoleküle als doppelt-negativ bezeichnet.

Im doppelt-negativen Thymozyten findet während der T-Zellreifung zunächst ein Rearrangement der T-Zellrezeptor- β -Gene statt, um eine funktionierende β -Kette des T-Zellrezeptors exprimieren zu können. Anschließend werden die beiden Korezeptor-

moleküle CD4 und CD8 exprimiert und die Zelle befindet sich im doppelt-positiven Stadium. Mit Erreichen des doppelt-positiven Stadiums wird durch das Rearrangement der T-Zellrezeptor- α -Gene ein funktionsfähiger, heterodimerer $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor exprimiert. Die Zelle wird nun der positiven Selektion unterworfen, d.h. es wird überprüft, ob der T-Zellrezeptor in der Lage ist, überhaupt Selbst-MHC-Moleküle zu erkennen und mit ihnen zu reagieren. Je nachdem, ob der Rezeptor dabei mit einem MHC-Klasse-I-Molekül reagiert oder mit einem MHC-Klasse-II-Molekül, wird im Anschluß der CD4-Korezeptor bzw. der CD8-Korezeptor herunterreguliert und der Thymozyt befindet sich im einfach-positiven Stadium. Erkennt der Rezeptor jedoch kein Selbst-MHC-Molekül, erhält die Zelle durch weitere Rearrangements der Rezeptorgene und die Expression eines neuen T-Zellrezeptors eine weitere Überlebenschance oder sie geht zuletzt durch Apoptose zu Grunde [5-7].

Nachdem die Thymozyten einen T-Zellrezeptor ausgebildet haben, der Selbst-MHC-Moleküle erkennt, muß sichergestellt werden, daß sie dabei nicht durch körpereigene Peptide aktiviert werden. Reagieren Thymozyten während ihrer Differenzierung auf Selbst-Antigene, werden sie ebenfalls durch die Induktion von Apoptose aus dem Repertoire entfernt. Diese sogenannte negative Selektion ist das erste Bollwerk zur Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz eines Individuums [5, 8].

Wie kann es sein, daß einmal eine Wechselwirkung zwischen dem T-Zellrezeptor und dem MHC-Molekül ein positives Signal zum Überleben des Thymozyten gibt, ein anderes Mal aber Apoptose induziert? Hierzu gibt es im wesentlichen zwei Theorien: Die Aviditätstheorie geht davon aus, daß das Ergebnis einer Wechselwirkung zwischen dem T-Zellrezeptor und dem MHC-Molekül von der Avidität der Bindung bestimmt wird. Die Avidität setzt sich dabei zusammen aus der Affinität des T-Zellrezeptors zum MHC sowie der Dichte der T-Zellrezeptor:MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche. Ist die Avidität niedrig, wird die Zelle positiv selektioniert, ist sie zu stark, wird durch dieses Signal im Thymozyten Apoptose induziert und die Zelle wird negativ selektioniert [9-11].

Die differentielle Signalthese hingegen geht davon aus, daß die Signale, die zur positiven und negativen Selektion führen, sich in der Qualität und nicht in der Quantität unterscheiden [9]. Die differentielle Hypothese wird zur Zeit favorisiert, eine endgültige Klärung steht jedoch noch aus.

Es ist nicht zwingend notwendig, daß Thymozyten zuerst positiv und dann negativ selektioniert werden. Vielmehr kann bei einer sehr starken Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit dem MHC-Molekül die negative Selektion noch vor der positiven erfolgen, es handelt sich also um zwei voneinander unabhängige Prozesse [12].

Der Ablauf der T-Zell-Differenzierung im Thymus kann nicht nur anhand der Expression des T-Zellrezeptors und seiner Korezeptoren verfolgt werden. Ein weiteres Charakteristikum ist u. a. auch die transiente Expression von CD69 [7, 13]. CD69⁺ Thymozyten repräsentieren hierbei Zellen, die die positive Selektion durchlaufen oder durchlaufen haben [14, 15]. Zwingend notwendig für eine Expression von CD69 ist dabei die Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit dem selektionierenden MHC-Liganden [16, 17].

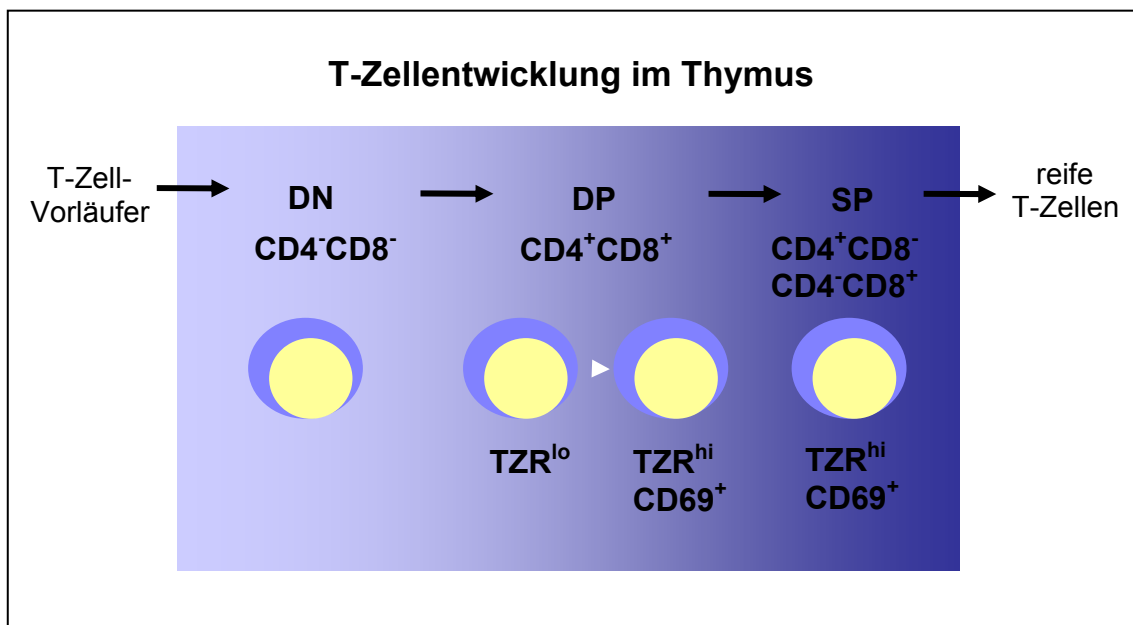


Abb. 1: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus; DN: doppelt-negativ, DP: doppelt-positiv; SP: einfach positiv, TZR: T-Zellrezeptor

1.1.2 T-Zell-Homeostase

Mit Hilfe der positiven und negativen Selektion reifen T-Zellen heran, die, aus dem Thymus entlassen, den peripheren T-Zell-Pool vervollständigen. Generell unterliegt der periphere T-Zell-Pool einer scharfen Regulation, um z.B. die Anzahl von Effektor-T-Zellen nach einer Immunantwort wieder auf ein normales Maß zu reduzieren, aber auch, um den konstanten Fluß neugenerierter T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie zu integrieren. Hierdurch bleibt die Anzahl reifer T-Zellen nahezu konstant, selbst wenn in adultem Zustand der Thymus atrophiert ist, oder eine Infektion eine Expansion von T-Zellen erfordert. Dieses Phänomen wird als Homeostase bezeichnet [18-21].

Während der Differenzierung im Thymus ist die Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit dem selektionierenden MHC-Molekül überlebenswichtig für die Zelle. Bis vor kurzem ging man davon aus, daß reife T-Zellen, haben sie erst einmal den Thymus verlassen, in der Peripherie in einem Ruhezustand verharren, bis sie von einem Fremdantigen aktiviert werden [22]. Tatsächlich brauchen sie auch in der Peripherie zum Überleben ein konstantes Signal, und wieder ist es der Kontakt mit dem ehemals positiv selektionierenden MHC-Molekül, der die Zellen am Leben erhält [22-24].

Untersuchungen zur Homeostase wurden an lymphopenen Tieren durchgeführt, d.h. in Empfängertieren, deren periphere T-Zellen depletiert wurden oder die durch eine Mutation keine T-Zellen besitzen. In diese Tiere wurden Spender-T-Zellen überführt und deren Proliferationsverhalten untersucht. Dabei wurde herausgefunden, daß überführte, naive T-Zellen stark proliferieren. Diese sogenannte homeostatische Proliferation verläuft polyklonal und ist unabhängig von einem stimulierenden Antigen, zwingend notwendig ist jedoch auch hier der Kontakt mit dem positiv-selektionierenden MHC:Peptidkomplex [21-26].

Während der homeostatischen Proliferation erlangen die Zellen den Phänotyp und auch die Effektorfunktionen von *memory* T-Zellen, d.h. CD8⁺ T-Zellen exprimieren

die Oberflächenmarker CD44 und CD122, weisen zytotoxische Aktivität auf und produzieren $\text{IFN}\gamma$, wenn sie mit einem Antigen stimuliert werden [25, 28, 29]. Nach Erreichen der Homeostase bildet sich je nach untersuchtem Modell der naive Phänotyp zurück [25] oder der *memory-like* Phänotyp bleibt erhalten [28, 29].

Bei der Aufrechterhaltung der Homeostase antigenspezifischer CD8^+ *memory* T-Zellen spielen die Zytokine IL-15 und IL-2 eine wichtige Rolle: während IL-15 die Proliferation antreibt, ist IL-2 verantwortlich für den Tod der sich teilenden Zellen durch Fas-vermittelte Apoptose. Die Rezeptoren beider Zytokine teilen sich hierbei die β -Kette des IL-2-Rezeptors (CD122). Da auch *memory-like* T-Zellen CD122 exprimieren, liegt die Vermutung nahe, daß ihr Proliferationsverhalten nach dem gleichen Mechanismus kontrolliert wird. Der Beweis hierfür steht jedoch noch aus [22, 30, 31].

Auch für das Zytokin Interferon- γ ($\text{IFN}\gamma$) konnte neben seiner zentralen Rolle bei der zellvermittelten Immunität eine proapoptotische Funktion bei der Homeostase von CD8^+ T-Zellen nachgewiesen werden [32, 33].

1.1.3 Periphere Toleranz

Neben der negativen Selektion im Thymus, der *zentralen Toleranz*, gibt es eine Reihe von Mechanismen der *peripheren Toleranz*, die zusätzlich zu der Reifung im Thymus sicherstellen, daß autoreaktive Zellen in der Peripherie keinen Schaden anrichten können. Hierbei handelt es sich um die Phänomene der Anergie, der peripheren Deletion, Ignoranz und des Herunterregulierens des T-Zellrezeptors sowie des CD8-Korezeptors [34].

Als Anergie bezeichnet man die Unfähigkeit der T-Zelle, auf Aktivierung hin zu proliferieren, wenn bei der MHC:T-Zellrezeptor-Wechselwirkung das kostimulatorische Signal ausgeblieben ist [35, 36]. Der Zustand ist unter anderem dadurch

charakterisiert, daß anerge Zellen bei einer Restimulierung durch ihr Antigen nicht proliferieren, weil sie kein IL-2 produzieren können. Die Produktion von anderen Zytokinen, wie z.B. IFN γ wird in diesem Zustand nicht beeinflusst [35]. Bei der peripheren Deletion handelt es sich um einen zusätzlichen Mechanismus zur Beseitigung autoreaktiver Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entkommen sind [36, 37].

Wird ein Antigen nur in geringer Menge exprimiert, kommt der Mechanismus der Ignoranz zum Tragen, d.h. autoreaktive Zellen reagieren nicht, wenn sie mit dem Antigen in Kontakt kommen [38]. Des weiteren können T-Zellen den T-Zellrezeptor und den CD8-Korezeptor in der Oberflächenexpression herabregulieren, wenn sie in der Peripherie auf ein Selbst-Antigen reagieren, das im Thymus nicht exprimiert wurde [39].

1.1.4 Regulatorische T-Zellen

Neben den eben genannten, eher passiven Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz stellen sog. regulatorische T-Zellen eine aktive Form der Toleranz dar [40].

Es wurden mehrere Subpopulationen regulatorischer T-Zellen definiert, die sich in der Wirkungsweise und dem Phänotyp unterscheiden. Zumeist fokussiert sich das Interesse auf CD4⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor⁺ T-Zellen, die durch die Expression von CD25 charakterisiert werden, der α -Kette des IL-2-Rezeptors. Hierbei handelt es sich um selbst-reaktive, aber anerge Zellen, die aktiv die Proliferation anderer T-Zellen hemmen können [41]. Sie zeigen eine thymus-abhängige Entwicklung, d.h. sie stammen nicht von CD4⁺CD25⁻ Vorläufern aus der Peripherie ab [42, 43]. In einem doppelt transgenen Mausmodell, bei dem die Tiere einen transgenen T-Zellrezeptor bekannter Spezifität exprimierten und zusätzlich das entsprechende Antigen, entstanden regulatorische T-Zellen als Konsequenz der negativen Selektion, wenn das Antigen im Thymus nicht in zu hoher Dichte exprimiert wurde und die

Thymozyten eine hohe Affinität zum Antigen hatten [41, 44]. Charakteristische Oberflächenmarker dieser T-Zellen sind neben dem konstitutiv exprimierten CD25 das kostimulatorische Molekül CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) und der zu der TNF-Familie gehörende Rezeptor GITR (*glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor family-related protein*) [44].

Die Induktion der Suppressor-Funktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen erfordert die Aktivierung durch den T-Zellrezeptor - sind die Zellen jedoch erst einmal aktiviert, regulieren sie andere T-Zellen unabhängig von einer weiteren Aktivierung durch ihr Antigen, d.h. unspezifisch [43, 45]. *In vitro* Studien ergaben, daß CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen ihren inhibitorischen Effekt durch Zell-Zell-Kontakt ausüben und unabhängig sind von immunsuppressiven Zytokinen.

Dem entgegen stehen CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen, deren Effektorfunktion *in vivo* eine Abhängigkeit von IL-4, IL-10 und TGF- β zeigt [46]. Anders als die eben beschriebenen T-Zellen, die während der natürlichen T-Zellreifung im Thymus entstehen, entstehen diese regulatorischen T-Zellen aus reifen CD4⁺ Zellen unter bestimmten Bedingungen durch Antigen-Stimulierung und werden deswegen als adaptive regulatorische T-Zellen bezeichnet. Sie können *ex vivo* generiert werden durch eine Antigen-Stimulierung in Beisein immunsuppressiver Zytokine wie IL-10. Auch *in vivo* ist die Funktion dieser regulatorischen T-Zellen von Zytokinen abhängig. Ein weiterer Unterschied zu natürlichen regulatorischen T-Zellen ist die Abhängigkeit von einer konstanten Aktivierung durch das Antigen [44, 46].

Weitere Modelle bestätigen die Existenz von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen, die weder über suppressive Zytokine ihre Funktion ausüben, noch CD25 exprimieren [42].

Neben CD4⁺ regulatorischen T-Zellen gibt es noch weitere T-Zell-Populationen, die regulatorische Fähigkeiten haben; zu nennen sind hierbei doppelt-negative CD4⁻CD8⁻TZR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und NKT-Zellen.

Doppelt-negative $TZR\alpha\beta^+$ T-Zellen reagieren mit MHC-Klasse-I-Molekülen und vermitteln ihren suppressiven Effekt nicht durch Zytokine, sondern supprimierten in einem Transplantationsmodell alloreaktive $CD8^+$ T-Zellen gleicher Spezifität durch Fas-vermittelte Apoptose. In weiteren Modellen konnten *Graft-versus-Host-Reaktionen* unterdrückt oder autoreaktive T-Zellen daran gehindert werden, Autoimmunkrankheiten auszulösen. Bei humanen doppelt-negativen $TZR\alpha\beta^+$ T-Zellen wurde die Produktion von IL-4 und $IFN\gamma$ nachgewiesen [47].

Klassische NKT-Zellen stellen eine Population von Zellen dar, die Eigenschaften sowohl mit T-Zellen, als auch mit NK-Zellen teilen. Sie koexprimieren NK1.1 und den $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor, wobei der T-Zellrezeptor in seinem Repertoire reduziert ist auf Expression von $V\beta 8$, 7 oder 2 und der invariante Kette $V\alpha 14J\alpha 281$ [48, 49], und Antigene CD1d-restringiert erkennt [50]. NKT-Zellen sezernieren nach einer Aktivierung mit hoher Geschwindigkeit große Mengen an $IFN\gamma$ und IL-4 [48, 51, 52], spielen eine Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen und Viren [53, 54] und verhindern das Entstehen von Autoimmunkrankheiten [55, 56].

Das Expressionsmuster von NKT-Zellen zeigt mit der Expression von $CD44^{hi}$, $CD45RB^{lo}$ und $CD62^{lo}$ einen aktivierten, bzw. *memory* Phänotyp [57, 58]. In der Literatur wurden die klassischen NKT-Zellen zunächst als $CD4^+$ bzw. doppelt-negativ beschrieben [48, 59-61], jedoch konnte gezeigt werden, daß es sich bei NKT-Zellen um eine sehr heterogene Population von Zellen handelt, die sich im Phänotyp und in der Funktion unterscheiden. So wurde z.B. neben den $CD4^+$ und doppelt-negativen NKT-Zellen auch eine Population $CD8^+$ NKT-Zellen gefunden, die angereichert ist mit $CD8\alpha^+\beta^-$ Zellen [62, 63]. Auch bezieht sich die Expression des Markers NK1.1 nur auf Mausstämme, die das NK1.1 Allel exprimieren, wie z.B. C57BL/6 [60, 64]. $NK1.1^+$ NKT-Zellen sind in der Regel $CD4^+$ oder doppelt negativ, $NK1.1^-$ NKT-Zellen dagegen vornehmlich $CD8^+$ [65-67]. Während die Mehrheit der $CD4^+$ NKT-Zellen CD69 exprimiert, konnte dies für $CD8^+$ NKT-Zellen nur zu einem geringen Anteil festgestellt werden [62].

Eine weitere Besonderheit von NKT-Zellen ist, daß sie die IL-2-Rezeptor- β -Kette (CD122) exprimieren und den T-Zellrezeptor in intermediärer Dichte. Dies trifft noch auf eine Reihe weiterer T-Zellsubpopulationen zu, so daß Zellen dieses Phänotyps insgesamt als intermediäre T-Zellen bezeichnet werden [59-61].

Die immunsuppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 nehmen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Effektorfunktionen regulatorischer T-Zellen ein. IL-10 ist ein Zytokin mit immunsuppressiver und anti-inflammatorischer Wirkung, dessen Funktion bisher vornehmlich in Zusammenhang mit CD4⁺ T-Zellen untersucht wurde, vor allem mit CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen. Dabei wird teilweise von einer sehr hohen Produktionsrate berichtet [68, 29]. IL-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Immunregulation des darmassoziierten lymphatischen Gewebes [67-73], beim Langzeit-Überleben allogener Transplantate [74], sowie dem Aufrechterhalten peripherer T-Zell-Toleranz [75] und der CD4⁺ T-Zell-Homeostase [76]. Des Weiteren hat es einen negativ-regulierenden Effekt auf die Produktion von IL-2 und die Expression von CD25 [77].

TGF- β hat einen antiproliferativen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen und verhindert die Differenzierung von Th1 und Th2 Helferzellen. Es inhibiert außerdem die Aktivierung von Makrophagen und ihre Fähigkeit, proinflammatorische Zytokine zu produzieren [78].

Die Produktion und Funktion der beiden Zytokine scheinen über eine positive *Feedback*-Schleife verbunden zu sein, wobei IL-10 die Produktion von TGF- β verstärkt und umgekehrt [78].

Auch IFN γ werden antiproliferative und immunmodulierende Fähigkeiten zugeschrieben, seine Rolle in der T-Zellhomeostase wurde bereits beschrieben. Es beeinflusst die Entstehung der experimentell allergischen Enzephalomyelitis [79, 80], hat Einfluß auf die Tumormunität [81] und es unterdrückt die Expression von IL-10 in Monozyten [82-84].

Ebenso wird für IL-4 eine immunregulatorische Wirkung vermutet, wobei das Zytokin allein nicht vor Autoimmunreaktionen schützen kann. Es wird deswegen diskutiert, ob es nur für einige Subpopulationen regulatorischer T-Zellen eine Rolle spielt und dabei eher als Wachstumsfaktor fungiert [42]. Neben der Rolle der sezernierten Zytokine in der Vermittlung der regulatorischen Aktivität und des membrangebundenen TGF- β verweisen andere Modelle auf das bereits kurz erwähnte CTLA-4 und GITR. So verhinderte die Blockade von CTLA-4 in einem Transplantationsmodell die regulatorische Wirkung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen [85, 86]. Die Expression von CTLA-4 scheint funktionell mit regulatorischen T-Zellen assoziiert zu sein, ist aber nicht spezifisch auf diese Zellpopulation beschränkt [86]. GITR wird im Gegensatz zu CTLA-4 von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen nicht konstitutiv, sondern erst nach Aktivierung exprimiert [86]. Die Aktivierung des Rezeptors durch Antikörper neutralisiert die immunregulatorische Wirkung der T-Zellen und induziert Autoimmunerkrankungen [87,88]

Ein weiteres Ligandenpaar mit regulatorischer Wirkung ist das Fas/FasL-System, das über Zell-Zell-Kontakt in der Zielzelle Apoptose induziert [89, 90].

Für alle Populationen regulatorischer T-Zellen gilt, daß sie sich in Bezug auf Phänotyp und Zytokinprofil teilweise überlappen, so daß es möglich ist, daß sie tatsächlich oder zumindest funktionell miteinander verwandt sind [91].

Die T-Zell-vermittelte Immunregulation dient nicht nur zur Kontrolle der Immunantwort auf Selbst-Antigene, sie kann auch verwendet werden, um die Immunantwort auf Fremdantigene zu unterdrücken, vor allem im Falle einer Organtransplantation. Nach einer Transplantation wird das neue Organ vom Immunsystem als fremd erkannt und bekämpft, d.h. abgestoßen. Dies kann durch die Gabe von Immunsuppressiva verhindert werden, mit der nicht unerheblichen Folge, daß dabei das gesamte Immunsystem beeinträchtigt wird und eine Verteidigung gegenüber Pathogenen und Krebszellen nur noch eingeschränkt möglich ist. Dagegen stellt die Möglichkeit, regulatorische T-Zellen einzusetzen, um die Abstoßungsreaktion zu

unterdrücken, eine zielgenaue Methode dar, die alle weiteren Bereiche des Immunsystems unbeeinträchtigt läßt [86, 92, 93].

Zahlreiche Modelle befassen sich mit der Rolle regulatorischer T-Zellen in der Transplantationstoleranz, so konnte z. B. $CD4^+CD25^+$ T-Zellen eine Rolle nachgewiesen werden bei der Akzeptanz von sowohl soliden Transplantaten, als auch von Knochenmark [86] und z.B. für $CD45^{+}RB^{lo}$ T-Zellen bei der Akzeptanz eines Pankreas-Transplantates [94].

1.1.5 Das Modell MHC-Klasse-I (H-2K^b) und anti-K^b-T-Zellrezeptor doppelt transgener Mäuse

Insgesamt beschäftigen sich nur sehr wenige Modelle mit der Subpopulation $CD8^+$ regulatorischer T-Zellen. Wir etablierten deswegen ein MHC-Klasse-I-restringiertes Mausmodell, indem wir Mäuse kreuzten, die transgen sind für das MHC-Klasse-I-Molekül H-2K^b, mit Mäusen, die transgen sind für einen anti-K^b-T-Zellrezeptor.

Die H-2K^b transgenen Mäuse exprimieren das MHC-Molekül ubiquitär in geringerer Dichte als der Wildtyp und werden deswegen im folgenden als „K^{b-lo}“ bezeichnet [11]. Der anti-K^b-T-Zellrezeptor kann mit dem monoklonalen Antikörper Désirée-1 nachgewiesen werden [95], deswegen wird im folgenden der Mausstamm und der T-Zellrezeptor kurz mit „Des“ bezeichnet. Das Antigen K^b wird auch im Thymus der F₁-Generation (im folgenden Des-TZR x K^{b-lo} genannt) in geringer Dichte exprimiert. Dies hat zur Folge, daß Des-TZR transgene Thymozyten nicht vollständig negativ selektioniert werden und in der Peripherie Des-TZR transgene T-Zellen nachgewiesen werden können, die entweder den T-Zellrezeptor (TZR) und den CD8-Ko-rezeptor in geringer Dichte exprimieren (Des-TZR^{lo}CD8^{lo}) oder nur den Des-T-Zellrezeptor in intermediärer Dichte (Des-TZR^{int}CD8⁻) [11].

Des x K^{b-lo} Mäuse zeigen keine Anzeichen von Autoimmunität; K^b-transgene Hauttransplantate werden nicht abgestoßen und in einer gemischten Lymphozyten-Reaktion zeigten Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen keine Proliferation, auch nicht in

Gegenwart von exogenem IL-2, d.h. Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen verhalten sich gegenüber ihrem Antigen K^b *in vivo* und *in vitro* tolerant [11 sowie unveröffentlichte Daten]. In einem *Graft-versus-Host*-Modell konnte bewiesen werden, daß Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen die Fähigkeit besitzen, regulatorisch auf das Immunsystem einzuwirken: erhalten K^{b-lo} -Mäuse eine Injektion von 10^6 Des-TZR-Lymphknotenzellen, sterben sie innerhalb von 20 Tagen an einer *Graft-versus-Host*-Reaktion. Erhalten sie aber gleichzeitig eine Koinjektion von 10^6 oder mehr Des-TZR x K^{b-lo} -Lymphknotenzellen, sind sie vor den letalen Folgen der Krankheit geschützt [96].

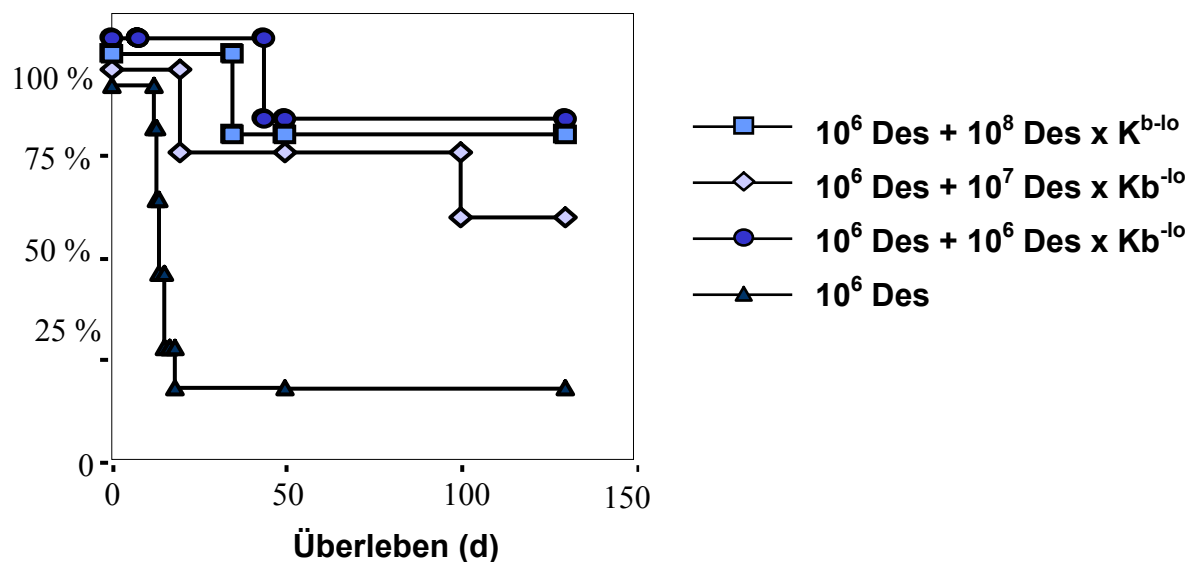


Abb. 2: Anzahl überlebender Mäuse in Prozent nach Injektion von 10^6 Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen mit und ohne Koinjektion von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen.

1.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Basierend auf den Erkenntnissen einer regulatorischen Aktivität sollten mit der vorliegenden Arbeit Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen in einem doppelt transgenen Mausmodell charakterisiert werden. Mit Hilfe durchflußzytometrischer Methoden wurde der Phänotyp der adulten Lymphozyten ermittelt und die Ontogenese der unreifen Vorläuferzellen im Thymus verfolgt.

Mit Hilfe von Transferexperimenten wurde das Verhalten der T-Zellen in einem lymphopenen Empfänger bei An- und Abwesenheit des positiv-selektionierenden MHC-Komplexes untersucht, außerdem wurden Untersuchungen zum apoptotischen Verhalten *in vitro* vorgenommen.

Die T-Zellen unseres Tiermodells sind in der Lage, eine letale *Graft-versus-Host*-Reaktion zu unterdrücken. Um den Mechanismus dieser Regulation zu erforschen, wurden die Zellen *in vitro* durch quervernetzende Antikörper stimuliert und die Überstände mit Hilfe der ELISA-Technik auf die Expression der Zytokine IL-2, IL-10, TGF β und IFN γ untersucht.

Phänotyp und Verhalten der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen wurde jeweils mit Des-TZR transgenen T-Zellen der Parentalgeneration verglichen, die keine regulatorischen Fähigkeiten hinsichtlich der untersuchten Parameter besitzen. Von den Untersuchungen erhofften wir uns Erkenntnisse über die Art und das Verhalten der regulatorischen Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen.

2.1 Tiere und Tierhaltung

2.1.1 Tierschutzrechtliche Bestimmungen

Eine Genehmigung der Tierversuche durch die Bezirksregierung Hannover lag vor (Aktenzeichen 509i-42502-00/273). Weiterhin lag eine Ausnahmegenehmigung vor zur Durchführung von nichtoperativen Eingriffen und Behandlungen von Mäusen gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes. Kenntnisse für einfache operative Eingriffe waren während der Diplomarbeit zur Erlangung des Grades einer Diplom-Biologin erworben und durch den Leiter des Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover, Herrn Prof. Hedrich, bestätigt worden.

2.1.2 Verwendete Stämme

Alle verwendeten Maus-Stämme sind transgene Inzuchtstämme mit B10.BR-Hintergrund (H-2^k), die in den Räumen des zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule unter der Leitung von Prof. Hedrich gehalten wurden. Für Versuche wurden nur heterozygote Tiere verwendet.

2.1.3 H-2K^b transgene Mäuse

Mäuse des Stammes 179-4 exprimieren ubiquitär das MHC-Klasse-I-Molekül H-2K^b als Transgen unter der Kontrolle seines genomischen Promotors. Die Expressionsdichte liegt bei ca. 33% gegenüber der Expressionsdichte einer Wildtyp-Maus (C57Bl/6), daher werden die Tiere dieses Stammes im folgenden als „K^{b-lo}“ bezeichnet [11].

2.1.4 T-Zellrezeptor-transgene Mäuse

Mäuse dieses Stammes exprimieren bei einem H-2K^k-Hintergrund auf allen reifen T-Lymphozyten einen rearrangierten H-2K^b-spezifischen T-Zellrezeptor. Das Transgen wurde aus dem CD8-abhängigen CTL-Klon KB5.C20 isoliert und wird unter der Kontrolle des endogenen Promotors und des *β-chain enhancers* auf T-Zellen exprimiert [97]. Der H-2K^b-spezifischen T-Zellrezeptor liegt bereits rearrangiert vor. Er hat somit bei der T-Zell-Differenzierung im Thymus einen Vorteil gegenüber anderen T-Zellrezeptoren und wird noch vor der Reifung der endogenen Rezeptoren ausgebildet.

Der Vorteil ist nicht absolut, d.h. die Ausbildung endogen rearrangierter T-Zellrezeptoren wird nicht vollständig supprimiert, so daß einerseits T-Zellen vorliegen, die den transgenen Rezeptor ausschließlich und in hoher Dichte exprimieren, und andererseits Zellen, die die endogenen TZR- α Rezeptoren in hoher Dichte exprimieren und zusätzlich den transgenen in geringer Dichte [98].

Da fast ausschließlich T-Zellen einer Spezifität vorliegen, zeigen die Tiere dieses Stammes eine reduzierte Resistenz gegenüber Infektionen.

Der Nachweis des transgenen T-Zellrezeptors erfolgt durch den Klonotypspezifischen Antikörper Désirée-1, der freundlicherweise von Ann-Marie Schmitt-Verhulst zur Verfügung gestellt wurde [95]. Die T-Zellrezeptor-transgenen Tiere waren freundlicherweise von Prof. Bernd Arnold zur Verfügung gestellt worden [97] und werden im folgenden als „Des-TZR“-transgen bezeichnet.

2.1.5 nicht-transgene Mäuse

Als nicht-transgene Kontrollen wurden Tiere des Stammes B10.BR und BALB/c verwendet.

2.1.6 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in einem als Genlabor der Sicherheitsstufe S1 genehmigten Raum des Zentralen Tierlabores der Medizinischen Hochschule Hannover, in Gruppen von unterschiedlicher Größe in durchsichtigen Makrolon-Käfigen des Typs III auf staubfreiem Weichholzgranulat.

Die Tiere wurden mit pelletiertem, spezialbehandeltem Futter (1324 N; Altromin, Lage) und Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Einstreu, Futter und Trinkwasser wurden wöchentlich ausgetauscht. Eine Analyse auf Kontamination des Tierbestandes erfolgte regelmäßig alle drei Monate.

Die Temperatur (20°C +/- 2°C) und die relative Luftfeuchtigkeit (50% +/- 5 %) in den Tierräumen wurde elektronisch überwacht, die Beleuchtung erfolgte in einem 12stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus bei 300 Lux.

2.2 Narkotika

Für Operationen wurde ein Narkotikum verwendet, das in Endkonzentration 5 % (v/v) Ketamin (Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, Dr. E Gräub AG, Bern) und 5 % (v/v) Rompun (Wirkstoff Xylazinhydrochlorid, Bayer, Leverkusen) in PBS enthielt. Zur kurzzeitigen Betäubung sowie zum Töten wurde CO₂ verwendet.

2.3 Medien und Puffer

Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Lagerung bei 4°C.

2.3.1 Kulturmedium

RPMI 1640 wurde in 500 ml-Flaschen von GIBCO invitrogen corporation (Karlsruhe) bezogen. Um den kultivierten Zellen alle nötigen Wachstumsfaktoren zukommen zu lassen, wurde dem Medium 10 % (v/v) in Endkonzentration hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin) zugesetzt. Weiterhin wurden zugefügt: 4 mM Glutamin (Biochrom, Berlin), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin) und 0,1 nM β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt).

2.3.2 Kulturmedium mit ³H-Thymidin

Für Proliferationsmessungen wurde Kulturmedium im Verhältnis 1:50 mit ³H-Thymidin (über Nuklearmedizin, Medizinische Hochschule Hannover) versetzt.

2.3.3 Medium 199

Medium 199 wurde als Pulver von Applichem (Darmstadt) bezogen. Eine Einheit wurde in 10 l *A. bidest* gelöst und sterilfiltriert.

2.3.4 Dulbecco's phosphatgepufferte Saline (DPBS)

DPBS ohne Calcium und Magnesium wurde als Pulver von Biochrom (Berlin) bezogen. 95,5 g wurden in 10 l *A. bidest* gelöst und sterilfiltriert.

2.3.5 Hämolysepuffer

8,29 g NH_4Cl , 0,037 g Dinatrium-EDTA-2-Hydrat und 0,839 g NaHCO_3 (alles Merck, Darmstadt) wurden in 900 ml *A.bidest.* gelöst, der pH auf 7,6 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

2.3.6 Trypanblau-Lösung

Trypanblau (Fluka, Schweiz) wurde 0,16 %ig (m/v) in DPBS gelöst.

2.4 Puffer und Lösungen für die Aufreinigung und Markierung von Antikörpern

2.4.1 Waschpuffer

Eine 20 mM Na_2HPO_4 -Lösung und eine 20 mM NaH_2PO_4 -Lösung (Merck, Darmstadt) wurden gemischt, bis sich ein pH-Wert von 7,0 einstellte.

2.4.2 Elutionspuffer

7,507 g Glycin (Merck, Darmstadt) wurden in 900 ml *A.bidest* mit 1 M HCl (Merck, Darmstadt) auf pH 2,7 eingestellt und anschließend mit *A.bidest* auf 1l aufgefüllt.

2.4.3 Neutralisationspuffer

121,14 g Tris (Merck, Darmstadt) wurden in 900 ml *bidest. H₂O* gelöst, mit 1 M HCl (Merck, Darmstadt) auf pH 9,0 eingestellt und mit *A.bidest* auf 1 l aufgefüllt.

2.4.4 Regenerationspuffer I

60,06 g Harnstoff (Merck, Darmstadt) wurden in 400 ml bidest. H₂O gelöst, mit 1 M HCl (Merck, Darmstadt) auf pH 7.0 eingestellt und anschließend mit *A.bidest* auf 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde eingestellt, wenn die Lösung Raumtemperatur hatte.

2.4.5 Regenerationspuffer II

100 ml Neutralisationspuffer wurden mit 800 ml *A.bidest* verdünnt, anschließend wurden 29,22 g NaCl (Merck, Darmstadt) in die Lösung gegeben. Der pH-Wert wurde eingestellt, wenn die Lösung Raumtemperatur hatte, anschließend wurde die Lösung auf 1 l aufgefüllt.

2.4.6 Kopplungspuffer für die Biotinylierung und FITC-Konjugation

Eine 0,1 mM Na₂CO₃-Lösung und eine 0,1 mM NaHCO₃-Lösung (Merck, Darmstadt) wurden gemischt, bis sich für die Biotinylierung ein pH-Wert von 7,7 einstellte und für die FITC-Konjugation ein pH-Wert von 9,2.

2.4.7 Biotin-Stammlösung

Unmittelbar vor Gebrauch wurde 1 mg/ml Biotin (Biotinamidocaproat N-Hydroxy-succinimid Ester, Sigma, München) in Dimethylformamid (DMF, Merck, Darmstadt) gelöst. Es wurden Glasröhrchen verwendet, da DMF Kunststoff angreift.

2.4.8 FITC-Stammlösung

Unmittelbar vor Gebrauch wurde 1 mg Fluorescein-Isothiocyanat *Mixed Isomers* (FITC, Sigma, München) in 500 µl Kopplungspuffer gelöst.

2.5 Lösungen und Antikörper für die durchflußzytometrische

Analyse

2.5.1 FACS-Puffer

500 ml DPBS wurden 0,02 % (v/v) NaN_3 sowie 2 % (v/v) FCS in Endkonzentration zugesetzt. NaN_3 (Merck, Darmstadt) wurde als 10 %ige (w/v) Stammlösung in *A.bidest* angesetzt.

2.5.2 Fertiglösungen für die Durchflußzytometrie

Als Trägerflüssigkeit wurde FACS Flow™ verwendet, FACS Rinse™ zur Reinigung und FACS Safe™ zur Desinfektion (alle Becton Dickinson, Heidelberg).

2.5.3 CFSE-Lösung

Verwendet wurde eine 5 mM Lösung vom CFDA, SE Succinimidylester des Fluoresceinisothiocyanats, (CFDA, SE, genannt CFSE, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, München). Die Lösung wurde in Aliquots eingefroren und zum Gebrauch erneut in DMSO verdünnt.

2.5.4 Antikörper

Folgende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin, Biotin oder Fluoreszinothiocyanat konjugierte Antikörper wurden für die Analyse am Durchflußzytometer verwendet. Die monoklonalen Antikörper wurden entweder von BD Pharmingen (Heidelberg) bzw. Caltag (Hamburg) erworben oder wurden mit Hilfe von Hybridomzellen selbst hergestellt.

Spezifität	Klon	Isotyp	Referenz
anti-TZR β -Kette ¹	H57-597	arm. Hamster IgG, Gruppe 2, λ	[99]
Caspase-3, aktive Form ²	Polyklonal	Kaninchen	[100]
CD4 ³	GK1.5 (L3T4)	Ratte IgG _{2b} , κ	[101]
CD8 α ²	53-6.7	Ratte IgG _{2a} , κ	[102]
CD8 β ²	53-5.8	Ratte IgG ₁ , κ	[102]
CD11b ¹	M1/70	Ratte IgG _{2b} , κ	[103]
CD19 ¹	1D3	Ratte IgG _{2a} , κ	[104]
CD24 ¹	M1/69	Ratte IgM, κ	[103]
CD25 ¹	PC61	Ratte IgG ₁ , λ	[105]
CD28 ²	37.51	Hamster IgG ₂	[106]
CD44 ²	IM7	Ratte IgG _{2b} , κ	[107]
CD45.1 ¹	A20	Maus IgG _{2a} , κ	[108]
CD45.2 ¹	104	Maus IgG _{2a} , κ	[108]
CD45R ¹	RA3.6B2 (B220)	Ratte IgG _{2a} , κ	[109]
CD45RB ²	16A	Ratte IgG _{2a} , κ	[110]
CD62L ¹	MEL-14	Ratte IgG _{2a} , κ	[111]
CD69 ²	H1.2F3	arm. Hamster IgG, Gruppe 1, λ	[112]
CD122 ²	TM β 1	Ratte IgG _{2b} , κ	[113]
Des-TZR-Klonotyp ¹	Desirée-1	Maus IgG _{2a} , κ	[95]
Ly-6G (Gr-1) ¹	RB6.8C5	Ratte IgG _{2b} , κ	[114]
anti-K ^{b1}	K9.178	Maus IgG _{2a} , κ	[115]
NK-1.1 ²	PK136	Maus IgG _{2a} , κ	[116]
anti-Thy1.2 ¹	T24	Ratte IgG	[117]
CD54 ¹	YN-1	Ratte IgG _{2b} , κ	[118]

Tab. 1: Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Antikörper; angegeben sind Spezifität, Klon, Isotyp und der Literatur-Nachweis (Referenz). ¹ eigene Produktion, ² BD Pharmingen, ³ Caltag.

2.6 Antikörper-Aufreinigung

Die Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen erfolgte über eine ProteinG-Säule (High Trap ProteinG Sepharose, Pharmacia, Erlangen in einer *Econo Columns* Säule, Biorad, München, Volumen ca. 5 ml) bei 4°C. Es wurde die Chromatographie-Anlage LKB GP-10 von Pharmacia, Erlangen verwendet, einschließlich der Pumpe LKB Pump-1, dem Detektor LKB

Uvicord SII (Detektion von Protein im UV-Bereich bei 280 nm) und dem Schreiber LKB Rec 101. Die Säule wurde zu Beginn mit Waschpuffer equilibriert, d.h. mit dem fünffachen Säulenvolumen gespült bei einer Flußrate von 1–2 ml/Min. Der Hybridom-überstand wurde mit HCl angesäuert, bis sich ein pH-Wert von 6,7 ergab, und über einen 0,45 µm-Zellulose-Acetat-Filter (Sartorius, Göttingen) gegeben.

Anschließend wurde der Überstand über die ProteinG-Säule gegeben, bei einer Flußrate, die nicht über 1 ml/Min. lag. Nicht gebundene Substanzen wurden mit Waschpuffer solange bei einer Flußrate von 1–2 ml/Min. herausgespült, bis kein Proteinpeak am Schreiber mehr sichtbar war (Nulllinie).

Zur Elution gebundener Immunglobuline wurde der Elutionspuffer mit einer Flußrate von 1 ml/Min. über die Säule gegeben. Sobald ein Proteinpeak sichtbar wurde, wurde das Eluat in einem 50 ml-Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen, welches 0,5 – 1 ml Neutralisationspuffer enthielt. Das Auffangen wurde abgebrochen, sobald der Peak wieder fiel.

Die Antikörper-Fraktion wurde sofort gegen DPBS dialysiert, indem die Lösung in einen Dialysierschlauch (Visking, Roth, Karlsruhe) überführt wurde und dieser anschließend in ein Gefäß mit 500 ml DPBS kam. Inkubiert wurde unter Rühren für 24 h bei 4°C, das DPBS wurde dreimal ausgetauscht.

Vorbereitung der Dialysierschläuche: Ein Schlauch wurde in 20 cm große Stücke geschnitten und in einem Becherglas mit *A.bidest* zum Kochen gebracht, das Wasser wurde dabei zweimal gewechselt. Schläuche, die nicht sofort verwendet wurden, wurden in *A.bidest* mit 0,02 % (v/v) NaN₃ bei 4°C gelagert und vor Gebrauch mit *A.bidest* gespült. Zur Regeneration wurde so lange Elutionspuffer über die ProteinG-Säule gegeben, bis alle Immunglobuline eluiert waren (Nulllinie), danach wurde in folgender Reihenfolge mit dem jeweils fünffachen Säulenvolumen gespült: Regenerationspuffer I, Regenerationspuffer II, Elutionspuffer, Waschpuffer und zur Aufbewahrung abschließend mit 20 % Ethanol.

2.7 Konjugation der Antikörper

2.7.1 Biotinylierung

Zum Umpuffern der Antikörper-Lösung wurden PD10-Säulen (Pharmacia, Erlangen) mit 20 ml Kopplungspuffer pH 7,7 equilibriert. Die Antikörper-Lösung wurde in einer Konzentration von 3,5 mg in 2,5 ml auf die Säule gegeben.

Nach dem Waschen der Säule wurde der Kopplungspuffer vollständig eingelassen, so daß sich keine Flüssigkeit mehr über der Säule befand. Die Antikörper-Lösung wurde auf die Säule gegeben und vollständig eingelassen, das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurde 3,5 ml Kopplungspuffer aufgetragen, das Eluat (nun in einer Konzentration von 1 mg/ml) wurde aufgefangen und die Säule mit DPBS equilibriert.

Das umpufferte Eluat wurde mit Biotin versetzt, indem das entsprechende Volumen von 50 µg Biotin/mg (Stammlösung) auf die Antikörper-Lösung pipettiert wurde. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Min. unter leichtem Schütteln (Schüttler über Roth, Karlsruhe).

2,5 ml der Lösung wurden auf die DPBS-equilibrierte PD10-Säule gegeben, das Eluat wurde verworfen, dann folgten 3,5 ml DPBS, das Eluat wurde aufgefangen. Zum restlichen Milliliter der Antikörper-Lösung wurden 1,5 ml DPBS gegeben und ebenfalls wie oben beschrieben auf die PD10-Säule gegeben. Die beiden Fraktionen wurden getrennt austitriert.

2.7.2 Konjugation mit FITC

Das Verfahren gleicht der unter 2.7.1 beschriebenen Biotinylierung mit der Ausnahme, daß die Inkubation für 4 h unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur erfolgte.

Bei der anschließenden Elution erhielt man zwei gelbe Fraktionen, die erste Fraktion enthielt den mit FITC konjugierten Antikörper, die zweite unkonjugiertes FITC, welches auch beim Eluieren der zweiten Fraktion der Antikörper-Lösung in der Säule verblieb.

2.8 Organentnahme

2.8.1 Blutentnahme

Mit einer Mikro-Hämatokrit-Kapillare (75 mm von Brand, Wertheim) wurde bei einer narkotisierten Maus retrobulbär Blut entnommen, in ein 5 ml Polystyren-Rundboden-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und auf Eis gehalten.

Auf die Blutprobe kamen 3 ml Hämolyse-Puffer, es wurde sofort resuspendiert und für 3 Min. bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet wurde in 5 ml FACS-Puffer aufgenommen und wieder zentrifugiert. Für diesen Vorgang, also Dekantieren des Überstandes, erneutes Aufnehmen und zentrifugieren bei 300 x g und 4°C wird im folgenden der Begriff „Waschen“ verwendet.

Die Zellen wurden ungezählt für die durchflußzytometrische Analyse verwendet.

2.8.2 T-Zell-Depletion im Tier

Zur Depletion von T-Zellen im Tier wurden dem Empfänger 400 µg vom Antikörper anti-Thy1.2 in Lösung intraperitoneal verabreicht. Die Depletion wurde nach wenigen Tagen durchflußzytometrisch überprüft.

2.8.3 Entnahme von Lymphknoten und Milz

Die Maus wurde mit CO₂ getötet und anschließend mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Mit einer chirurgischen Pinzette (alle Instrumente Aesculap über Medicalis, Garbsen) wurde das Fell unterhalb der Rippen gegriffen und mit einer Schere vorsichtig hineingeschnitten, um die Bauchdecke nicht zu verletzen.

Der Schnitt wurde transversal erweitert und das Fell nach cranial und caudal abgezogen. In folgender Reihenfolge wurden die Lymphknoten entnommen: axillär, submandibulär, danach inguinal. Zuletzt wurde mit einem Schnitt in Höhe der Leber das Peritoneum geöffnet, die mesenterialen Lymphknoten entnommen und danach die Milz.

Die Organe wurden in 10 ml Medium 199 aufgenommen und bis zur folgenden Homogenisierung auf Eis gelagert.

Die Homogenisierung erfolgte in einem Edelstahl-Sieb (Maschenweite 0,2 µm, Anfertigung durch die Forschungswerkstatt der Medizinischen Hochschule Hannover), indem die Organe mit Hilfe eines 5 ml-Spritzenstempels (Braun, Melsungen) durch das Sieb gerieben wurden.

Die Milzzellen wurden anschließend einer Hämolyse unterzogen: die Zellsuspension wurde bei 300 x g für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 5 ml Hämolyse-Puffer aufgenommen und für 5 – 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder bei 300 x g für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert und das Pellet zweimal gewaschen.

Die Zellsuspensionen wurden in 10 ml DPBS oder FACS-Puffer aufgenommen, gezählt und je nach Versuch auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Das Zählen erfolgte in Trypanblau, um tote Zellen auszuschließen.

2.8.4 Entnahme des Thymus beim adulten Tier

Die Maus wurde wie unter 2.7.1 beschrieben getötet, desinfiziert und anschließend mit Hilfe von Stecknadeln auf einem Korkbrett fixiert. Das Fell wurde mit einer Pinzette unterhalb der Rippen gegriffen und mit einer kleinen Schere vorsichtig hineingeschnitten, um das Peritoneum nicht zu verletzen. Die geschlossenen Schere wurde zwischen Fell und Peritoneum zum Kiefer geführt und das Fell wurde entlang dieses Kanals aufgeschnitten. Desgleichen wurde mit den Extremitäten verfahren, dann wurde das Fell abgelöst.

Mit einem Schnitt in Höhe der Leber wurde das Peritoneum eröffnet, der Einschnitt wurde vorsichtig erweitert. Durch Anschneiden des Zwerchfells wurde das pleurale Vakuum aufgehoben. Um das Sternum herum wurde der Thorax großzügig entfernt, um den Thymus freizulegen. Das Organ wurde mit einer Pinzette vorsichtig gegriffen und herausgelöst, anschließend in Medium 199 überführt und bis zur Homogenisierung auf Eis gelagert.

2.8.5 Entnahme des Thymus beim neonatalen Tier

Das Tier wurde mit Hilfe einer starken Schere decapitiert. Mit einer kleinen Schere wurde anschließend der Thorax vorsichtig angehoben und durchtrennt. Der nun sichtbare Thymus wurde entnommen und in Medium 199 auf Eis gelagert.

2.8.6 Thymektomie

Ein vier bis sechs Wochen altes narkotisiertes Tier wurde mit Hilfe von Gummibändern auf ein Korkbrett fixiert. Unter den Nacken wurde eine etwa daumendicke Rolle gelegt. Der Nacken wurde überstreckt, indem ein Bindfaden um die Zähne des Tieres gelegt und mit einer Stechnadel auf dem Korkbrett festgesteckt wurde. Der Bereich zwischen Thorax und Kiefer wurde vorsichtig mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. In Höhe des Jugulums wurde ein Einschnitt in das Fell gesetzt und bis zum Thorax erweitert.

Eine spitze Schere wurde unter das Jugulum geführt und am „V“ der oberen Rippen ein Schnitt gesetzt. Der Schnitt wurde auf der anderen Seite wiederholt. Das dabei entstandene Dreieck und die darunterliegende Muskulatur wurde entfernt, dadurch wurde der Thymus sichtbar.

An eine Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde über ein Gummischlauch eine Pasteurpipette (Roth, Karlsruhe) angeschlossen, deren Spitze so weit abgeschmolzen worden war, das sich eine Öffnung ergab, die in etwa der Größe des Thymus entsprach.

Durch das Entfernen des Thymus wurde das pleurale Vakuum aufgehoben. Damit die Lunge hierbei nicht zusammenfiel, wurde für die Dauer der Operation die Atmung der Maus unterbunden. Mit dem Zeigefinger und Daumen der linken Hand wurde der Thorax der Maus umfaßt, mit dem Mittelfinger wurde gegen das Diaphragma gedrückt. Sofort wurde mit der rechten Hand die Pasteurpipette an den Thymus gesetzt und das Gewebe mit leicht massierenden Bewegungen herausgesaugt.

Nach Absaugen des Thymus wurde das Fell mit einer Pinzette gegriffen und mit Hilfe einer Hautklammer (*Autoclip 9 mm wound clip system* von Clay Adams™ über Becton Dickinson, USA) verschlossen.

2.9 Durchflußzytometrische Anwendungen

2.9.1 Färbung mit fluoreszenz-markiertem Antikörper

Es wurden 5×10^5 Zellen in FACS-Puffer vorliegend in ein 5 ml Polystyren-Rundboden-Röhrchen überführt. Eine Ausnahme bildet die Färbung von Thymuszellen neonataler Tiere: hier wurde ohne zu zählen die Hälfte des Organs entnommen, homogenisiert und auf die Röhrchen verteilt. Bei älteren Jungtieren (bis zu 10 Tage) wurde ein Stück des Organs entnommen, das in seiner Größe dem Organ neonataler Tiere gleich. Alle Zellen wurden über die gesamte Zeit bei 4°C bzw. auf Eis gehalten. Auf die Zellen wurden jeweils 20 µl Antikörper-Lösung in optimaler

Konzentration gegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und für 20 Min. bei 4°C in Dunkelheit inkubiert, anschließend zweimal mit 2 ml FACS-Medium für 3 Min. gewaschen. Bei Verwendung biotinylierter Antikörper erfolgte eine zweite Färbung mit streptavidin-konjugiertem Tri-Color oder Allophycocyanin (APC) (beide Caltag, Hamburg).

Die Erfassung von 10.000 Ereignissen/Probe erfolgte am FACScan oder am FACScalibur (beide Becton Dickinson, Heidelberg), die Datenerfassung und Auswertung mit Cell Quest Pro und WinMDI.

2.9.2 Färbung mit anti-Caspase-3-Antikörper

Um die aktive Form der Caspase-3 intrazellulär nachweisen zu können, wurden 10^6 Zellen mit dem Cytotfix/Cytoperm Kit von BD Pharmingen (Heidelberg) gemäß Anleitung behandelt. Die Zellen wurden zunächst mit Antikörpern gegen Oberflächen-Marker inkubiert, danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Anti-Caspase-3-Antikörper gegengefärbt.

2.9.3 CFSE-Färbung

Lymphknoten wurden wie unter 2.8.1 beschrieben entnommen und homogenisiert. 10^7 Lymphknotenzellen wurden jeweils in DPBS in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) aufgenommen. Ein Aliquot der CFSE-Lösung wurde 1:20 in DMSO verdünnt. Davon wurden 5 µl an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert und die Zellen schnell resuspendiert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation in einem Wasserbad (Jürgens über Omnilab, Hannover) bei 37°C. Anschließend wurden die Lymphknotenzellen in einem 50 ml-Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) vereinigt und zweimal mit DPBS gewaschen.

Die Zellen wurden durch ein Sieb gegeben, auf die gewünschte Zellzahl in DPBS eingestellt und den Mäusen intravenös durch die Schwanzvene verabreicht. Das Aliquot der CFSE-Lösung wurde eingefroren und mehrmals verwendet.

Bei der abschließenden Messung am Durchflußzytometer wurden 100.000 Ereignisse/Probe erfaßt.

2.10 Zellkultur

Viele der verwendeten Antikörper wurden mit Hilfe von Hybridomzellen selbst produziert. Die Zellen wurden in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank von Haereus (Hanau) kultiviert.

2.10.1 Einfrieren von Hybridomzellen

Der Inhalt einer Kulturflasche (Nunc Surface 160 ml, bis maximal 50 ml gefüllt) wurde bei 300 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C eingefroren bis zur Aufreinigung der Antikörper, das Zellpellet wurde auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Dabei wurden die Zellen in 90% des errechneten Volumens aufgenommen und jeweils 900 µl in eine 2 ml-Mikro-Röhre zur Kryolagerung (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Auf die Zellsuspension kam 100 µl DMSO, anschließend wurden die Zellen bei -80°C eingefroren.

2.10.2 Auftauen von Hybridomzellen

Der Inhalt einer 2 ml-Mikro-Röhre wurde schnell aufgetaut, in ein 50 ml-Reaktionsgefäß mit DPBS überführt und zweimal gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer Kulturflasche ausgesät.

2.11 *in vitro* Testverfahren

2.11.1 Aktivierung von T-Zellen durch vernetzende Antikörper

Eine Mikrotiterplatte (Nunclon Surface von Nunc, 96 Kavitäten, Flachboden) wurde mit Antikörper beschichtet, indem in jede Kavität mit Ausnahme der Negativkontrollen 100 µl einer Antikörperlösung (10 mg/ml anti-TZRβ-Kette + 10 mg/ml CD28 bzw. Des-TZR-Klonotyp + 10 mg/ml CD28) pipettiert wurden. Es folgte eine Inkubation für 24 h bei 4°C. Wie unter 2.8.1 beschrieben, wurden von den zu testenden Mäusen Lymphknotenzellen entnommen, vereinzelt und in Kulturmedium auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. In einer Mikrotiterplatte (Nunclon Surface von Nunc, 96 Kavitäten, Rundboden) wurden 100 µl Kulturmedium vorgelegt. In die erste vertikale Reihe wurden 100 µl Zellsuspension pipettiert und seriell 1:1 in der horizontalen Reihe verdünnt. Die mit Antikörper beschichtete Platte wurde zweimal mit DPBS gespült, danach wurde die vortitrierte Zellsuspension übertragen und jede Kavität mit 100 µl Kulturmedium komplementiert.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Nach 48 h Inkubation wurde in jede Kavität 50 µl Kulturmedium mit ³H-Thymidin pipettiert und die Inkubation für weitere 8 Stunden fortgesetzt. Bis zur Radioaktivitätsbestimmung wurden die Platten bei -20°C eingefroren.

2.11.2 ELISA

Wie unter 2.11.1 beschrieben, wurde eine Mikrotiterplatte (Nunclon Surface von Nunc, 96 Kavitäten, Flachboden) mit Antikörper beschichtet, indem in jede Kavität mit Ausnahme der Negativkontrollen 100 µl einer Antikörperlösung (10 mg/ml anti-TZRβ-Kette + 10 mg/ml CD28 bzw. Des-TZR-Klonotyp + 10 mg/ml CD28) pipettiert wurden. Es folgte eine Inkubation für 24 h bei 4°C.

Wie unter 2.8.1 beschrieben, wurden von den zu testenden Mäusen Lymphknotenzellen entnommen, vereinzelt und in Kulturmedium auf $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt.

Die mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte wurde zweimal mit DPBS gespült, anschließend kam in jede Kavität 200 µl der Zellsuspension. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Nach 24 h und 48 h Inkubation wurde jeweils 1 ml Überstand abgenommen, bei 2100 x g für 5 Min. abzentrifugiert und bei -80°C eingefroren. Der ELISA (Quantikine® der Firma R&D Systems, Wiesbaden) wurde mit den aufgetauten Proben nach Vorschrift durchgeführt.

2.12 Isolierung und Separation k^b-positiver T-Lymphozyten durch Dynabeads

Um CD8⁺-T-Zellen aus der Population der Lymphknotenzellen zu isolieren, wurde das Verfahren der indirekten Negativ-Selektion (= Depletion) mit Hilfe von Dynabeads (Dynabeads M-450 Sheep anti-Rat IgG von Dynal, Hamburg) angewandt: die Lymphknotenzellen wurden mit Primär-Antikörpern markiert, mit denen Sekundär-Antikörper reagieren, die ihrerseits an Dynabeads gekoppelt sind. Durch die Wahl der Primär-Antikörper wurden bei der anschließenden Trennung am Magneten alle Zellen außer den gewünschten CD8⁺-T-Zellen depletiert: Für die Depletion von CD4⁺ T-Zellen wurde der Klon GK1.5 (erkennt CD4) verwendet, B-Zellen durch die Klone 1D3 (CD19) und M1/69 (CD24), Granulozyten durch RB6.8C5 (Ly6G) und Makrophagen durch M1/70 (CD11b)

Zielzellen	Spezifität	Klon
CD4 ⁺ T-Zellen	CD4	GK1.5
B-Zellen	CD19	1D3
B-Zellen	CD24	M1/69
Granulozyten	Ly-6G	RB6.8C5
Makrophagen	CD11b	M1/70

Tab. 2: für die Separation verwendete Antikörper (siehe auch Tab. 1)

Die Lymphknotenzellen von jeweils zwei Mäusen wurden vereinzelt, gezählt und in einem Reaktionsvolumen von 5 ml in DPBS aufgenommen, dazu kamen die in Tabelle 2 aufgeführten Antikörper in optimaler Verdünnung.

Die Inkubation erfolgte für 20 Min. auf Eis, nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit Dynabeads. Die *Beads* wurden im Verhältnis 4:1 zu den Zellen gegeben, nachdem sie dreimal in DBBS am Magneten gewaschen worden waren.

Das Reaktionsvolumen betrug pro 2×10^7 Zellen 1 ml. Die Inkubation erfolgte 30 Min. bei 4°C auf einem Schüttler (Roth, Karlsruhe).

Bei der Separation am Magneten wurde der Überstand abgenommen, die *Beads* einmal gewaschen, der Überstand erneut abgenommen, dann wurden die *Beads* verworfen. Die Zellen wurden auf die gewünschte Konzentration eingestellt, die Separation wurde am Durchflußzytometer überprüft.

3.1 Phänotyp der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen

Lymphknoten- und Milzzellen von fünf Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäusen wurden vereinigt. Durch eine indirekte Negativselektion mit Hilfe von Dynabeads wurden Granulozyten über einen anti-Ly-6G-Antikörper, Makrophagen über einen CD11b-Antikörper, $CD4^+$ -T-Zellen über einen CD4-Antikörper sowie B-Zellen über einen CD24- und einen CD19-Antikörper aus der Zellsuspension entfernt. Anschließend wurden die aufgereinigten Zellen auf die Expression von Aktivierungsmarkern und NKT-Zellmarkern untersucht. Verglichen wurde mit ebenfalls aufgereinigten Des-TZR transgenen T-Zellen. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

3.1.1 Anreicherung von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen durch indirekte Negativselektion am Beispiel von Lymphknotenzellen

Durch eine indirekte Negativselektion von Lymphknotenzellen mit Hilfe von Dynabeads konnte im dargestellten Beispiel der Anteil an $Des-TZR^{lo}CD8^{lo}$ T-Zellen von 9,25 % auf 16,05 % angehoben werden. Der Anteil an $Des-TZR^{int}CD8^-$ und $Des-TZR^-CD8^+$ T-Zellen wurde von 12,66 % auf 28,65 % bzw. von 4,63 % auf 9,4 % verdoppelt. Der Anteil $Des-TZR^-CD8^-$ Zellen konnte dagegen von 61,83 % auf 33,75 % nahezu halbiert werden.

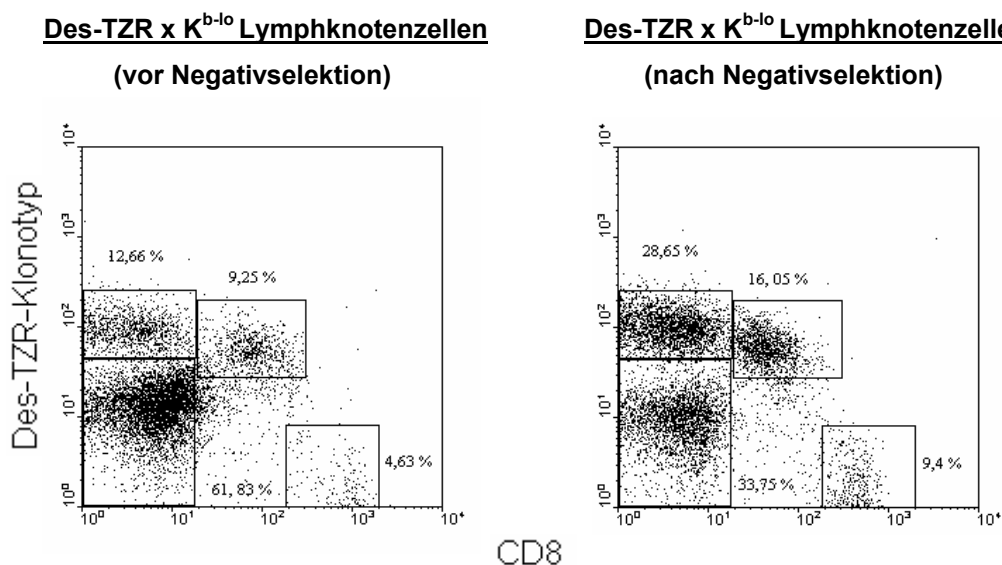


Abb. 3: Darstellung von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Lymphknotenzellen vor und nach Negativselektion in der durchflußzytometrischen Analyse.

3.1.2 Anreicherung von Des-TZR transgenen T-Zellen durch indirekte Negativselektion am Beispiel von Lymphknotenzellen

Durch eine indirekte Negativselektion mit Hilfe von Dynabeads konnte im dargestellten Beispiel der Anteil an Des-TZR^{hi} CD8^{hi} T-Zellen von 19,11 % auf 52,42 % angehoben werden. Der Anteil an Des-TZR^{hi}CD8⁻ T-Zellen wurde von 14,88 % auf 4,16 % reduziert und der Anteil an Des-TZR⁻CD8⁻ T-Zellen von 52,55 % auf 18 %.

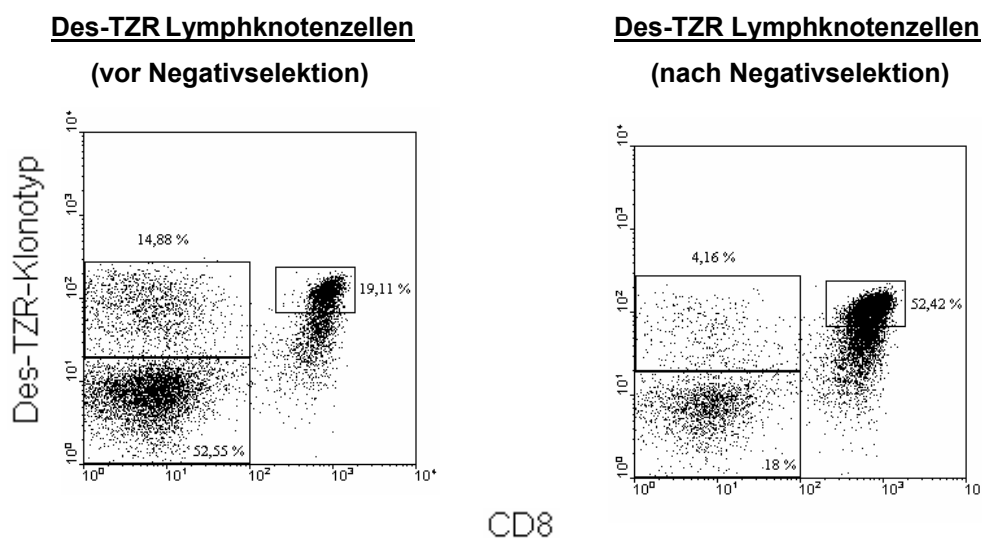


Abb. 4: Darstellung von Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen vor und nach Negativselektion in der durchflußzytometrischen Analyse.

3.1.3 Expression von Aktivierungsmarkern

Die angereicherten T-Zellen wurden auf Expression von CD62L (L-Selektin) untersucht, einem Marker für naive T-Zellen, der nach Aktivierung der Zelle herunterreguliert wird, sowie auf Expression von CD69, einem sehr frühen Aktivierungsmarker. Weiterhin wurde die Expression der α -Kette (CD25) und der β -Kette (CD122) des IL-2-Rezeptors untersucht, ebenso die Expression von CD45RB und die des *memory*-T-Zellmarkers CD44.

Untersucht wurden die Populationen Des-TZR^{hi}CD8^{hi} der Des-TZR transgenen Mäuse, sowie die Populationen Des-TZR^{lo}CD8^{lo} und Des-TZR^{int}CD8⁻ der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäuse.

Alle Populationen exprimierten in hoher Dichte CD62L und CD45RB. CD69 und CD25 wurden nicht exprimiert.

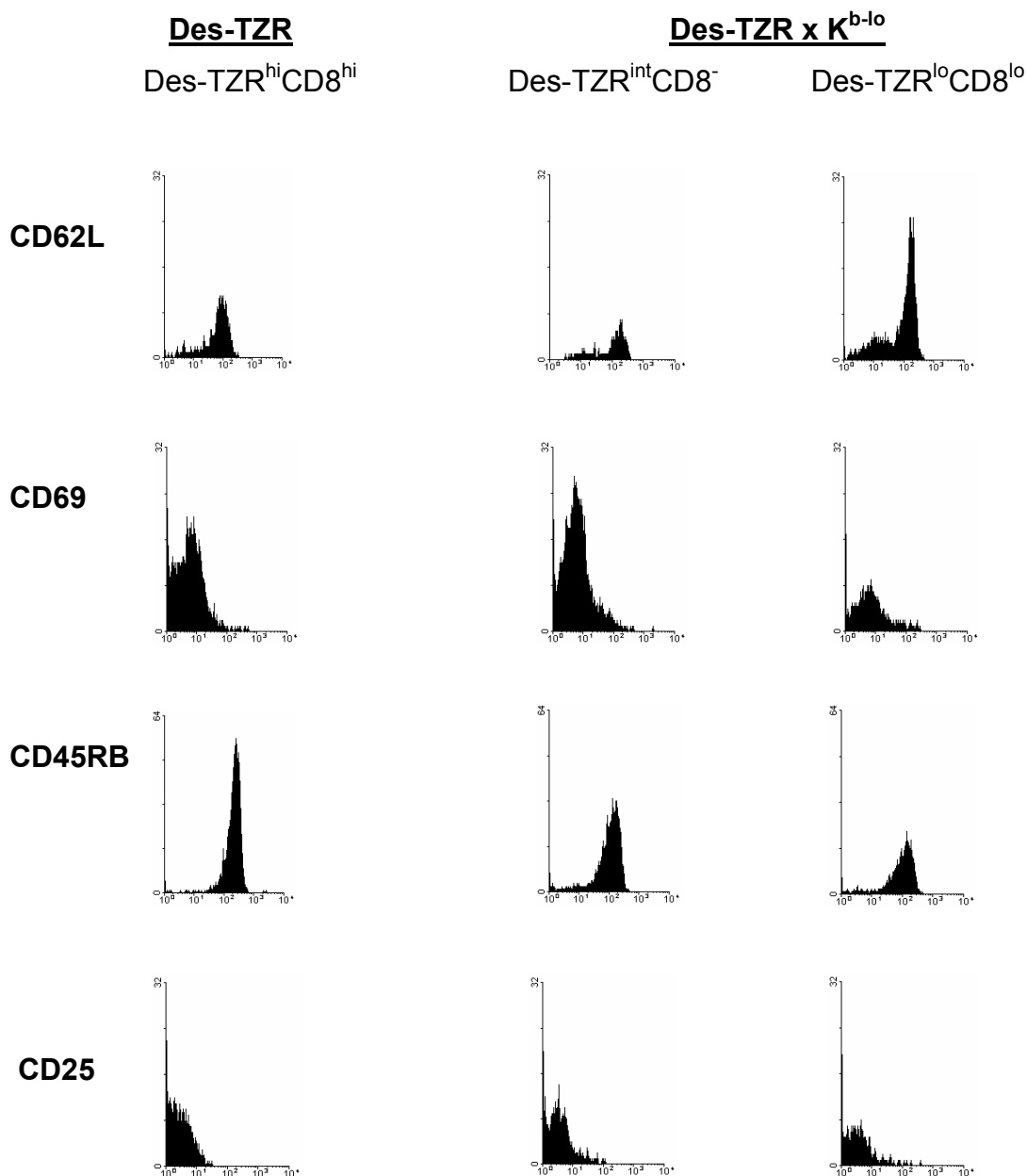


Abb. 5: Phänotyp der Des-TZR (Des-TZR^{hi}CD8^{hi}) sowie der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen (Des-TZR^{int}CD8⁻ und Des-TZR^{lo}CD8^{lo}) bezogen auf Aktivierungsmarker; dargestellt ist die Expression von CD62L, CD69, CD45RB und CD25.

Unterschiede gab es in der Expression von CD122 und CD44. Während die untersuchte Population der Des-TZR transgenen T-Zellen (Des-TZR^{hi}CD8^{hi}) CD122 nicht und CD44 nur in geringer Dichte exprimierte, exprimierten beide Populationen der Des-TZR x K^{b-lo} doppelt-transgenen T-Zellen (Des-TZR^{lo}CD8^{lo} und Des-TZR^{int}CD8⁻) diese Marker in hoher Dichte (siehe Tabelle und Abbildung).

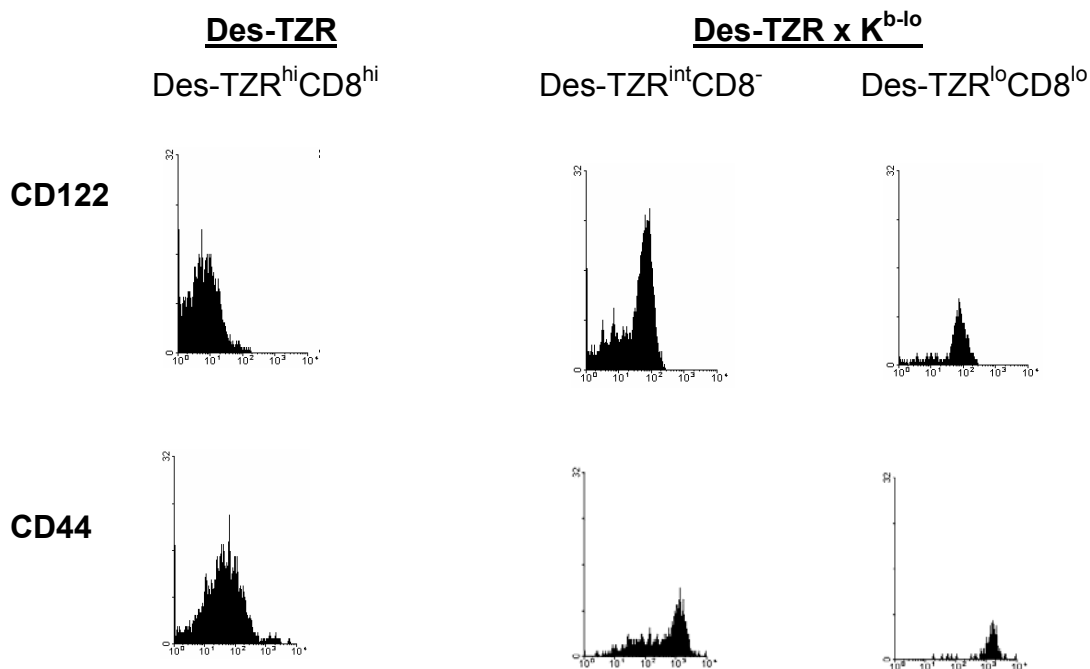


Abb. 6: Phänotyp der Des-TZR (Des-TZR^{hi}CD8^{hi}) sowie der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen (Des-TZR^{int}CD8⁻ und Des-TZR^{lo}CD8^{lo}) T-Zellen bezogen auf Aktivierungsmarker; dargestellt ist die Expression von CD122 und CD44.

Marker	Des-TZR	
	Des-TZR ^{hi} CD8 ^{hi}	Des-TZR ^{lo} CD8 ^{lo} Des-TZR ^{int} CD8 ⁻
CD62L	hi	hi
CD69	-	-
CD25	-	-
CD122	-	hi
CD45RB	hi	hi
CD44	lo	hi

Tab. 3: tabellarische Darstellung des Phänotyps der Des-TZR (Des-TZR^{hi}CD8^{hi}) sowie der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen (Des-TZR^{int}CD8⁻ und Des-TZR^{lo}CD8^{lo}) T-Zellen bezogen auf Aktivierungsmarker.

3.1.4 Expression von NKT-Zellmarkern

Neben der Expression von Aktivierungsmarkern wurde auch die Expression von NK1.1 untersucht und die Expression von $CD8\alpha^+\beta^-$ -Korezeptoren, beides Marker für NKT-Zellen.

Weder $Des-TZR^{hi}CD8^{hi}$ T-Zellen der *Des-TZR* transgenen Mäuse, noch die Populationen $Des-TZR^{lo}CD8^{lo}$ und $Des-TZR^{int}CD8^-$ der *Des-TZR x K^{b-lo}* transgenen Mäuse exprimierten NK1.1. Während $Des-TZR^{hi}CD8^{hi}$ T-Zellen der *Des-TZR* transgenen Mäuse den CD8-Korezeptor ausschließlich in seiner heterodimeren Form ($CD8\alpha\beta$) exprimierten, exprimierten $Des-TZR^{lo}CD8^{lo}$ T-Zellen der *Des-TZR x K^{b-lo}* transgenen Mäuse zum größten Teil den CD8-Korezeptor in seiner $\alpha^+\beta^-$ -Form, wie man aus der niedrigen Expression von CD8 β rückschließen kann.

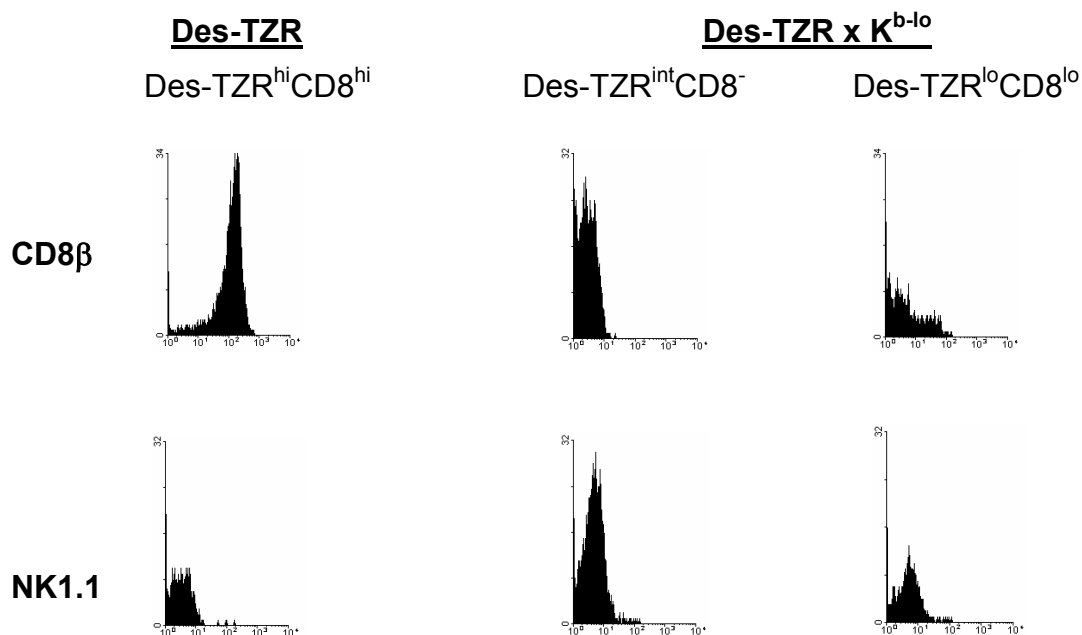


Abb. 7: Expression von NK1.1 und CD8 β auf *Des-TZR* ($Des-TZR^{hi}CD8^{hi}$) und *Des-TZR x K^{b-lo}* transgenen T-Zellen ($Des-TZR^{int}CD8^-$ und $Des-TZR^{lo}CD8^{lo}$).

Marker	<u>Des-TZR</u>	<u>Des-TZR x K^{b-lo}</u>	
	Des-TZR ^{hi} CD8 ^{hi}	Des-TZR ^{lo} CD8 ^{lo}	Des-TZR ^{int} CD8 ⁻
CD8 β	hi	lo	-
NK1.1	-	-	-

Tab. 4: Tabellarische Darstellung des Phänotyps der Des-TZR (Des-TZR^{hi}CD8^{hi}) T-Zellen sowie der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen (Des-TZR^{int}CD8⁻ und Des-TZR^{lo}CD8^{lo}) T-Zellen bezogen auf NKT-Zellmarker.

3.2 Zytokinproduktion von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper

Des-TZR x K^{b-lo} transgene Lymphknotenzellen wurden *in vitro* durch vernetzende Antikörper für 48 h aktiviert. Anschließend wurden die Kultur-Überstände in einem ELISA auf die Zytokine IL-2, IL-10, IFN γ und TGF- β hin überprüft. Untersucht wurde die Zytokin-Produktion nach 24 h und 48 h Aktivierung mit den Antikörperkombinationen anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper und anti-Des-TZR-Klonotyp mit einem CD28 Antikörper, sowie ohne Aktivierung. Verglichen wurde mit der Zytokinbildung von Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen und B10.BR-Lymphknotenzellen bei gleichen Parametern.

Parallel wurde ein weiterer Ansatz nach Ende der Inkubation mit ³H-Thymidin versetzt und für weitere 8 h inkubiert. Die Menge des aufgenommenen ³H-Thymidins diente als Maß für die Aktivierung der Zellen, die sich in einer erhöhten Proliferationsrate darstellt. Einheit der Radioaktivitätsmessung war *counts per minute* (cpm).

Der Versuch wurde einmal durchgeführt, eine statistische Auswertung der Unterschiede zwischen Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Lymphknotenzellen in der Proliferation und der Zytokinproduktion war aufgrund des geringen Probenaufkommens nicht durchführbar.

Der jeweilige Ansatz erfolgte in Doppelbestimmung, die Überstände wurden vor der Auswertung vereinigt.

3.2.1 Aktivierung von Des-TZR Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper

Des-TZR Lymphknotenzellen zeigen insgesamt bei der Aktivierung durch die Kombination des Antikörpers anti-Des-TZR-Klonotyp mit einem CD28 Antikörper eine stärkere Proliferation als durch die Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper, ausgenommen die erste Verdünnungsstufe von 10^6 Zellen mit 124.991 cpm, die unterhalb der ersten Verdünnungsstufe der Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper mit 142.691,05 cpm lag. Auch die Des-TZR Lymphknotenzellen, die nicht durch vernetzende Antikörper aktiviert wurden, zeigen mit 24678 cpm in der ersten Verdünnungsstufe eine Proliferation.

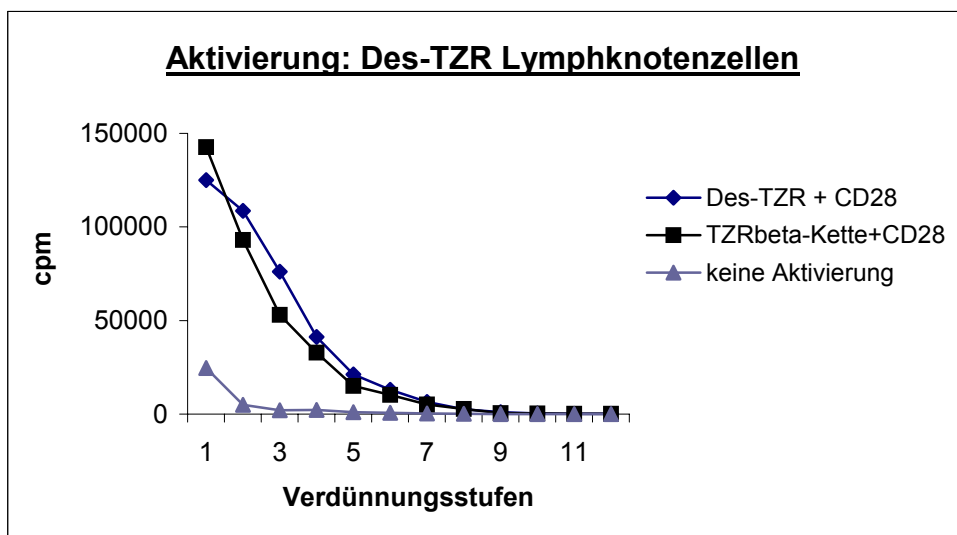


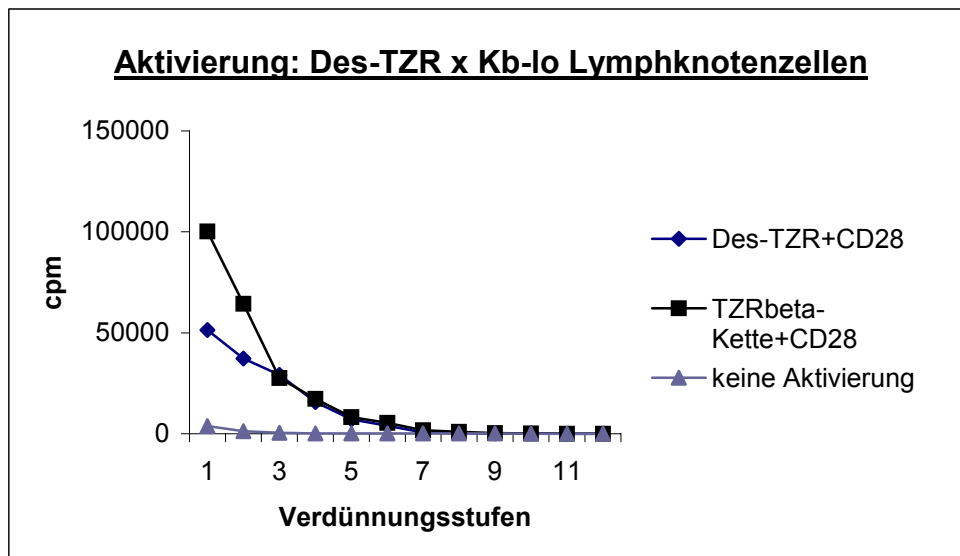
Abb. 8: Aktivierung der Des-TZR Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper. Beginnend bei der Verdünnungsstufe 1, entsprechend 10^6 Zellen, wurden die Zellen 1:2 seriell über zwölf Verdünnungsstufen verdünnt. Nach 48 h Inkubation wurde zu den Zellen ^3H -Thymidin gegeben; dargestellt ist die Aufnahme der Radioaktivität nach einer Inkubation von 8 h; Des-TZR = anti-Des-TZR-Klonotyp.

Verdünnungsstufe/ Zellzahl	Des-TZR + CD28	anti-TZR β -Kette + CD28	keine Aktivierung
1/ 10^6	124991	142691,05	24678
2/ 5×10^5	108539	92998,8	4941,7
3/ $2,5 \times 10^5$	76124,5	52963,2	2025,7
4/ $1,25 \times 10^5$	41257,6	32827,65	2228,4
5/ $6,25 \times 10^4$	21209,2	15103,5	1025
6/ $3,13 \times 10^4$	12984,1	10293,35	744,85
7/ $1,56 \times 10^4$	6504,5	5162,2	299,45
8/ $7,8 \times 10^3$	2642,35	2741,6	176,95
9/ $3,9 \times 10^3$	967,2	559,8	81,75
10/ $1,95 \times 10^3$	413,7	406,6	84,85
11/ $9,75 \times 10^2$	149,1	124,6	56,5
12/ $4,88 \times 10^2$	156,05	109,05	60,05

Tab. 5: Aktivierung der Des-TZR Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper. Dargestellt sind die tatsächlichen Werte der Radioaktivitäts-Inkorporation in cpm nach einer Inkubation von 8 h; Des-TZR = anti-Des-TZR-Klonotyp.

3.2.2 Aktivierung von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper

Des x K^{b-lo} Lymphknotenzellen wurden ebenfalls durch die Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper stärker aktiviert als durch die Kombination des Antikörpers anti-Des-TZR-Klonotyp mit einem CD28 Antikörper, insgesamt lag aber eine geringere Aktivität vor als bei Des-TZR Lymphknotenzellen. Das Maximum bei der Aktivierung durch die Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper lag bei der ersten Verdünnungsstufe von 10^6 Zellen bei den Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen bei 142.691,05 cpm gegenüber 100.173,5 cpm bei den Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen. Das Maximum bei der Aktivierung durch die Kombination des Antikörpers anti-Des-TZR mit einem CD28 Antikörper lag bei der ersten Verdünnungsstufe von 10^6 Zellen bei den Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen bei 124.991 cpm gegenüber 51412,5 cpm bei den Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen. Nicht-aktivierte Des x K^{b-lo} Lymphknotenzellen zeigten keine Aktivierung.

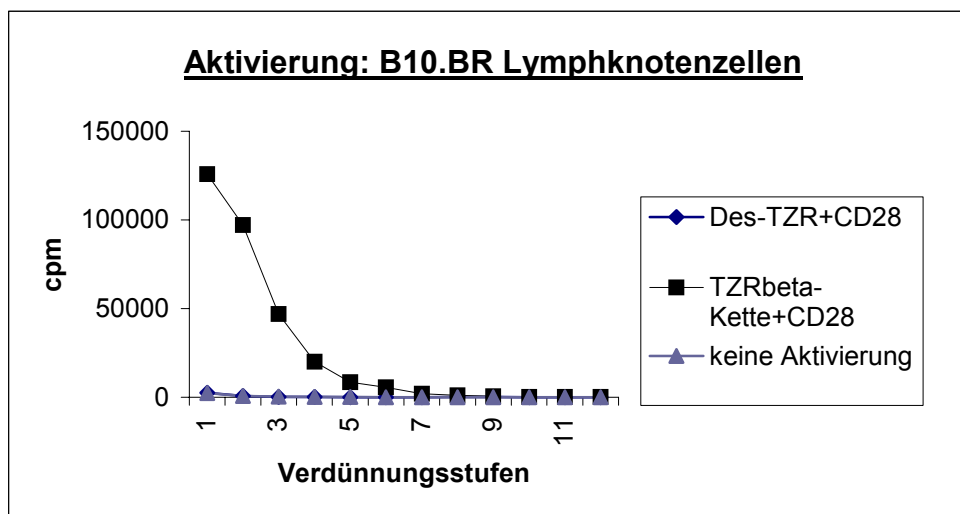


Verdünnungsstufe/ Zellzahl	Des-TZR + CD28	anti-TZRβ-Kette + CD28	keine Aktivierung
1/ 10^6	51412,5	100173,5	3731,3
2/ 5×10^5	37200,1	64405,2	1281,3
3/ $2,5 \times 10^5$	29115,4	27588,55	452,2
4/ $1,25 \times 10^5$	15726,8	17358,35	207
5/ $6,25 \times 10^4$	7159,2	8206,05	121,05
6/ $3,13 \times 10^4$	4035,25	5352,85	87,3
7/ $1,56 \times 10^4$	615,85	1685	114,6
8/ $7,8 \times 10^3$	299,8	968,85	117,6
9/ $3,9 \times 10^3$	133,7	301,8	86,3
10/ $1,95 \times 10^3$	98,95	95,9	58,55
11/ $9,75 \times 10^2$	59,5	77	53
12/ $4,88 \times 10^2$	60,05	68,6	66,6

Abb. 9 und Tab. 6: Aktivierung der Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper. Beginnend bei der Verdünnungsstufe 1, entsprechend 10^6 Zellen, wurden die Zellen 1:1 seriell verdünnt über zwölf Verdünnungsstufen, nach 48 h Inkubation wurde zu den Zellen ^3H -Thymidin gegeben; dargestellt ist die Aufnahme der Radioaktivität nach einer Inkubation von 8 h; Des-TZR = anti-Des-TZR-Klonotyp.

3.2.3 Aktivierung von B10.BR Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper

B10.BR Lymphknotenzellen wurden nur durch die Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper aktiviert, nicht durch den spezifischen anti-Des-TZR-Antikörper.



Verdünnungsstufe/ Zellzahl	anti-Des-TZR + CD28	anti-TZR β -Kette + CD28	keine Aktivierung
1/ 10^6	2524,45	125801,85	2421
2/ 5×10^5	752	97073,65	735,7
3/ $2,5 \times 10^5$	227,1	46936,75	306,85
4/ $1,25 \times 10^5$	115,1	20048,6	142,9
5/ $6,25 \times 10^4$	78,5	8559,9	93
6/ $3,13 \times 10^4$	67,1	5585,5	72,7
7/ $1,56 \times 10^4$	79,8	2000,05	85,45
8/ $7,8 \times 10^3$	91,35	1017,25	89,75
9/ $3,9 \times 10^3$	127,65	589,05	73,15
10/ $1,95 \times 10^3$	82,8	194,45	57,55
11/ $9,75 \times 10^2$	69	97,5	56,5
12/ $4,88 \times 10^2$	67,6	107	65,1

Abb.10 und Tab.7: Aktivierung der B10.BR Lymphknotenzellen durch vernetzende Antikörper. Dargestellt ist die Aufnahme der Radioaktivität nach einer Inkubation von 8 h; Des-TZR = anti-Des-TZR-Klonotyp.

3.2.4 Sekretion von IL-10 von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper, verglichen mit aktivierten Des-TZR Lymphknotenzellen und B10.BR Lymphknotenzellen

Des-TZR Lymphknotenzellen sezernierten nach Aktivierung durch die Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper und die Kombination des Antikörpers anti-Des-TZR-Klonotyp mit einem CD28 Antikörper die gleiche Menge an IL-10. So konnten bei der Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper im Zellüberstand nach 24 h Inkubation 30,26 pg/ml festgestellt werden, bei der Aktivierung durch anti-Des-TZR-Klonotyp und einem CD28 Antikörper 29,55 pg/ml. Nach 48 h wurden bei der Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper im Zellüberstand 77,97 pg/ml festgestellt, bei der Aktivierung durch anti-Des-TZR-Klonotyp und einem CD28 Antikörper 75,99 pg/ml. Nicht aktivierte Des-TZR Lymphknotenzellen sezernierten kein IL-10.

Durch anti-Des-TZR-Klonotyp und einem CD28 Antikörper aktivierte Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen hatten nach 24 h 5,57 pg/ml IL-10 sezerniert, nach 48 h 8,04 pg/ml. Nach Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper war die Konzentration mit der der Des-TZR-Lymphknotenzellen vergleichbar, mit 32,28 pg/ml nach 24 h und 70,29 pg/ml nach 48 h. Nicht aktivierte Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen sezernierten kein IL-10.

Weder durch anti-Des-TZR-Klonotyp und einem CD28 Antikörper, noch nicht-aktivierte B10.BR Lymphknotenzellen sezernierten IL-10. Nach 24 h Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper wurden 45,47 pg/ml sezerniert, respektive 132,24 pg/ml nach 48 h.

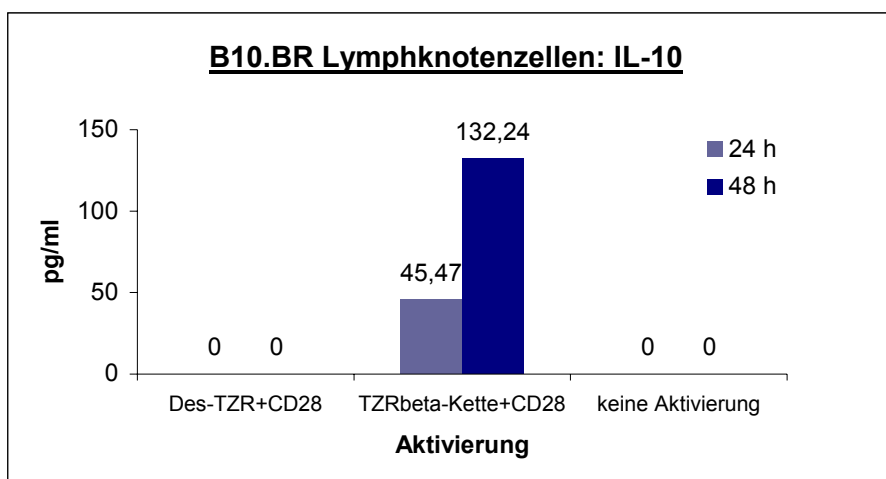
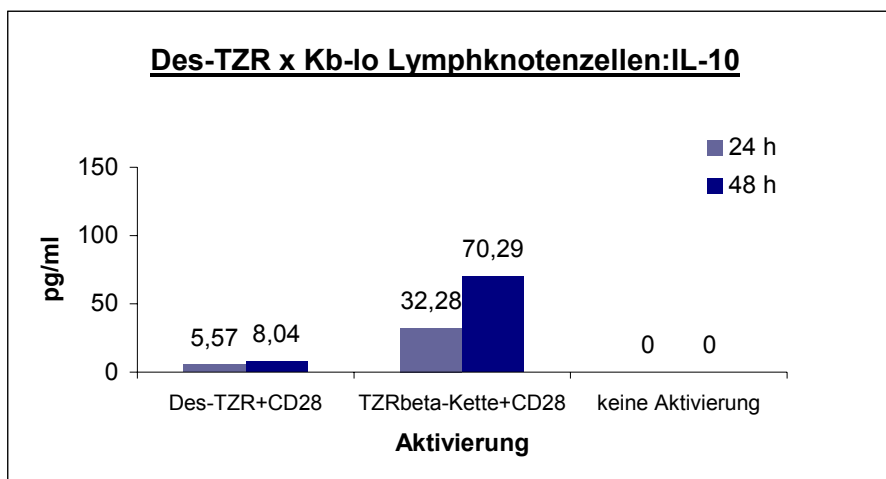
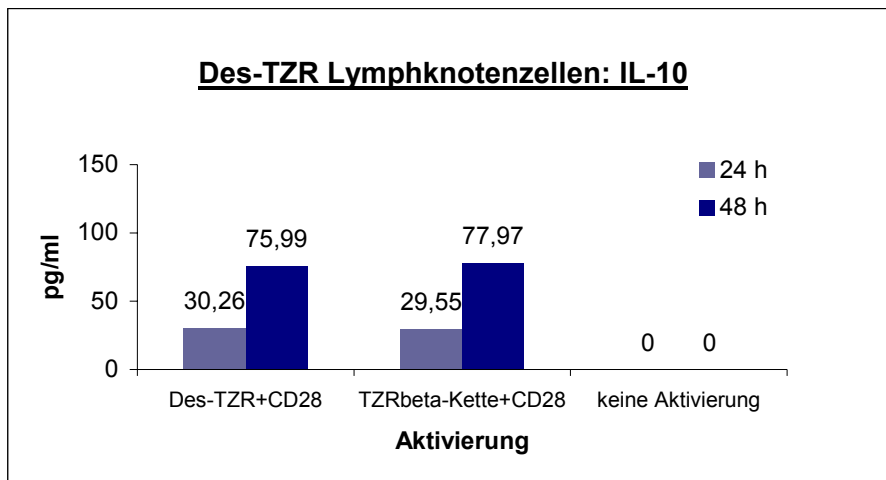


Abb. 11: Darstellung der IL-10-Sekretion von Des-TZR, Des-TZR x K^{b-lo} und B10.BR Lymphknotenzellen nach 24 h bzw. 48 h Aktivierung durch vernetzende Antikörper; Angaben in pg/ml; Des-TZR = anti-Des-TZR-Klonotyp.

3.2.5 Sekretion von IL-2 von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper, verglichen mit aktivierten Des-TZR-Lymphknotenzellen und B10.BR Lymphknotenzellen

Des-TZR Lymphknotenzellen sezernierten nach Aktivierung durch die Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper nach 24 h 1761,16 pg/ml IL-2 und nach 48 h 272,29 pg/ml. Aktiviert durch die Kombination des Antikörpers anti-Des-TZR-Klonotyp mit einem CD28 Antikörper wurden nach 24 h 1155,81 pg/ml IL-2 sezerniert, nach 48 h konnten 174,54 pg/ml nachgewiesen werden. Nicht aktivierte Des-TZR Lymphknotenzellen sezernierten kein IL-2.

Durch anti-Des-TZR-Klonotyp und einem CD28 Antikörper aktivierte Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen hatten nach 24 h 70,8 pg/ml IL-2 sezerniert, nach 48 h wurden 20,16 pg/ml nachgewiesen. Nach Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper lag die Konzentration nach 24 h bei 2821 pg/ml, und nach 48 h bei 175,68 pg/ml. Nicht aktivierte Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen sezernierten nach 24 h 3,05 pg/ml, und nach 48 h wurden 2,21pg/ml IL-2 nachgewiesen.

Weder durch anti-Des-TZR-Klonotyp und einem CD28 Antikörper, noch nicht-aktivierte B10.BR Lymphknotenzellen sezernierten IL-2, ausgenommen nicht-aktivierte Lymphknotenzellen nach 24 h mit 3,08 pg/ml. Nach 24 h Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper wurden 2230,61 pg/ml sezerniert, respektive 2292,81 pg/ml nach 48 h.

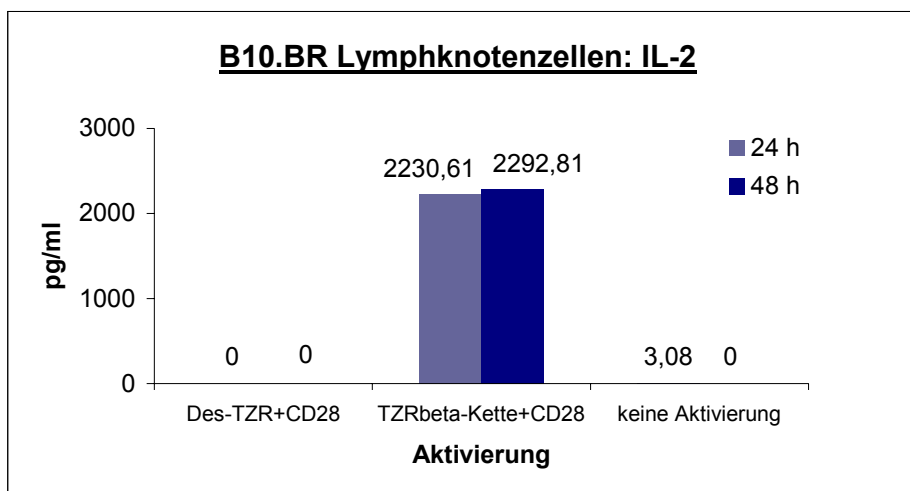
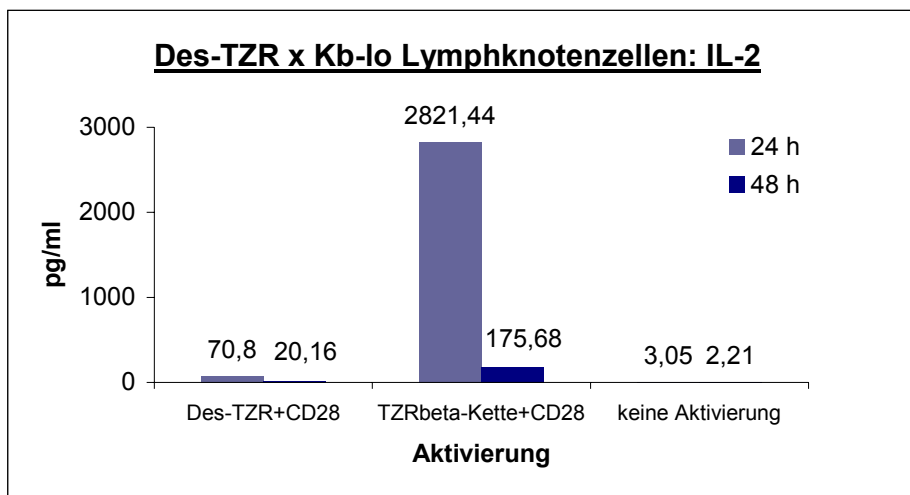
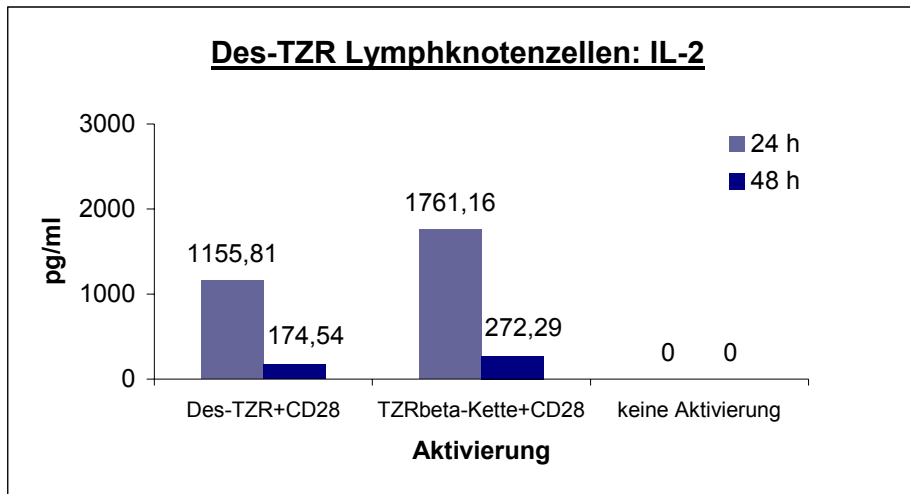


Abb. 12: Darstellung der IL-2-Sekretion von Des-TZR, Des-TZR x K^{b-lo} und B10.BR Lymphknotenzellen nach 24 h bzw. 48 h Aktivierung durch vernetzende Antikörper; Angaben in pg/ml; Des-TZR = anti-Des-TZR-Klonotyp.

3.2.6 Sekretion von IFN γ und TGF- β durch Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper, verglichen mit aktivierten Des-TZR Lymphknotenzellen und B10.BR Lymphknotenzellen

Des-TZR Lymphknotenzellen sezernierten nach Aktivierung durch die Kombination des Antikörpers anti-TZR β -Kette mit einem CD28 Antikörper nach 24 h 8837,75 pg/ml IFN γ und nach 48 h 40380,75 pg/ml. Aktiviert durch die Kombination des Antikörpers anti-Des-TZR-Klonotyp mit einem CD28 Antikörper wurden nach 24 h 7196,15 pg/ml IFN γ sezerniert, nach 48 h konnten 29794,5 pg/ml nachgewiesen werden. Nicht aktivierte Des-TZR Lymphknotenzellen sezernierten nach 24 h 3,14 pg/ml IFN γ , nach 48 h 10,71 pg/ml.

Durch anti-Des-TZR-Klonotyp + anti-CD28 aktivierte Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen hatten nach 24 h 14211,5 pg/ml IFN γ und nach 48 h 30177,25 pg/ml sezerniert. Nach Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper lag die Konzentration nach 24 h bei 25496,75 pg/ml, und nach 48 h bei 63734,75 pg/ml. Nicht aktivierte Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen sezernierten nach 24 h 19,36 pg/ml und nach 48 h 34,45 pg/ml IFN γ .

Durch anti-Des-TZR-Klonotyp und einem CD28 Antikörper aktivierte B10.BR Lymphknotenzellen sezernierten nach 24 h 99,59 pg/ml und nach 48 h 61,29 pg/ml, nicht-aktivierte B10.BR Lymphknotenzellen sezernierten nach 24 h 199,09 pg/ml IFN γ , nach 48 h 95,06 pg/ml. Nach 24 h Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und einem CD28 Antikörper wurden 4972,78 pg/ml sezerniert, respektive 23670,25 pg/ml nach 48 h.

Die Produktion von TGF- β durch Lymphknotenzellen konnte im ELISA auch bei Aktivierung für keinen Mausstamm nachgewiesen werden.

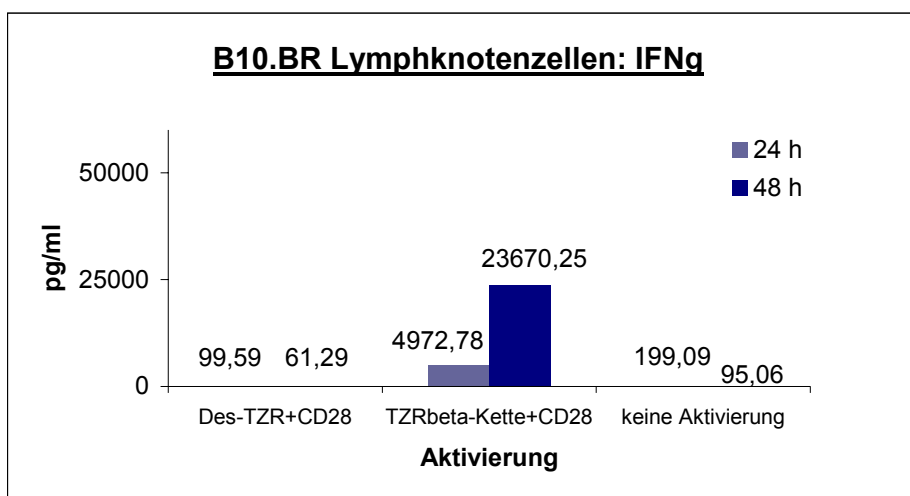
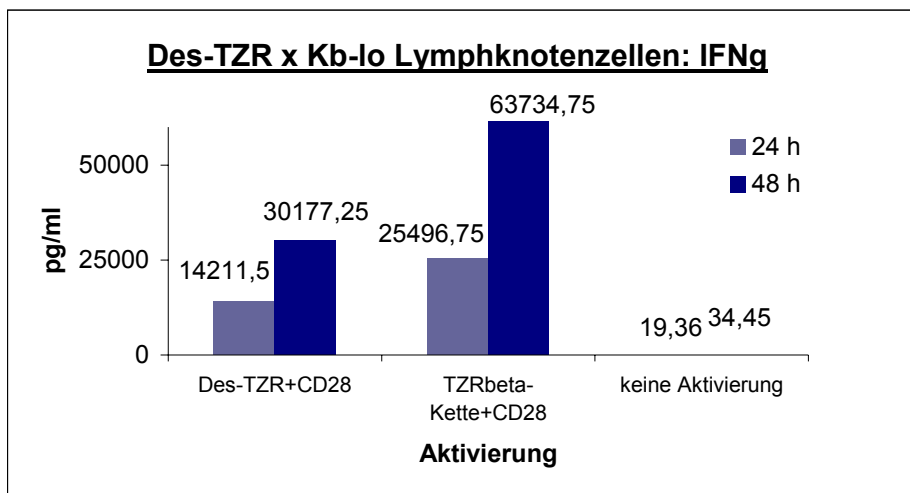
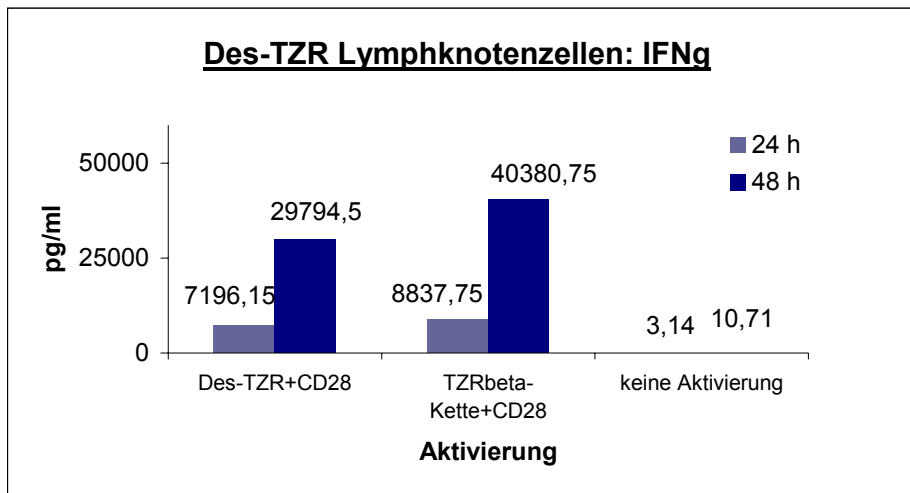


Abb. 13: Darstellung der IFN γ -Sekretion von Des-TZR, Des-TZR x K^{b-lo} und B10.BR Lymphknotenzellen nach 24 h bzw. 48 h Aktivierung durch vernetzende Antikörper; Angaben in pg/ml; Des-TZR = anti-Des-TZR-Klonotyp.

3.3 Nachweis einer thymusabhängigen Entwicklung von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen

Um festzustellen, ob die Entwicklung von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen thymusabhängig ist, wurden 8 Des-TZR x K^{b-lo} transgene Tiere thymektomiert und T-Zell-depletiert. Anschließend wurden in Abständen von mehreren Tagen, beginnend mit Tag 41 nach der Thymektomie und endend am Tag 120, Blutproben entnommen und durchflußzytometrisch auf die Anwesenheit von Des-TZR⁺CD8⁺ T-Zellen überprüft.

3.3.1 Verfolgung der Rekonstitution des T-Zell-Repertoires in T-Zell-depletierten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäusen

Bei 4 von 8 Tieren zeigte sich bis zum Tag 120 nach Thymektomie und T-Zell-Depletion keine Rekonstitution des T-Zell-Repertoires, die über den Werten der Depletionskontrolle lag. Ein Tier verstarb nach der Messung am Tag 58 und zeigte bis zu diesem Tag ebenfalls keine Rekonstitution des T-Zell-Repertoires, die über dem Wert der Depletionskontrolle lag. Gleiches gilt für ein Tier, dem nach Tag 93 retrobulbär kein Blut mehr entnommen werden konnte.

Beispielhaft zeigt sich an der Maus 608 vor der Depletion eine Des-TZR⁺CD8⁺ Population von 5,56 %, die durch die Depletion auf 0,58% reduziert wurde. Nach 120 Tagen lag der Anteil dieser Population bei 0,24 %.

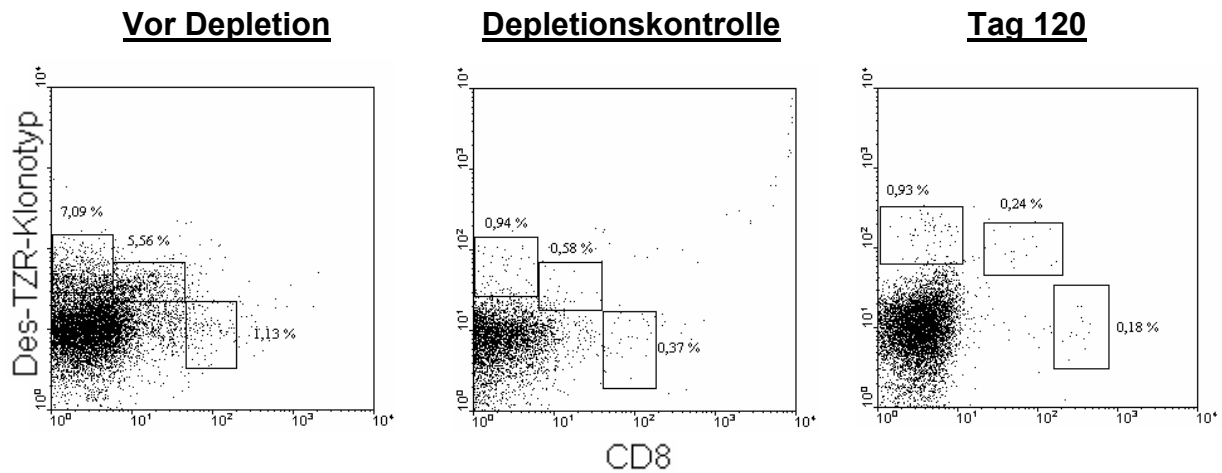
Maus 608

Abb. 14: Durchflußzytometrische Darstellung der Rekonstitution von Des-TZR⁺CD8⁺ T-Zellen am Beispiel der Des-TZR x K^{b-lo} Maus 608. Gezeigt ist die Situation vor der Depletion, die Depletionskontrolle und die Situation 120 Tage nach der Depletion.

Bei zwei Tieren konnte eine Rekonstitution des T-Zell-Repertoires festgestellt werden.

Beispielhaft zeigt sich an der Maus 579 vor der Depletion eine Des-TZR⁺CD8⁺ Population von 8,56 %, die durch die Depletion auf 1,04 % reduziert wurde. Nach 120 Tagen war diese Population wieder auf 1,44 % angewachsen, wobei bereits am Tag 41 nach der Depletion eine Population von 1,28 % nachweisbar war.

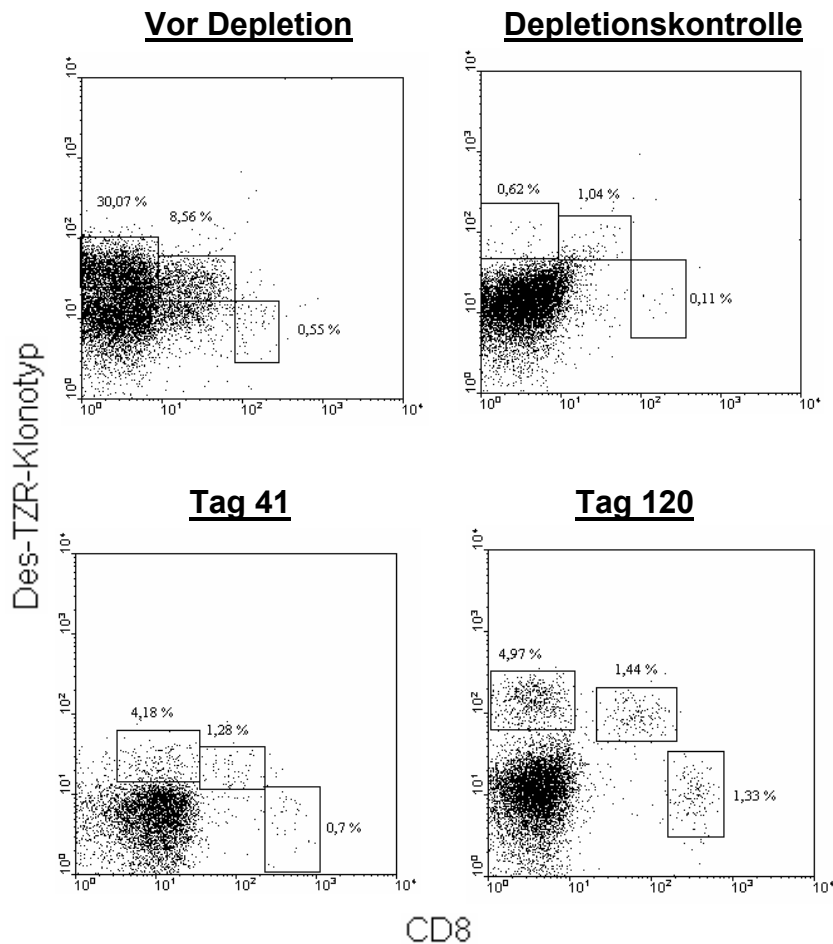
Maus 579

Abb. 15: Durchflußzytometrische Darstellung der Rekonstitution Des-TZR⁺CD8⁺ T-Zellen am Beispiel der Des-TZR x K^{b-10} Maus 579 vor der Depletion, die Depletionskontrolle und 41 bzw. 120 Tage nach der Depletion.

3.3.2 Phänotyp des rekonstituierten T-Zell-Repertoires nach Thymektomie und T-Zell-Depletion

10 Monate nach der Thymektomie wurden von den vier bis zu diesem Zeitpunkt überlebenden Mäusen Blut, Milz und Lymphknoten entnommen und die T-Zellen durchflußzytometrisch dargestellt. Bis auf Maus 603 konnte bei keinen von diesen Mäusen ein Thymusrest gefunden werden. Bei der Untersuchung der Lymphknotenzellen auf Expression von CD69, CD44, CD122 und CD25 konnten bis

auf eine Ausnahme keine Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Tieren und einer mitgeführten Kontrolle festgestellt werden. Bei der Maus 604 zeigten Des-TZR^{lo}CD8^{lo} T-Zellen und Des-TZR^{int}CD8⁻ T-Zellen eine leicht erhöhte Expression von CD25 gegenüber der Kontrolle.

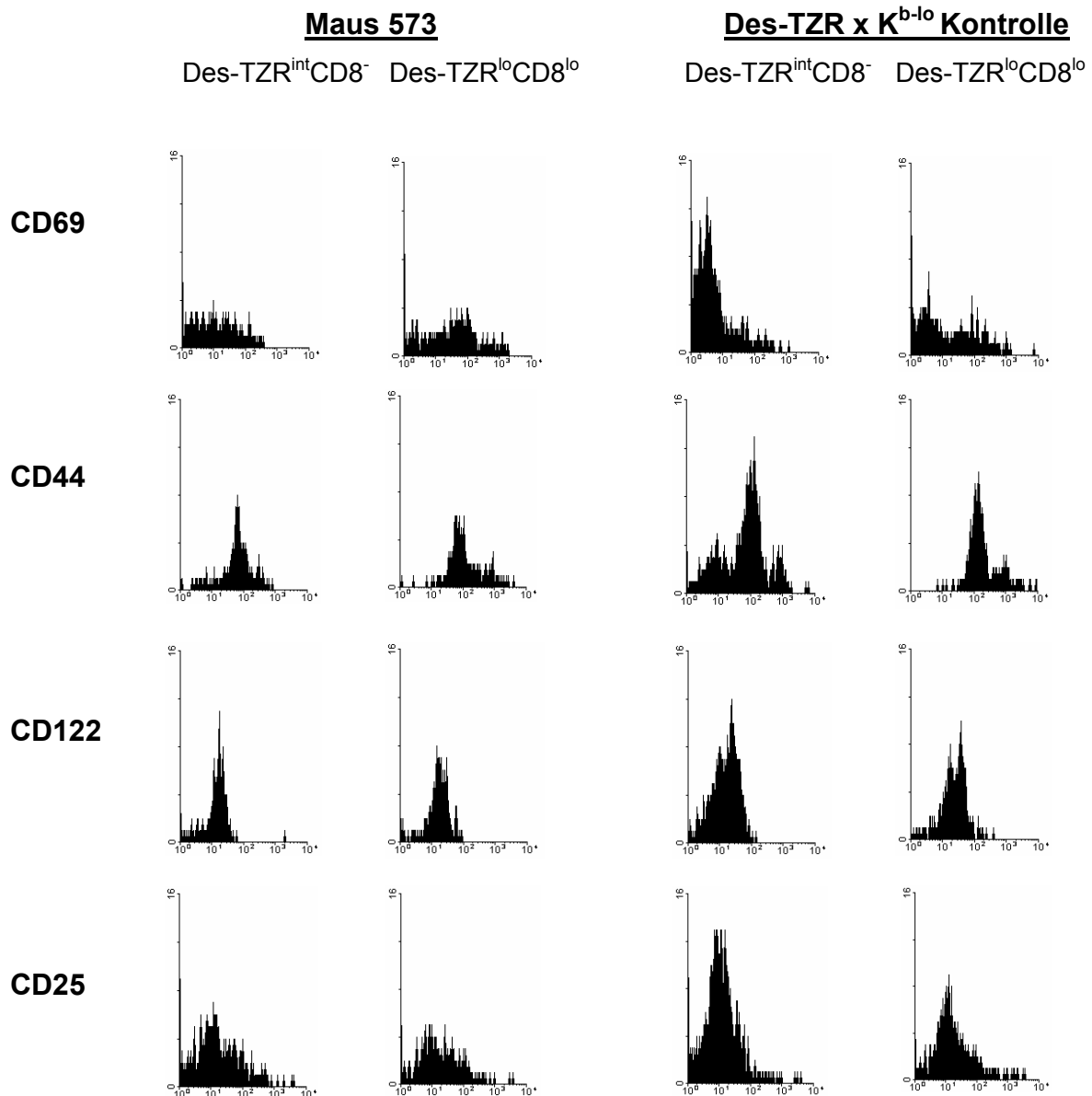


Abb.16: Expression von CD69, CD44, CD122 und CD25 auf rekonstituierten Des x K^{b-lo} T-Zellen (Des-TZR^{lo}CD8^{lo} Des-TZR^{int}CD8⁻) der Maus 573 10 Monate nach Thymektomie und T-Zell-Depletion.

3.4 Rekonstitution des T-Zell-Repertoires von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Mäusen nach Depletion mit einem anti-Thy1.2 Antikörper

Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgene Mäuse wurden durch eine Injektion eines anti-Thy1.2-Antikörpers T-Zell-depletiert, die Rekonstitution der CD8⁺ T-Zellen wurde 7 Wochen nach Depletion durchflußzytometrisch überprüft.

Es wurden jeweils 4 Mäuse T-Zell-depletiert, ein weiteres Tier gleichen Alters wurde nicht depletiert und diente als Kontrolle.

Um trotz Meßschwankungen am Durchflußzytometer die Rekonstitution darstellen zu können, wurden die Ergebnisse mit einem Faktor multipliziert. Der Faktor wurde berechnet, indem der Meßwert des Kontrolltieres vor der Depletion dividiert wurde durch den Meßwert nach der Depletion. So gilt für die Messung der CD8⁺ T-Zellen bei Des-TZR Mäusen der Faktor $3,91/3,48 = 1,1236$.

Unterschiede bezüglich der Rekonstitution des T-Zell-Repertoires zwischen Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäusen konnten aufgrund der geringen Gruppengröße nicht statistisch analysiert werden.

3.4.1 Rekonstitution des T-Zell-Repertoires von Des-TZR transgenen Mäusen

Nach 7 Wochen war die Population der CD8⁺ T-Zellen in den Mäusen 432, 433 und 434 wiederhergestellt, Maus 436 hatte zu diesem Zeitpunkt 77,2 % der ursprünglichen Größe ihrer Population wiedererlangt.

Tier-Nr.	Anteil CD8 ⁺ T-Zellen vor der Depletion in Prozent	Anteil CD8 ⁺ T-Zellen 7 Wochen nach der Depletion in Prozent
432	6,34	6,82 (6,07)
433	4,43	4,26 (3,8)
434	3,14	5,36 (4,77)
436	6,05	4,67 (4,16)
435 = Kontrolle	3,91	3,91 (3,48)

Tab. 8: Anteile der CD8⁺ T-Zellen von Des-TZR transgenen Mäusen vor und 7 Wochen nach der T-Zell-Depletion, dem jeweiligen Tier zugeordnet; Angaben in Prozent, Werte in Klammern stellen jeweils den unkorrigierten Wert dar.

Maus 432

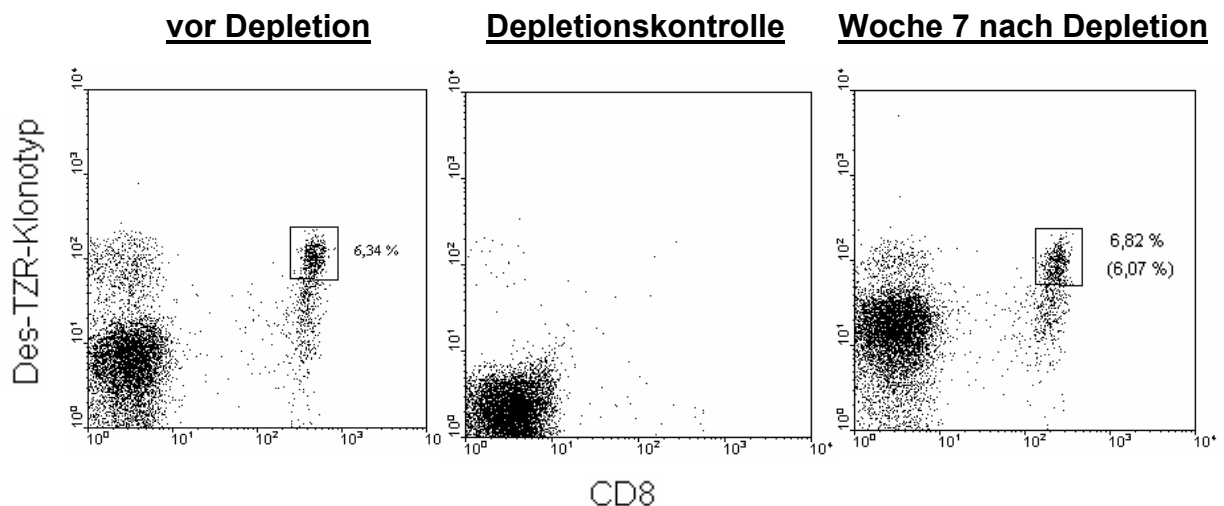


Abb. 17: Rekonstitution des T-Zell-Repertoires am Beispiel der Des-TZR transgenen Maus 432; dargestellt sind die Situation vor der Depletion, 7 Wochen danach sowie die Depletionskontrolle.

3.4.2 Rekonstitution des T-Zell-Repertoires von Des-TZR x K^{b-10} transgenen Mäusen

Maus 946 hatte 7 Wochen nach der Depletion 19,6 % der ursprünglichen Populationsgröße erreicht, Maus 942 41,42%, Maus 943 20,14 %, Maus 917 18 % und Maus 918 25,23 %.

Maus	Anteil CD8 ⁺ T-Zellen vor der Depletion in Prozent	Anteil CD8 ⁺ T-Zellen 7 Wochen nach der Depletion in Prozent
924 = Kontrolle	7,36	7,72 (6,43)
946	3,72	0,73 (0,64)
942	2,97	1,23 (1,07)
943	2,83	0,57 (0,5)
917	6,83	1,23 (1,07)
918	3,25	0,82 (0,72)

Tab. 9: Anteile der CD8⁺ T-Zellen vor und 7 Wochen nach der Depletion, dem jeweiligen Des x K^{b-lo} transgenen Tier zugeordnet; Angaben in Prozent, Werte in Klammern stellen jeweils den unkorrigierten Wert dar.

Maus 917

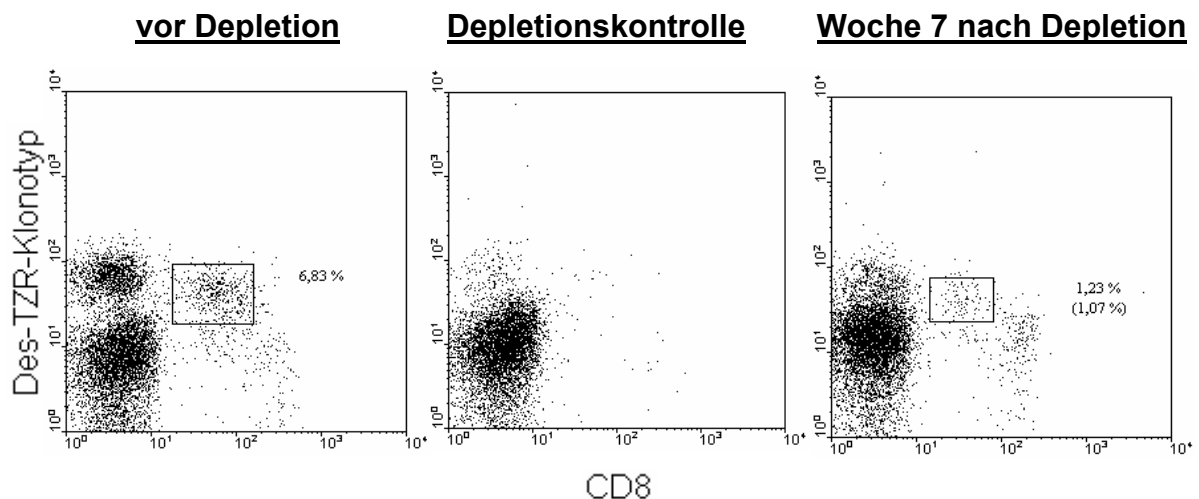


Abb. 18: Rekonstitution des T-Zell-Repertoires am Beispiel der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Maus 917; dargestellt sind die Situation vor der Depletion, 7 Wochen danach sowie die Depletionskontrolle.

3.5 Homeostatische Proliferation von Des x K^{b-lo} T-Zellen

4×10^7 Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE markiert und in lymphopene Empfänger überführt, die entweder den positiv-selektionierenden Hintergrund aufwiesen (B10.BR), den negativ-selektionierenden Hintergrund (K^{b-lo}) oder einen völlig disparaten Hintergrund (BALB/c).

3.5.1 T-Zell-Depletion mit Hilfe eines anti-Thy1.2 Antikörpers im Empfängertier

Die Lymphopenie der Empfängertiere wurde durch eine Thymektomie und anschließender T-Zell-Depletion mit Hilfe einer Injektion eines anti-Thy1.2 Antikörpers erreicht. Es folgte eine durchflußzytometrische Überprüfung an einer Blutprobe. Die Darstellung zeigt eine T-Zell-Depletion am Beispiel eines positiv-selektionierenden Empfängers. So wurde die CD4⁺ T-Zell-Population von 24,31 % auf 0,05 % reduziert, die CD8⁺ T-Zell-Population von 11,84 % auf 0,01 %.

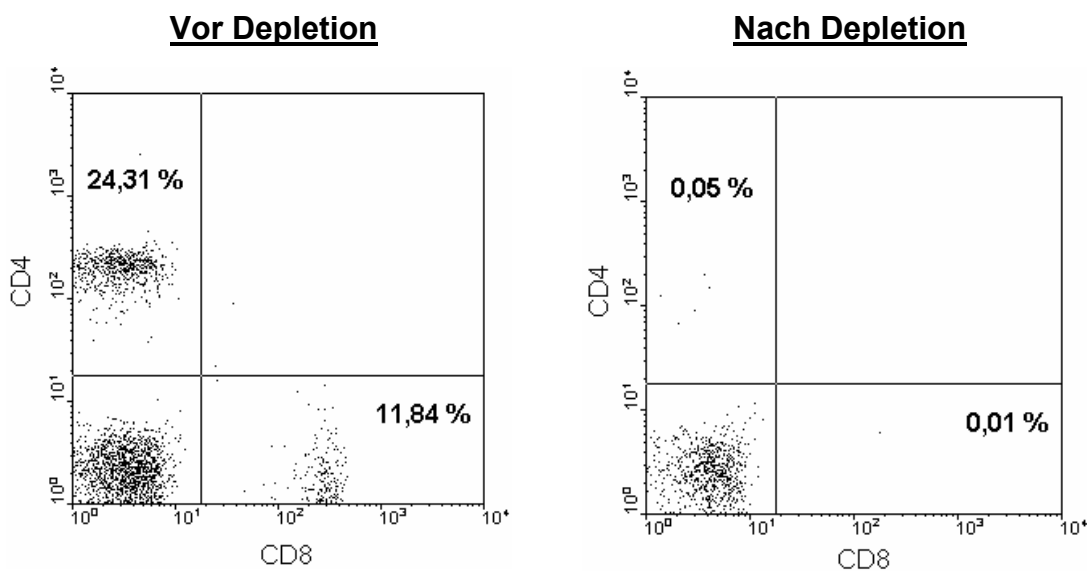


Abb. 19: T-Zell-Depletion am Beispiel eines B10.BR Empfängers: das linke Bild stellt die Situation der Blutprobe vor der Depletion dar, das rechte die Situation danach.

3.5.2 Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen eine homeostatische Proliferation in lymphopenen Empfängern mit positiv-selektionierendem Hintergrund

B10.BR-Empfänger (n = 15) wurden thymektomiert und T-Zell-depletiert. Danach erhielten sie eine intravenöse Injektion von 4×10^7 Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen. Nach 4, 7 und 14 Tagen erfolgte die durchflußzytometrische Auswertung der Lymphknoten- und Milzzellen von jeweils 5 Tieren. Innerhalb von 4 Tagen hatten sich Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen zweimal geteilt, innerhalb von 7 Tagen dreimal und innerhalb von 14 Tagen viermal, dargestellt sind jeweils an einem Beispiel Lymphknotenzellen.

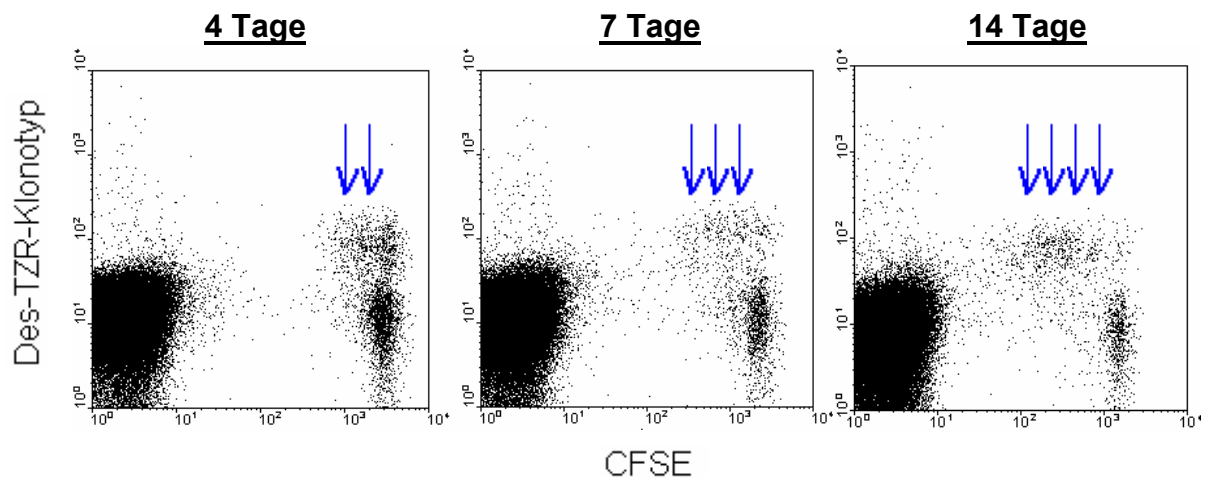


Abb. 20: Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen teilen sich in Empfängern mit positiv-selektionierendem Hintergrund (B10.BR) innerhalb von 14 Tagen viermal.

3.5.3 Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen eine homeostatische Proliferation in lymphopenen Empfängern mit negativ-selektionierendem Hintergrund

K^{b-lo}-Empfänger (n = 11) wurden thymektomiert und T-Zell-depletiert. Danach erhielten sie eine intravenöse Injektion von 4×10^7 Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknoten-zellen. Nach 4, 7 und 14 Tagen erfolgte die durchflußzytometrische Auswertung der Lymphknoten- und Milzzellen von 3 bzw. 4 Tieren. Innerhalb von 4 Tagen hatten sich Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen zweimal geteilt, innerhalb von 7 Tagen viermal. Nach 14 Tagen hatten sich alle Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen mindestens zweimal geteilt.

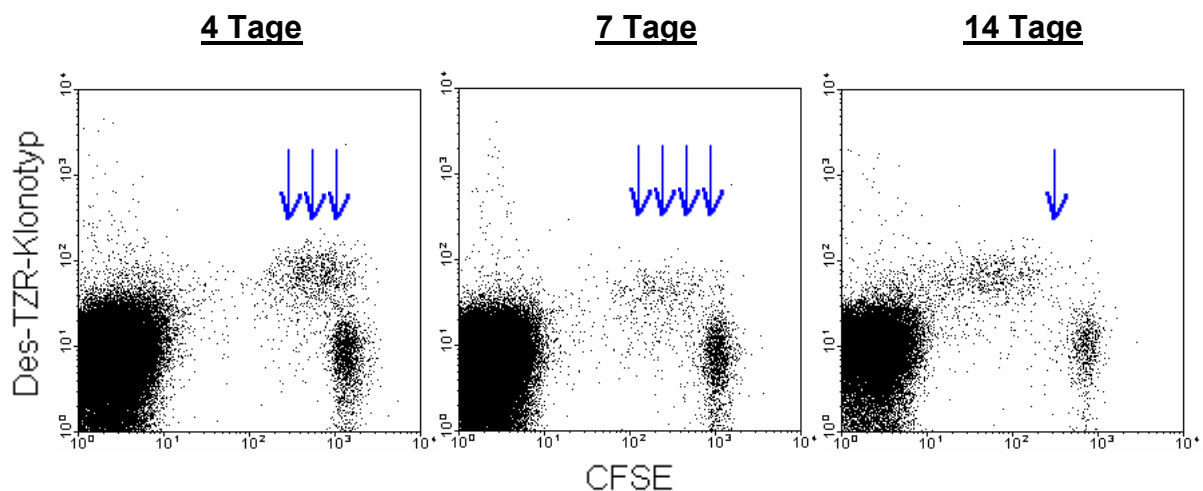


Abb. 21: Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen teilen sich in Empfängern mit negativ-selektionierendem Hintergrund (K^{b-lo}) innerhalb von 14 Tagen mindestens zweimal.

3.5.4 Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen keine homeostatische Proliferation in lymphopenen Empfängern mit nicht-selektionierendem Hintergrund

BALB/c Empfänger (H2-K^d, n = 7) wurden thymektomiert und T-Zell-depletiert, zusätzlich wurden sie einen Tag vor der Injektion von 2×10^7 Des x K^{b-lo}-Lymphknotenzellen mit 6,5 Gy bestrahlt, um verbliebene alloreaktive Zellen zu deaktivieren. Nach 4, 7 und 14 Tagen erfolgte die durchflußzytometrische Auswertung der Lymphknoten- und Milzzellen von 2 bzw. 3 Tieren. Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen teilten sich nicht in lymphopenen Empfängern mit einem für sie nicht-selektionierenden Hintergrund und konnten nach 7 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden. Dargestellt sind jeweils an einem Beispiel Lymphknotenzellen.

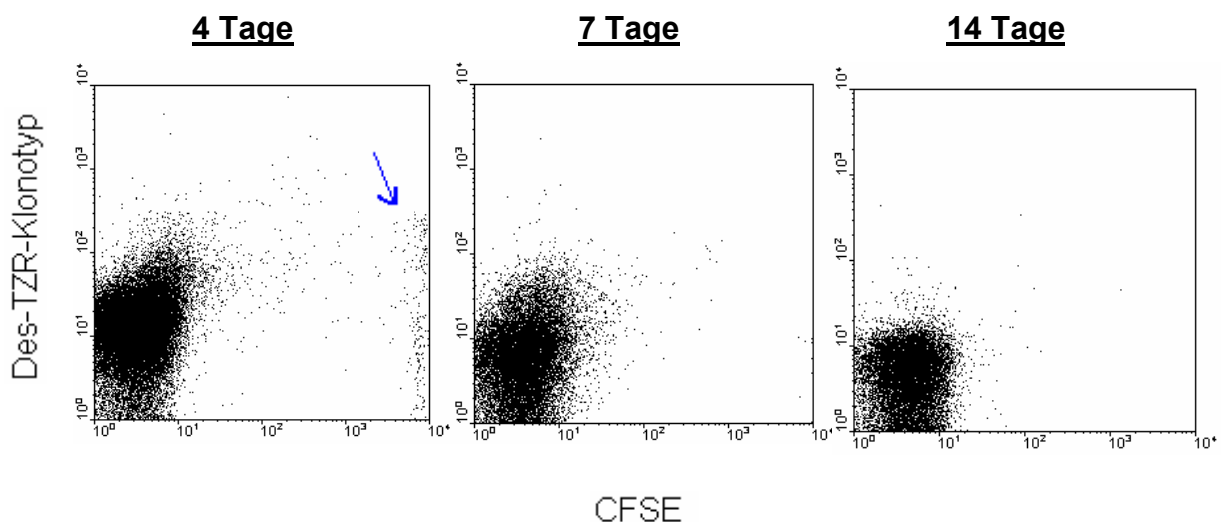


Abb. 22: Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen teilen sich in nicht-lymphopenen Empfängern mit nicht-selektionierendem Hintergrund (BALB/c) nicht und sind innerhalb von 7 Tagen nicht mehr nachweisbar.

3.5.5 Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen keine homeostatische Proliferation in nicht-lymphopenen Empfängern mit negativ-selektionierendem Hintergrund

Unbehandelte K^{b-lo}-Empfänger (n = 7) erhielten eine intravenöse Injektion von 4×10^7 Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen. Nach 4, 7 und 14 Tagen erfolgte die durchflußzytometrische Auswertung der Lymphknoten- und Milzzellen von jeweils 2

bzw. 3 Tieren. Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen teilten sich innerhalb von 14 Tagen nicht. Dargestellt sind jeweils an einem Beispiel Lymphknotenzellen.

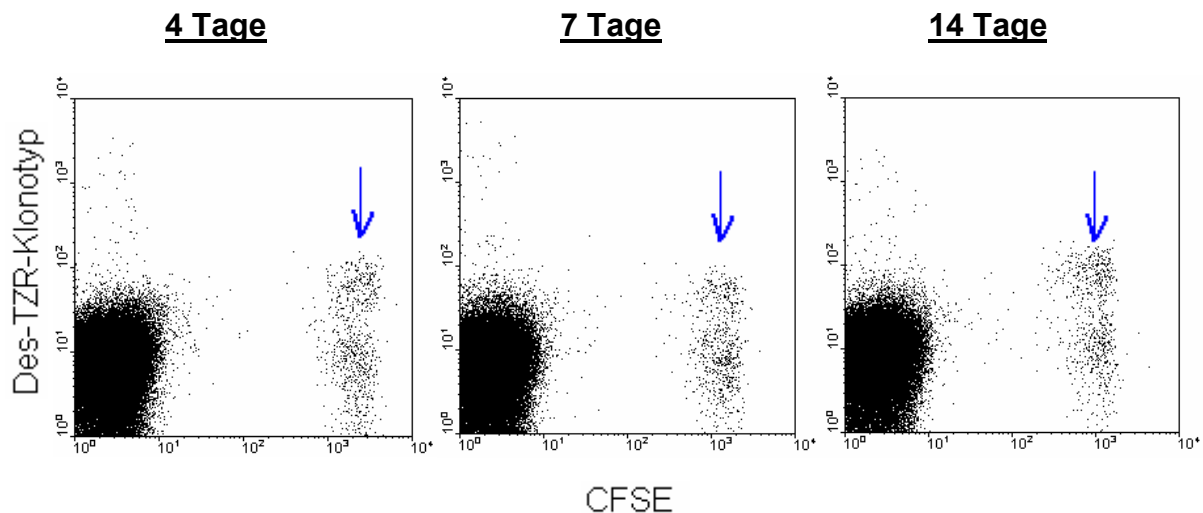


Abb. 23: Des-TZR⁺CFSE⁺ T-Zellen teilen sich in nicht-lymphophenen Empfängern mit negativ selektionierendem Hintergrund (K^{b-lo}) innerhalb von 14 Tagen nicht.

3.6 Vergleich der Vitalität von Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen *in vitro*

Jeweils 5×10^5 Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR Lymphknotenzellen wurden in eine Kavität einer 96-Kavitäten-Platte in Vollmedium ausgesät und bei 5 % CO_2 und 37°C inkubiert. Nach 4 h, 24 h und 48 h wurde mit 10^6 permeabilisierten und fixierten Zellen eine intrazelluläre Färbung der aktiven Caspase-3 als Marker für Apoptose vorgenommen und durchflußzytometrisch analysiert. Parallel wurden nicht-permeabilisierte und -fixierte Zellen mit Propidiumiodid als Marker für nekrotische Zellen gefärbt. Als Positiv-Kontrolle dienten Lymphknotenzellen, die für 4 h mit 5 % Ethanol in Vollmedium inkubiert wurden, als Negativ-Kontrolle Lymphknotenzellen, die für 4 h in Vollmedium inkubiert wurden. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

3.6.1 Vitalität von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Lymphknotenzellen *in vitro*

Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen wurden innerhalb von 48 h granulärer (dargestellt im *Forward-/Sidescatter*, R1 bis R3). Des-TZR⁺CD8⁺T-Zellen exprimierten innerhalb von 48 h zunehmend die aktive Form des Enzyms Caspase-3, im dargestellten Beispiel mit 0,16 % aktive Caspase-3-positiven, CD8⁺ Zellen nach 4 h Inkubation, über 1,02 % nach 24 h hin zu 23,34 % nach 48 h. Ebenso waren Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen zunehmend Propidiumiodid-positiv, bei 2,2 % gesamt Propidiumiodid-positiven Lymphknotenzellen nach 4 h Inkubation, über 4,05 % nach 24 h zu 28,26 % positiven Zellen nach 48 h Inkubation.

Das Bild der Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen nach vierstündiger Inkubation in 5 % Ethanol zur Kontrolle entspricht dem Bild nach 24 h Inkubation in Vollmedium mit 2,3 % aktive Caspase-3-positiven, CD8⁺ Zellen und 1,6 % Propidiumiodid-positiven, CD8⁺ Zellen.

Positivkontrolle Des-TZR x K^{b-lo}

4 h Inkubation in 5 % Ethanol

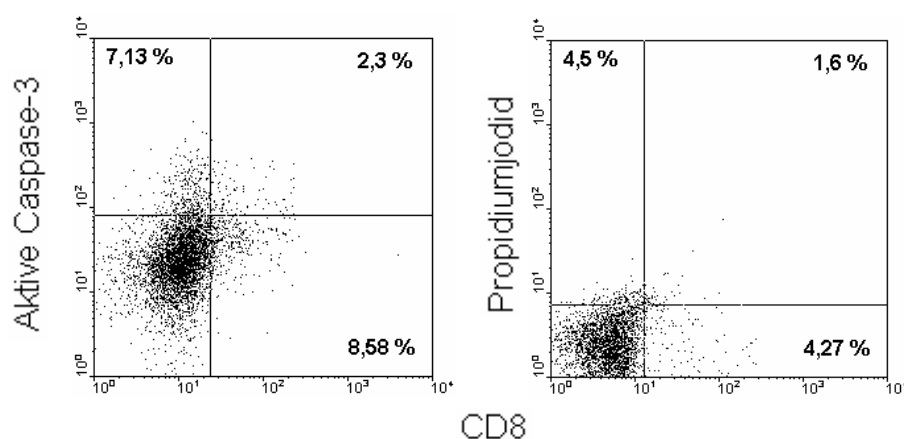


Abb. 24: Inkubation von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen über 4 Stunden in 5 % Ethanol. Dargestellt sind die Zunahme von Zellen, die aktive Caspase-3 als Marker für Apoptose exprimieren sowie die Zunahme von Zellen, die Propidiumiodid-positiv sind als Marker für nekrotische Zellen.

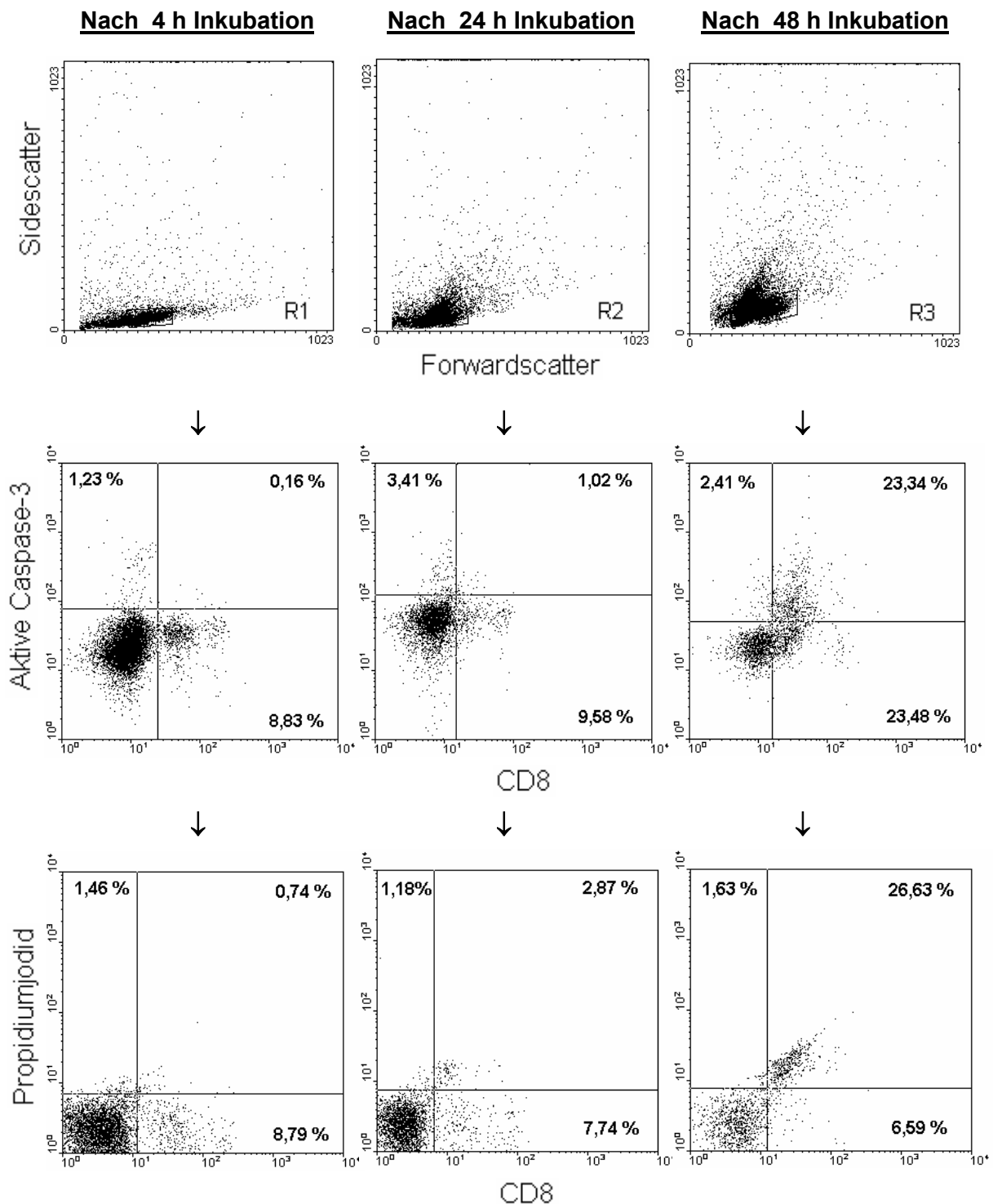
Des-TZR x K^{b-lo}

Abb. 25: Inkubation von Des-TZR x K^{b-lo} Lymphknotenzellen über 48 Stunden. Dargestellt sind die Zunahme an Granularität, die Zunahme von Zellen, die aktive Caspase-3 exprimieren als Marker für Apoptose sowie die Zunahme von Zellen, die Propidiumjodid-positiv sind als Marker für nekrotische Zellen. Wiedergegeben sind Ergebnisse der jeweiligen Populationen R1 bis R3.

3.6.2 Vitalität von Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen *in vitro*

Des-TZR Lymphknotenzellen wurden innerhalb von 48 h granulärer, dargestellt im Forward/Sidescatter (R1 bis R3). Innerhalb von 48 h stieg der Anteil aktiver Caspase-3-positiver, CD8⁺ T-Zellen nicht über 4 %, bei 1,08 % nach 4 h Inkubation und 1,84 % nach 24 h Inkubation. Der Anteil Propidiumjodid-positiver Lymphknotenzellen lag nach 4 h Inkubation bei 3,3 %, nach 24 h bei 5,88 % und nach 48 h bei 9,95 %. Der Anteil aktiver Caspase-3-negativer CD8⁺ Zellen lag während der gesamten Inkubation im Mittel bei 36,13 %.

Des-TZR⁺CD8⁺ T-Zellen werden bei der vierstündigen Inkubation mit 5 % Ethanol zu 36,47 % Aktive-Caspase-3-positiv und zu 12,38 % Propidiumjodid-positiv.

Positivkontrolle Des-TZR

4 h Inkubation in 5 % Ethanol

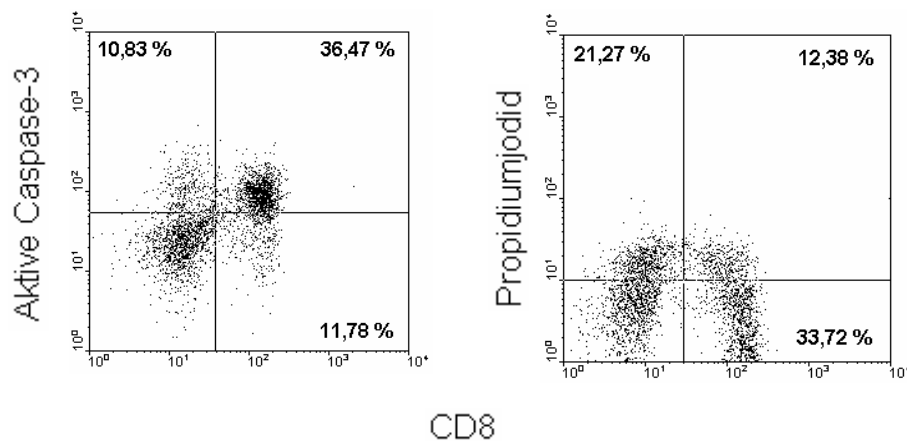


Abb. 26: Inkubation von Des-TZR Lymphknotenzellen über 4 Stunden in 5 % Ethanol. Dargestellt sind die Zunahme von Zellen, die aktive Caspase-3 exprimieren als Marker für Apoptose sowie die Zunahme von Zellen, die Propidiumjodid-positiv sind als Marker für nekrotische Zellen.

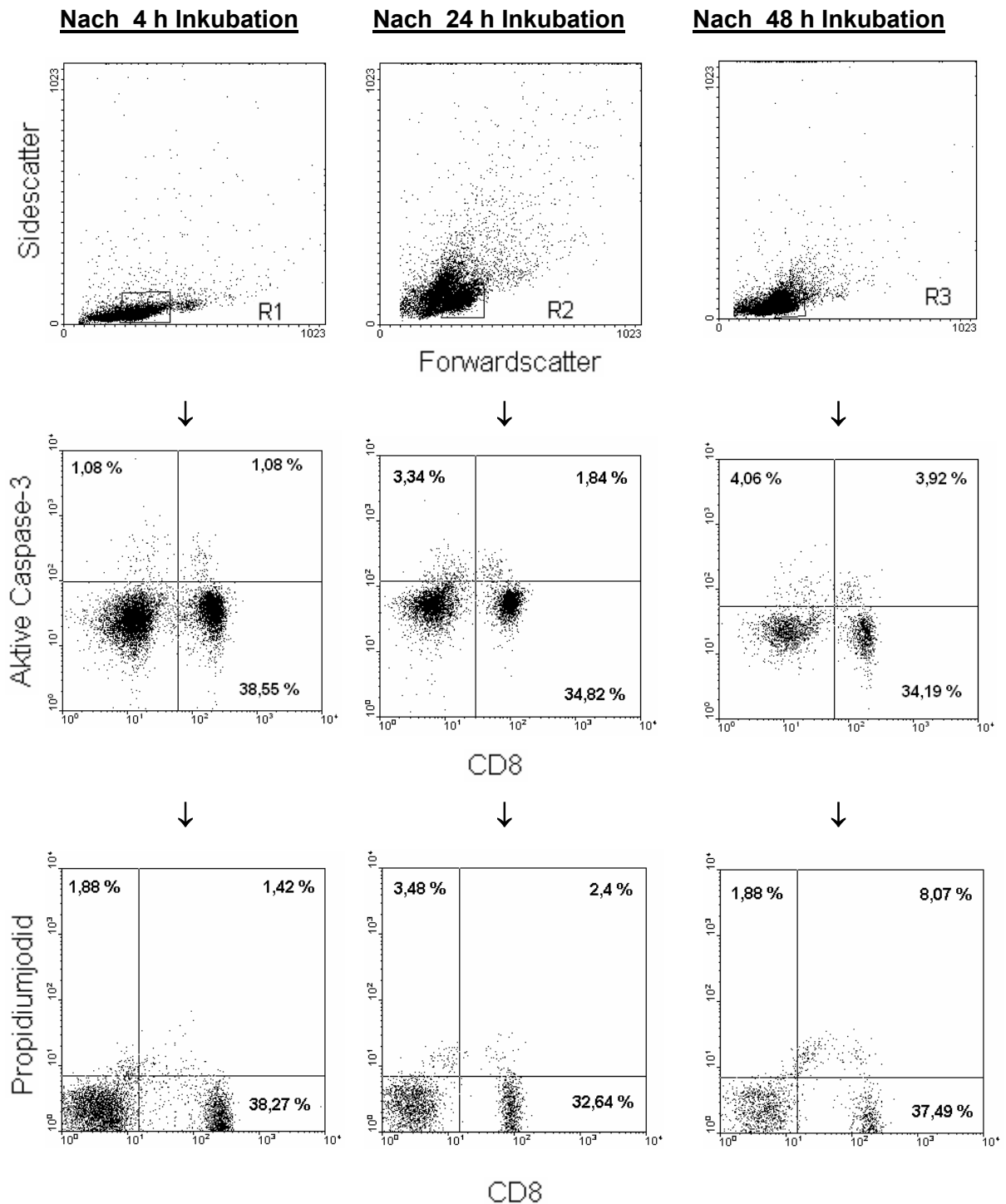
Des-TZR

Abb. 27: Inkubation von Des-TZR Lymphknotenzellen über 48 Stunden. Dargestellt sind die Zunahme an Granularität, die Zunahme von Zellen, die aktive Caspase-3 exprimieren als Marker für Apoptose sowie die Zunahme von Zellen, die Propidiumjodid-positiv sind als Marker für nekrotische Zellen. Wiedergegeben sind Ergebnisse der jeweiligen Populationen R1 bis R3.

3.7 Positive und negative Selektion im Thymus von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen und Des-TZR transgenen Thymozyten beim adulten Tier

Thymuszellen adulter Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} transgener Tiere wurden vereinzelt und durchflußzytometrisch auf die Expression von CD4, CD8 und Des-TZR hin untersucht. Durchgeführt wurden die Experimente mit 5 Tieren, es wird jeweils ein Tier exemplarisch dargestellt.

3.7.1 Expression von CD4 und CD8 durch Des-TZR x K^{b-lo} transgene und Des-TZR transgene Thymozyten

Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} transgene Thymozyten unterscheiden sich in der Expression von CD8 und CD4. Während in der Des-TZR transgenen Maus 33,73 % der Thymozyten doppelt-positiv sind, sind es in der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Maus 63,82 %.

Unterschiede gibt es auch in der Expression nur eines der beiden T-Zell-Marker: während bei der Des-TZR transgenen Maus im einfach-positiven Stadium mehr Thymozyten CD8 exprimieren als CD4, ist es bei der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Maus umgekehrt, es exprimieren mehr Thymozyten CD4 als CD8.

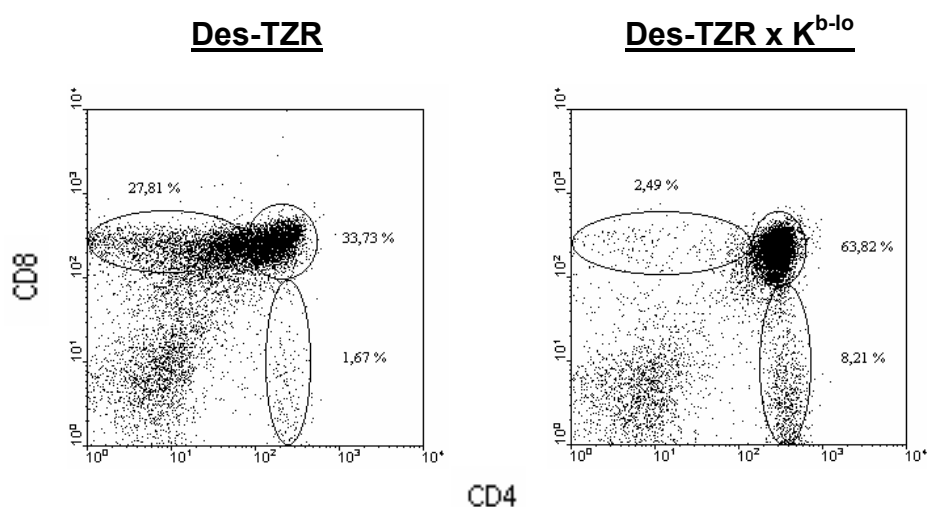


Abb. 29: Expression von CD4 und CD8 bei Thymozyten Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgener, adulter Tiere.

3.7.2 Expression des Des-TZR-Klonotyps durch Des-TZR x K^{b-lo} transgene und Des-TZR transgene Thymozyten

8,46 % der $CD8^+$ Des-TZR transgenen Thymozyten exprimieren den Des-T-Zellrezeptor im Thymus einer adulten Maus. Im Thymus einer adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Maus sind 1,09 % der Thymozyten $Des-TZR^+CD8^+$.

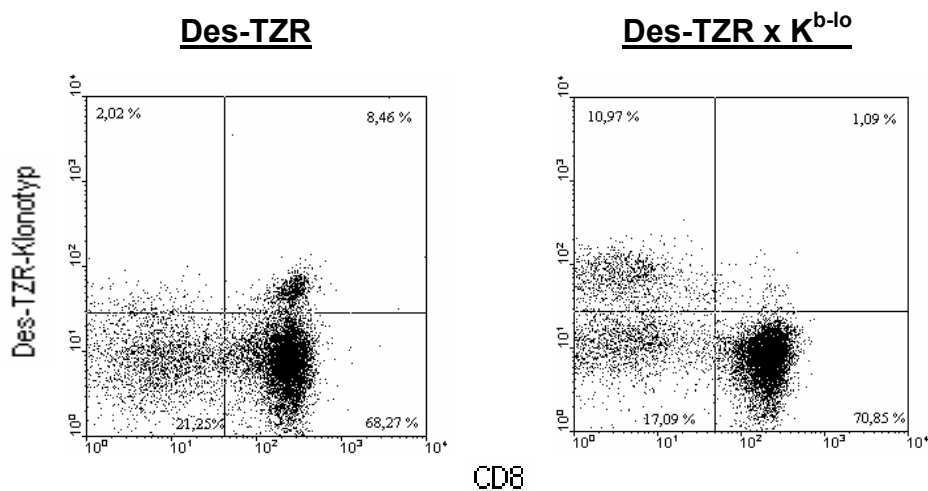


Abb. 30: Expression von CD4 und CD8 bei Thymozyten Des-TZR x K^{b-lo} transgener und Des-TZR transgener, adulter Tiere.

3.7.3 $Des-TZR^+CD8^-$ Thymozyten in adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren sind doppelt negativ

$Des-TZR^+CD8^-$ Thymozyten (R1) in adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren exprimieren nicht den CD4-Korezeptor, sie sind in Bezug auf die Korezeptoren also doppelt-negativ. Sowohl CD69 als auch CD122 werden von der Population exprimiert.

Im Vergleich dazu exprimieren die Thymozyten adulter Des-TZR transgener Tiere CD69 in höherer Dichte als in adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren. CD122 wird nicht exprimiert, aber ein Teil der Thymozyten exprimiert CD4.

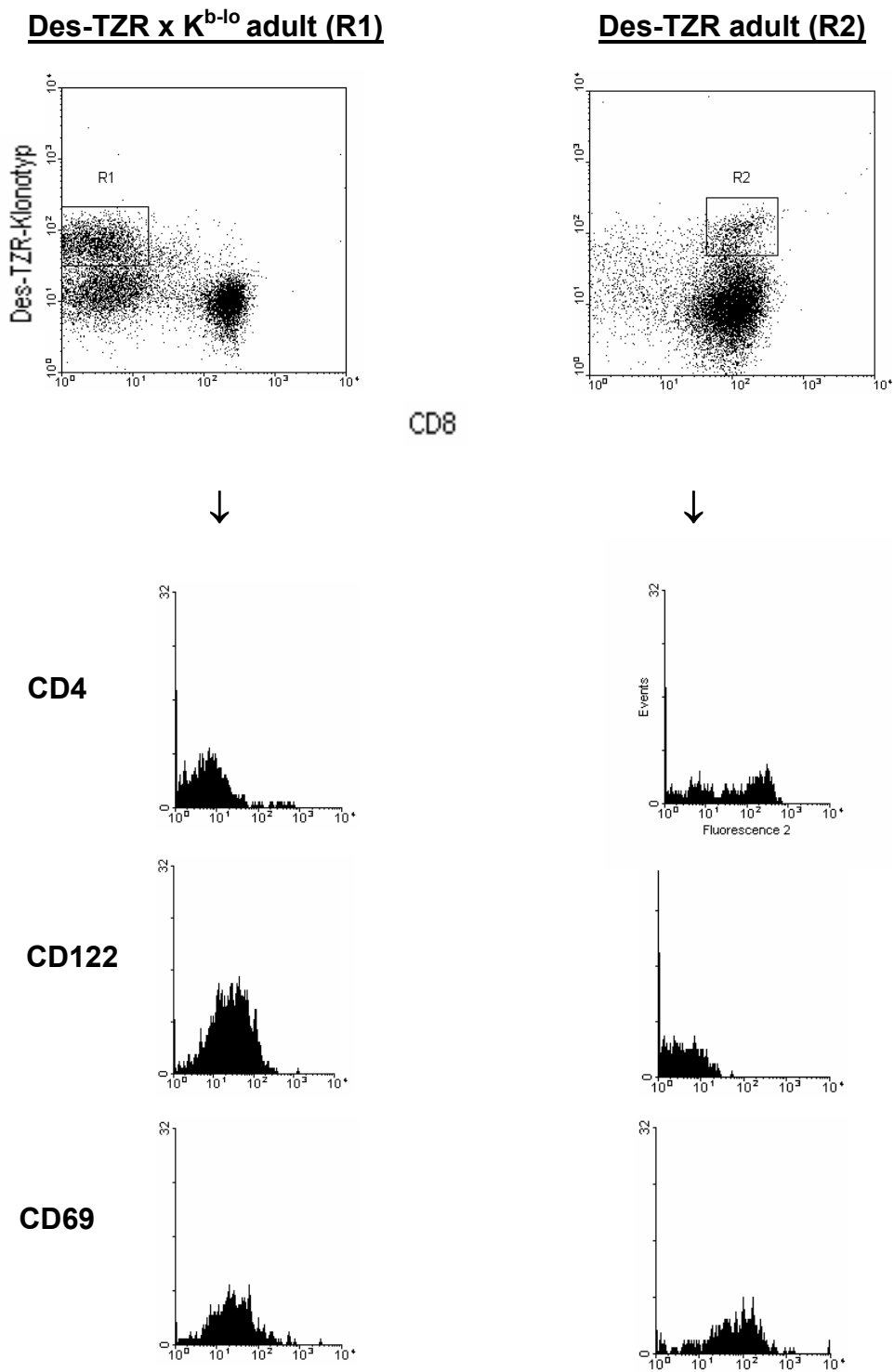


Abb. 31: Expression von CD4, CD122 und CD 69 bei Des-TZR⁺CD8⁺ Thymozyten adulter Des-TZR x K^{b-10} und Des-TZR transgener Tiere.

	<u>Des-TZR x K^{b-lo} adult</u>	<u>Des-TZR adult</u>
CD4	-	+/-
CD122	+	-
CD69	+	++

Tab. 10: Expression von CD4, CD122 und CD 69 bei Des-TZR⁺CD8⁻ Thymozyten adulter Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgener Tiere.

3.8 Unterschiede in der Differenzierung zwischen Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Thymozyten

Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Mäusen wurden im Alter von 0, 5, 10 und 23 Tagen der Thymus entnommen, die Zellen vereinzelt und durchflußzytometrisch dargestellt. Verglichen wurde mit adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäusen, als Kontrolle wurde bei jeder Färbung ein adultes Des-TZR transgenes Tier mitgeführt. Durchgeführt wurden die Experimente mit 20 Des-TZR und 25 Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren, es wird jeweils ein Tier exemplarisch dargestellt.

3.8.1 Unterschiede in der Expression von CD4 und CD8 zwischen neonatalen Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Thymozyten

Bei der neonatalen Des-TZR transgenen Maus ist die Population der doppelt-positiven Thymozyten am stärksten vertreten mit 82,28 %. 8,36 % der Zellen sind einfach-positiv für CD8, 2,52 % für CD4. Des-TZR x K^{b-lo} transgene Thymozyten exprimieren zu 1,87 % CD4 und CD8 gleichzeitig. Eine eindeutige Zuordnung zu einer einfach positiven Population ist jedoch schwierig, da die restlichen Thymozyten überwiegend doppelt-negativ sind, bzw. einen der beiden Korezeptoren in sehr geringer Dichte exprimieren und eine eindeutige Zuordnung nicht ermöglichen.

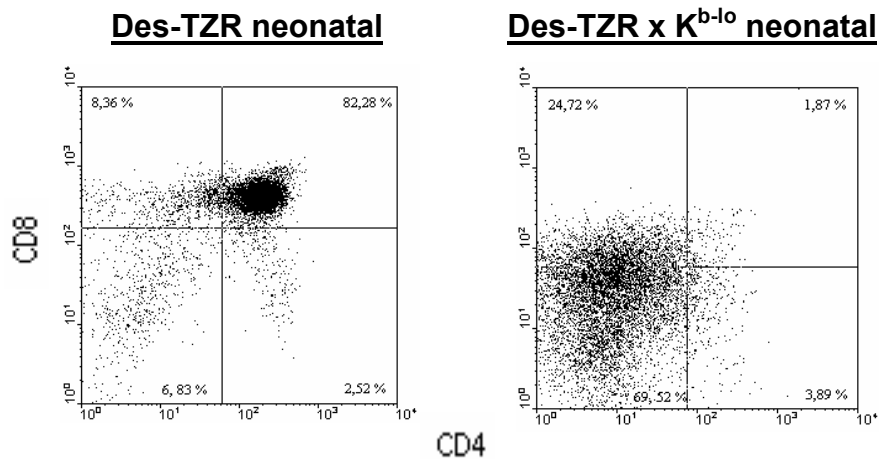


Abb. 31: Expression von CD4 und CD8 bei Thymozyten Des-TZR x K^{b-lo} transgener und Des-TZR transgener, neonataler Tiere nach der Geburt.

3.8.2 Unterschiede in der Expression des Des-TZR-Klonotyp zwischen neonatalen Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Thymozyten

Bei neonatalen Des-TZR transgenen Thymozyten fehlt die Des-TZR^{hi}CD8^{hi} Population, im Vergleich dazu liegt die Expression bei der mitgeführten adulten Kontrolle bei 5,7 %.

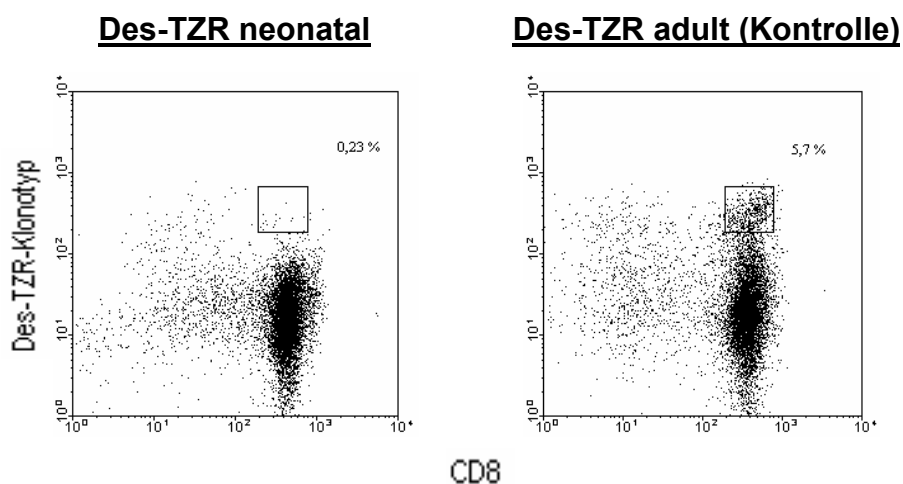


Abb. 32: Expression des Des-TZR und CD8 bei Thymozyten Des-TZR transgener, neonataler Tiere.

Bei den Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren finden sich zwei Populationen von Des-TZR⁺CD8⁺ Thymozyten: 25,2 % exprimieren den Des-T-Zellrezeptor in intermediärer

und CD8 in geringer Dichte ($\text{Des}^{\text{int}}\text{CD8}^{\text{lo}}$), 29,96 % exprimieren den Des-T-Zellrezeptor und CD8 in geringer Dichte ($\text{Des}^{\text{lo}}\text{CD8}^{\text{lo}}$).

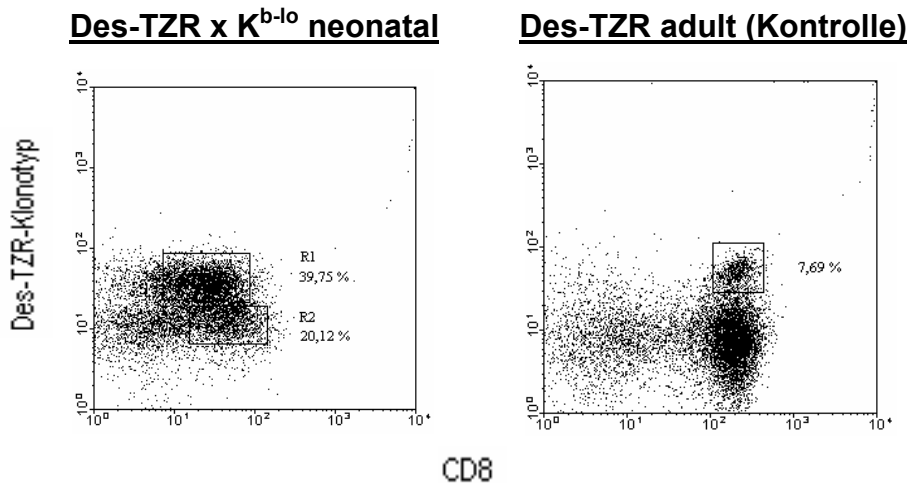


Abb. 33: Expression des Des-T-Zellrezeptors und CD8 bei Thymozyten Des-TZR x $K^{\text{b-lo}}$ transgener, neonataler Tiere.

3.8.3 Phänotyp der $\text{Des}^{\text{hi}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ und $\text{Des}^{\text{int}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ Thymozyten

$\text{Des}^{\text{int}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ (R1) Thymozyten exprimieren CD122 in geringer Dichte, von den $\text{Des}^{\text{lo}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ (R2) Thymozyten wird der Marker nicht exprimiert.

Beide Thymozyten-Populationen exprimieren CD69, $\text{Des}^{\text{int}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ Thymozyten in hoher Dichte. $\text{Des}^{\text{lo}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ Thymozyten exprimieren CD69 sowohl in geringer, als auch in hoher Dichte.

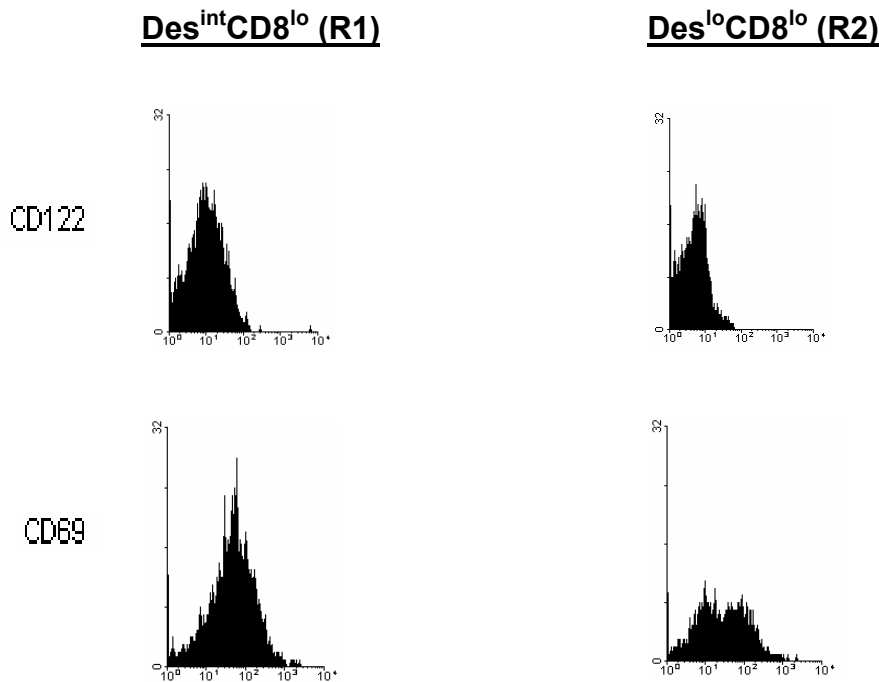


Abb. 34: Phänotyp der Des^{hi}CD8^{lo} und Des^{int}CD8^{lo} Thymozyten, untersucht wurde die Expression von CD122 und CD69

	<u>Des-TZR^{int}CD8^{lo} (R1)</u>	<u>Des-TZR^{lo} CD8^{lo} (R2)</u>
CD122	+	-
CD69	++	+/-

Tab. 11: tabellarische Darstellung des Phänotyps der Des-TZR x K^{b-lo} doppelt-transgenen (Des-TZR^{int}CD8^{lo} und Des-TZR^{lo}CD8^{lo}) Thymozyten bezogen auf CD69 und CD122.

3.8.4 Des-TZR⁺CD8⁺ Thymozyten sind in adulten Des-TZR x K^{b-lo} Tieren nicht mehr nachweisbar

Sind im Thymus einer neonatalen Des x K^{b-lo} Maus 35,05 % der Thymozyten noch vom Des^{int}CD8^{lo} (R1) Phänotyp und 24,55 % von Des^{lo}CD8^{lo} (R2) Phänotyp, so hat sich die Des^{int}CD8^{lo} Population am Tag 5 auf 19,77 % reduziert, während die Des^{lo}CD8^{lo} Population mit 26,1 % erhalten blieb.

Mit zunehmenden Alter können keine Des-TZR positiven Thymozyten mehr nachgewiesen werden und generell gleicht das Bild dem einer adulten Des-TZR

Maus, bei der jedoch eine Bildung Des-TZR positiver Thymozyten nachgewiesen werden kann.

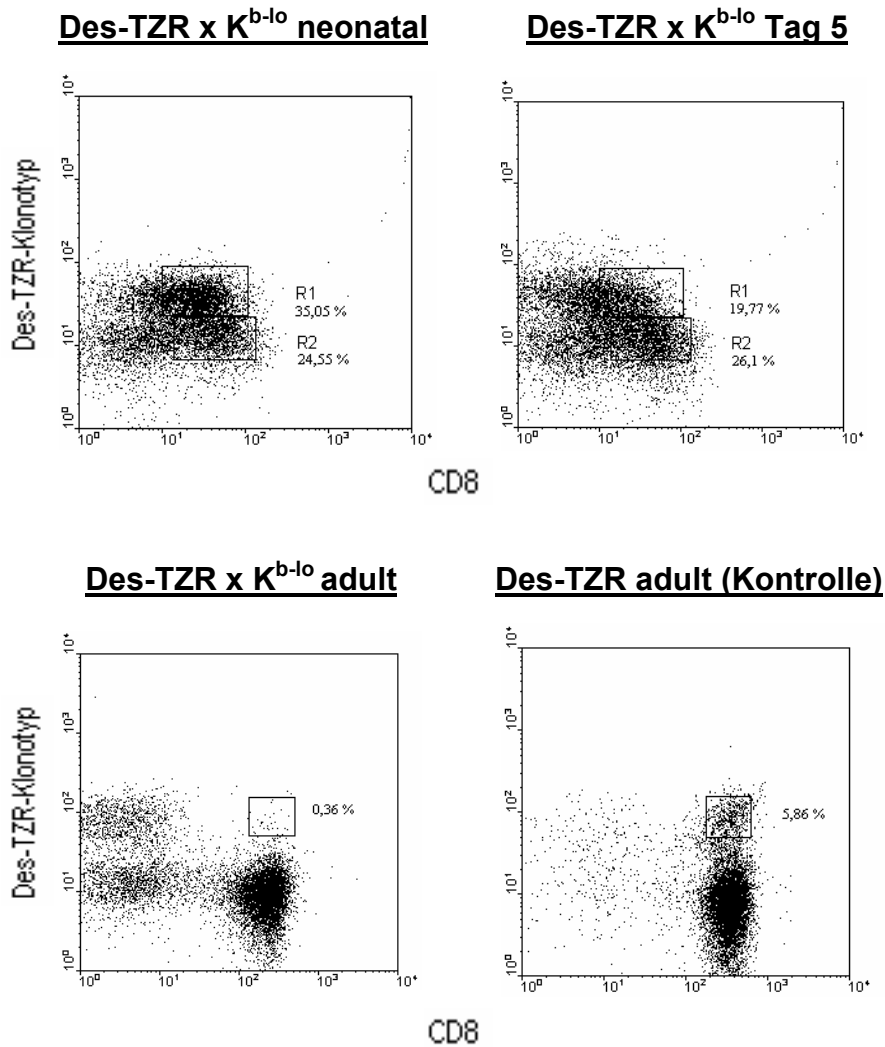


Abb. 35: Die Expression des Des-TZR auf Thymozyten von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren nimmt mit zunehmenden Alter ab, dargestellt ist der Verlauf von neonatal bis adult im Vergleich zu einer adulten Des-TZR transgenen Maus.

3.8.5 Des-TZR⁺CD8⁻ T-Zellen sind in adulten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren doppelt negativ

Des-TZR⁺CD8⁻ T-Zellen adulter Des-TZR x K^{b-lo} transgener Tiere exprimieren auch nicht den CD4-Korezeptor.

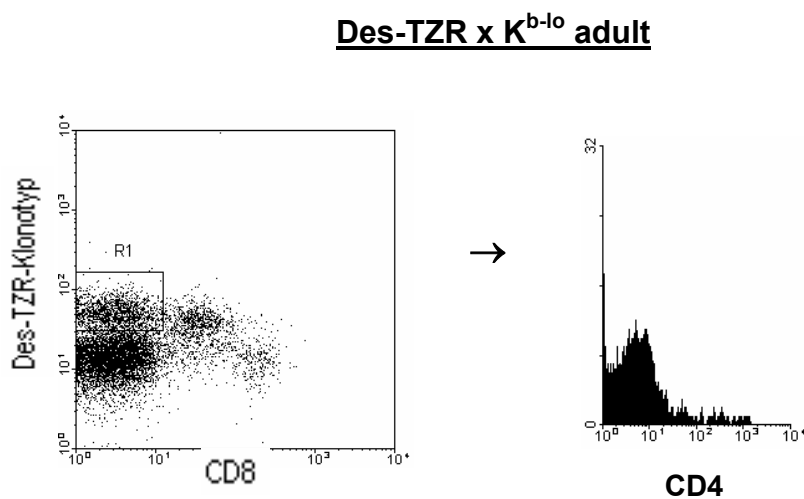


Abb. 36: CD4-Expression Des-TZR⁺CD8⁻ T-Zellen (R1) adulter Des-TZR x K^{b-lo} transgener Tiere.

4.1 Phänotyp Des x K^{b-lo} transgener T-Zellen

Die Antwort des Immunsystems auf eine Antigenstimulation, sei es ein Pathogen, eine Krebszelle oder ein Selbstantigen, ist so ausbalanciert, daß normalerweise eine angemessene Antwort erfolgt: Reaktionen auf Selbstantigene werden kontrolliert oder verhindert und expandierte Populationen reaktiver Zellen werden nach Beseitigung des Pathogens wieder auf ihr normales Maß gestutzt [91].

Seit den siebziger Jahren vermutet man, daß u.a. spezialisierte Lymphozyten für die Regulation des Immunsystems verantwortlich sind: man postulierte die Existenz sog. T_{suppressor}-Zellen, da T-Zellen eines toleranten Tieres diese Toleranz auf ein naives Tier übertragen konnten, wenn sie zusammen mit dem Antigen verabreicht wurden [119, 120].

Unglücklicherweise wurden bei der Erforschung dieser Zellen Fehler gemacht und falsche Schlüsse gezogen, so daß das ganze Konzept diskreditiert war, bis Mitte der neunziger Jahre neue Erkenntnisse über CD4⁺CD25⁺ – nun regulatorische T-Zellen genannte – Lymphozyten zum Umdenken zwangen [91, 119].

Seitdem konnten viele Erkenntnisse über regulatorische T-Zellen gewonnen werden, die sich jedoch zumeist auf CD4⁺ T-Zellen beschränken. Im Gegensatz dazu stand den hier vorliegenden Untersuchungen ein Modell CD8⁺ T-Zellen zur Verfügung, das durch seine Besonderheiten hervorragend für Versuche geeignet war. Durch die Kreuzung zweier transgener Mausstämme entstanden nicht nur T-Zellen mit regulatorischen Fähigkeiten, wie in einem *Graft-versus-Host*-Modell bewiesen werden konnte. Auch die Spezifität dieser Zellen war bekannt und konnte anhand eines Klonotyp-spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht werden.

Während parallel weitere Untersuchungen zum *Graft-versus-Host*-Modell durchgeführt wurden [siehe Dissertation von Sebastian Schwarte, *Etablierung einer allogenen Knochenmarktransplantation zur Prävention der Graft-versus-Host Reaktion mittels immunregulatorischer T-Zellen in einem transgenen*

Mausmodell, an der Medizinischen Hochschule Hannover] stand im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit die regulatorische Zelle an sich im Zentrum des Interesses: was ist ihr Phänotyp, zeigt sie eine thymische oder extrathymische Entwicklung, wie verhält sie sich in der Peripherie und über welche Mechanismen übt sie ihren regulatorischen Effekt aus?

Um zunächst den Phänotyp der CD8⁺ regulatorischen T-Zellen unseres Modells zu beschreiben, wurden diese durch eine indirekte Negativ-Selektion mit Hilfe von Dynabeads zuerst angereichert, indem aus einer Suspension von Lymphknoten- und Milzzellen CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten entfernt wurden.

Der Anteil Des-TZR⁻CD8⁻ Zellen konnte insgesamt stark reduziert, aber nicht ganz beseitigt werden. Der Grund hierfür liegt im Kompromiß zwischen der Reinheit der Zellpopulation und der Ausbeute: die verwendeten Antikörper wurden in einer Konzentration eingesetzt, die eine höhere Ausbeute der erwünschten Zellen erlaubten. Bei einer höheren Konzentration vor allem der Antikörper gegen B-Zellantigene kam es zu hohen Verlusten bei den Zielzellen.

Das Verfahren der Negativ-Selektion wurde angewandt, um die Zielzellen nicht durch eine direkte Aufreinigung, z.B. unter Verwendung des Des-TZR-Klonotyp-Antikörpers, zu aktivieren. Tatsächlich zeigen die Zellen im Hinblick auf die Oberflächen-Marker CD62L (L-Selektin), CD69, CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors), und CD45RB einen naiven Phänotyp. Untersucht wurden die Populationen Des-TZR^{hi}CD8^{hi} der Des-TZR transgenen Mäuse, sowie die Populationen Des-TZR^{lo}CD8^{lo} und Des-TZR^{int}CD8⁻ der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäuse.

L-Selektin wird auf naiven T-Zellen in hoher Dichte exprimiert und ist verantwortlich für das *Homing* der Zellen vom Blut in peripheres lymphatisches Gewebe [121]. Sowohl die untersuchten Zellen der Des-TZR transgenen als auch Des-TZR x K^{lo} transgenen Tiere exprimierten dieses Antigen in hoher Dichte. Gleiches gilt für die Expression von CD45RB, das in der Entwicklung von der naiven zur *memory*-T-Zelle hin abnimmt [122].

CD69 oder *early activation antigen* ist ein Antigen, das in weniger als zwei Stunden nach Aktivierung von T-Zellen exprimiert wird [123, 124], es wurde von den untersuchten Zellen nicht exprimiert.

Interessanterweise zeigen aber die T-Zellen der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Mäuse im Gegensatz zu den einfach-transgenen Tieren eine hohe Expressionsdichte von CD44 und der IL-2-Rezeptor- β -Kette (CD122). Dieser Phänotyp erinnert an NKT-Zellen, auch auf Hinblick der Expression von $CD8\alpha^+\beta^-$ Korezeptoren und der intermediären Expressionsdichte des T-Zellrezeptors.

Die in der Untersuchung verwendeten Mäuse sind auf B10.BR-Hintergrund gezüchtet und exprimieren somit das NK1.1 Allel [125, 126]. Zudem exprimieren Des-TZR^{lo}CD8^{lo} T-Zellen CD8, und der T-Zellrezeptor setzt sich nicht aus dem für NKT-Zellen bekannten kanonischen $V\beta 8$ Repertoire und der invarianten Kette $V\alpha 14J\alpha 281$ zusammen, sondern besteht aus den Ketten $V\alpha 2$ und $V\beta 2$ [95]. Diese Fakten sprechen gegen eine Zuordnung der Des-TZR^{lo}CD8^{lo} zu den klassischen NKT-Zellen [58]. Hammond et al. und Emoto et al. zählen jedoch, wie eingangs erwähnt [62, 63], auch andere T-Zellen zu den NKT-Zellen. Hammond et al. beschreiben $CD8^+$ NKT-Zellen, die NK1.1 negativ sind und vornehmlich $CD8\alpha^+\beta^-$ Korezeptoren exprimieren, außerdem nicht abhängig sind von der invarianten Kette $V\alpha 14J\alpha 281$ und im Gegensatz zu anderen NKT-Zellen nach Aktivierung kein IL-4 produzieren. Emoto et al. beschreiben $CD8^+$ NKT-Zellen u.a. als $CD122^+$ und, anders als unsere Zellen, als $CD69^+$, aber auch als $CD25^-$.

Watanabe et al. gehen einen Schritt weiter und fassen alle T-Zellen, auch die NKT-Zellen, die den T-Zellrezeptor in intermediärer Dichte sowie CD122 exprimieren, als intermediäre T-Zellen zusammen [69]. Unabhängig von der Frage, ob die in dieser Arbeit beschriebenen regulatorischen T-Zellen zu NKT-Zellen gezählt werden können oder nicht, weil sie nicht der klassischen Definition entsprechen, wohl aber der erweiterten, fügen sie sich ein in die heterogene Population der intermediären T-Zellen nach Watanabe et al.

4.2 Zytokinproduktion von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Lymphknotenzellen nach Aktivierung durch vernetzende Antikörper

Neben den klassischen NKT-Zellen, die nach Aktivierung große Mengen an $IFN\gamma$ und IL-4 produzieren, konnte auch für $CD8^+CD122^+$ intermediäre T-Zellen die Produktion von $IFN\gamma$ nachgewiesen werden [65]. Außerdem sind IL-10 und TGF- β immer wieder in Zusammenhang mit den Effektorfunktionen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen gebracht worden. Die in dieser Arbeit charakterisierten Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, nach Aktivierung durch anti-TZR β -Kette und CD28 bzw. Des-TZR-Klonotyp und CD28 die Interleukine IL-2, IL-10, $IFN\gamma$ und TGF- β zu sezernieren. Untersucht wurde nach 24 h und 48 h Aktivierung.

Da die Funktion von IL-4, wie eingangs erwähnt, bei regulatorischen T-Zellen eine eher untergeordnete Rolle spielt, wurde seine Produktion nicht untersucht; von größerem Interesse war, eine mögliche Produktion von IL-2 zu untersuchen: Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen stoßen keine K^b -positiven Hauttransplantate ab und zeigen in einer gemischten Lymphozyten-Reaktion keine Proliferation, der Verdacht, daß die Zellen anerg sind, liegt also nahe.

IL-2 ist ein Interleukin, das T-Zellen nach erfolgter Aktivierung aus ihrem ruhenden Zustand heraus zur Proliferation anregt. Es wird durch die aktivierte Zelle selbst sezerniert und wieder verbraucht [120].

Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen produzieren im Vergleich zu Des-TZR transgenen T-Zellen kaum IL-2 oder IL-10 nach Aktivierung mit dem spezifischen Antikörper anti-Des-TZR-Klonotyp. Eine deutliche Produktion zeigt sich erst durch die Aktivierung mit dem Antikörper gegen die TZR β -Kette. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu den Des-TZR transgenen T-Zellen, die auch durch die Aktivierung mit dem spezifischen Antikörper anti-Des-TZR-Klonotyp erhöhte Mengen an IL-2 und IL-10 sezernieren.

Die Sekretion von IL-2, aktiviert durch den pan-TZR β -Antikörper, fällt stärker aus als durch den Klonotyp-spezifischen Antikörper, weil durch ersteren zusätzlich T-Zellen aktiviert werden, die neben dem transgenen Des-T-Zellrezeptor aufgrund eines Rearrangements endogener TZR α -Ketten auch einen zweiten T-Zellrezeptor an der Zelloberfläche exprimieren. Diese T-Zellen haben in der doppelt-transgenen Des x K^{b-lo} Maus einen Selektionsvorteil, was sich in der erhöhten IL-2-Sekretion im Vergleich zu den Des-TZR-Mäusen widerspiegelt [98].

Beide Zellpopulationen verbrauchen das Interleukin innerhalb der 48stündigen Inkubation wieder. Die als Kontrolle mitgeführten B10.BR T-Zellen beweisen die Spezifität des Antikörpers anti-Des-TZR-Klonotyp, da sie durch ihn nicht zur Sekretion von IL-2 angeregt werden. Ein Unterschied zu den transgenen Mausstämmen zeigt sich auch in der Aktivierung durch den pan-TZR β -Antikörper: das sezernierte IL-2 akkumuliert und wird in der Inkubationszeit von 48 Stunden langsamer verbraucht.

Daß Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen verglichen mit Des-TZR transgenen T-Zellen nur äußerst geringe Mengen an IL-2 sezernieren, weist auf einen anergen Zustand dieser Zellen hin. Die parallel zu den Zytokin-Messungen durchgeführten Proliferationsstudien zeigen jedoch, daß die geringe Menge an IL-2, die von den Des x K^{b-lo} transgenen T-Zellen nach Aktivierung durch den Klonotyp-spezifischen Antikörper sezerniert wird, ausreicht, eine Proliferation zu stimulieren, wenn auch die Proliferationsrate gegenüber der der Des-TZR transgenen T-Zellen um zwei Drittel reduziert ist. R. H. Schwartz faßt in einem *Review* verschiedene Ergebnisse von Studien zusammen, die den Rückschluß zulassen, daß Anergie kein absoluter Zustand ist, sondern vielmehr Abstufungen erkennbar sind [35]. Die Charakteristika der Des x K^{b-lo} transgenen T-Zellen – keine Reaktion auf das Antigen, aber dennoch geringe Produktion von IL-2 und geringe Proliferation – lassen den Schluß zu, daß sie sich in einem teil-anergen Zustand befinden.

Generell spiegelt die Proliferationsrate das Verhalten bei der Zytokin-Produktion wieder: Des-TZR T-Zellen werden im gleichen Maße durch den Klonotyp-

spezifischen Antikörper aktiviert, wie durch den pan-TZR β -Antikörper, während Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen stärker durch den pan-TZR β -Antikörper aktiviert werden, der auch die endogen rearrangierten T-Zellrezeptoren aktiviert. Die zur Kontrolle mitgeführten B10.BR T-Zellen zeigen nur bei dem pan-TZR β -Antikörper eine Proliferation sowie eine Produktion der untersuchten Interleukine. Auch zeigt sich, daß ausgehend von der Proliferationskinetik Des-TZR⁺ transgene T-Zellen schneller sind als B10.BR- T-Zellen. Dies spiegelt sich auch in dem schnelleren Verbrauch von IL-2 innerhalb von 48 Stunden wieder.

Generell produzieren Des-TZR und Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen nur geringe Mengen an IL-10. Eine Effektorfunktion von IL-10 in unserem Modell CD8⁺ regulatorischer T-Zellen, vergleichbar mit anderen Modellen regulatorischer T-Zellen ist somit wenig wahrscheinlich.

Hingegen produzieren Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen innerhalb von 48 Stunden genauso viel IFN- γ durch die Aktivierung mit dem spezifischen Antikörper anti-Des-TZR-Klonotyp wie Des-TZR transgene T-Zellen, innerhalb von 24 h sogar doppelt soviel. Dies ist eine sehr hohe Produktionsrate, wenn man bedenkt, daß die Proliferationsrate der doppelt-transgenen T-Zellen um zwei Drittel geringer ausfällt und gleichzeitig weniger Des-TZR x K^{b-lo} transgene Zellen den Des-T-Zellrezeptor exprimieren als Des-TZR Zellen (22 % gegenüber 36 % im unter 3.1.1 aufgeführten Beispiel der Negativselektion). Die Produktion von IFN- γ stimmt erneut mit Beobachtungen überein, die bei intermediären TZR-Zellen gemacht wurden [65]. Dem Interleukin könnte somit eine Schlüsselposition bei der Funktionsweise der Zellen zukommen. In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf die Untersuchungen an Makrophagen hingewiesen [82-84], die gezeigt haben, daß IFN- γ die Expression von IL-10 supprimiert - ein interessanter Aspekt, der mit der Beobachtung einer hohen Produktionsrate von IFN- γ und einer sehr niedrigen Rate von IL-10 in unserem Modell der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen konform geht.

Bei keiner der untersuchten Zellpopulationen gelang ein Nachweis von sezerniertem TGF- β . Der Versuch wurde nur einmal durchgeführt. Da nicht einmal die unspezifische Stimulierung durch den Antikörper gegen die T-Zellrezeptor- β -Kette zusammen mit CD28 zu einer Sekretion von TGF- β führte, liegt die Vermutung nahe, daß der Nachweis fehlgeschlagen ist, bzw. insgesamt unter der Nachweisgrenze des Assays lag.

Hinzu kommt die Tatsache, daß man membranständiges TGF- β , wie es für andere regulatorische T-Zellen nachgewiesen wurde [127], nicht mit dem ELISA-Verfahren nachweisen kann, so daß der letztendliche Beweis, daß Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen ihren immunmodulierenden Effekt nicht durch TGF- β vermitteln, in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht wurde.

Geht man jedoch davon aus, daß TGF- β und IL-10 sich gegenseitig bedingen [78], scheint eine Beteiligung von TGF- β an den Effektorfunktionen regulatorischer Des-TZR x K^{b-lo} transgener T-Zellen wenig wahrscheinlich.

4. 3 Homeostatische Proliferation von Des x K^{b-lo} T-Zellen

Die Expression der Marker CD122 und CD44 trifft noch auf eine weitere Population von T-Zellen zu: auf naive T-Zellen, die eine homeostatische Proliferation durchlaufen. Es zeigen jedoch nicht alle bisher untersuchten transgenen T-Zellen diese spezielle Form der Vermehrung [22]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen wurden deswegen auf ihre Fähigkeit hin überprüft, unter lymphopenen Bedingungen und in Abhängigkeit vom positiv- und negativ-selektionierenden MHC:Antigen-Komplex zu proliferieren. Verglichen wurde hierbei mit der Proliferation in nicht-lymphopener und völlig disparater Umgebung.

Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen zeigen eine Proliferation sowohl in Empfängern mit positiv- als auch mit negativ-selektionierendem Hintergrund, wobei sie im letzteren stärker zur Teilung angeregt werden. Dies zeigt eine Abhängigkeit vom

selektionierenden MHC:Peptid-Komplex an, zumal Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen in einer völlig disparaten Umgebung, die diesen Komplex nicht bietet, zugrunde gehen. Zellteilungen finden außerdem nicht in negativ-selektionierenden Empfängern mit vollständigem T-Zell-Kompartiment statt, die T-Zellen unseres doppelt-transgenen Mausmodells sind also in der Lage, eine homeostatische Proliferation durchzuführen.

Weiterhin zeigt die Abhängigkeit vom selektionierenden MHC:Peptid-Komplex, daß der Phänotyp von Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen dem von *memory-like* T-Zellen entspricht, und nicht *memory* T-Zellen, die zur homeostatischen Proliferation auch ohne ihr selektionierendes Antigen fähig sind [22].

Da *memory-like* T-Zellen durch die homeostatische Proliferation nicht nur den Phänotyp, sondern auch die Effektorfunktionen von *memory* T-Zellen entwickeln, könnte in dem Proliferationsverhalten der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen der Schlüssel zu ihrem Phänotyp ($CD44^+$, $CD122^+$) und ihrer Effektorfunktion liegen: IL-15 hat nachweislich eine regulierende Funktion bei *memory* T-Zellen und teilt sich die Rezeptor-Kette CD122 mit IL-2. Die Vermutung, daß bei aller Ähnlichkeit zwischen *memory* T-Zellen und *memory-like* T-Zellen IL-15 auch bei letzteren proliferations-regulierende Funktion ausübt, scheint bei unseren regulatorischen T-Zellen nahezuliegen. Des weiteren wurde mehrfach von einer schnelleren $IFN\gamma$ -Produktion durch *memory-like* T-Zellen berichtet, verglichen mit naiven Zellen [27]. Hierin könnte der Grund dafür liegen, daß Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen verglichen mit Des-TZR transgenen T-Zellen bei geringerer Aktivierung trotzdem mehr $IFN\gamma$ produzieren, so daß der Phänotyp nicht einfach zufällig bei der homeostatischen Proliferation entsteht, sondern die Zellen in ihrer regulatorischen Funktion unterstützt.

Die Ergebnisse sind auch ein Hinweis auf das Verhalten der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen in der Peripherie: je nach Modell erlangen *memory-like* T-Zellen nach Erreichen der Homeostase den naiven Phänotyp wieder oder nicht. Dies könnte daraufhin deuten, daß sich eine Zellpopulation in ihrem Kompartiment einrichtet und

ständig weiterteilt [22]. Da Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen von vornherein den *memory-like* Phänotyp aufweisen, könnte eine ständige Proliferation vorliegen.

4.4 Des x K^{b-lo} T-Zellen zeigen eine thymusabhängige Entwicklung

Die hauptsächliche Differenzierung von T-Zellen zu $CD4^+$ - oder $CD8^+$ - T-Zellen erfolgt im Thymus [128, 130]. Daneben gibt es jedoch auch extrathymische Entwicklungswege im Darm [130, 131] und in der Leber [132]. T-Zellen, die in der Leber differenzieren, exprimieren den T-Zellrezeptor in intermediärer Dichte, T-Zellen aus dem Darm, sog. *intraepitheliale Lymphozyten* (IEL), in hoher. Alle TCR^{int} T-Zellen aus der Leber exprimieren $CD122$ in hoher Dichte, ebenso ein Teil der IEL. Beide Populationen enthalten $CD8\alpha\alpha$ -Homodimere [133, 134].

Aufgrund der Gemeinsamkeiten im Phänotyp mit den oben beschriebenen extrathymisch differenzierten T-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen extrathymischen Ursprunges sind. Hierfür wurden Tiere thymektomiert und T-Zell-depletiert, danach folgte eine Beobachtung von bis zu 120 Tagen.

Bei 4 von 8 Tieren zeigte sich innerhalb diesen Zeitraumes keine Rekonstitution des T-Zell-Repertoires. Bei zwei weiteren Tieren konnten nur bis zum Tag 53 bzw. 93 eine Untersuchung durchgeführt werden; diese Tiere zeigten ebenfalls keine Rekonstitution. Diese Ergebnisse lassen auf eine thymusabhängige Entwicklung der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen schließen.

Zwei Tiere zeigten demgegenüber eine Rekonstitution, die in ihrer Geschwindigkeit vergleichbar ist mit der Rekonstitution nach einer T-Zell-Depletion ohne vorausgehende Thymektomie. Diese Rekonstitutionsgeschwindigkeit lag bei ca. 20 % der ursprünglichen Populationsgröße bei 4 untersuchten Tieren und bei ca. 40 % bei einem Tier, jeweils nach 7 Wochen. Obwohl bei den thymektomierten Tieren in der abschließenden Untersuchung kein Thymusrest festgestellt werden konnte, ist es möglich, daß trotzdem Thymusgewebe nach der Operation verblieb, z.B. als sehr

kleiner Rest, der übersehen wurde, der aber ausreicht, um neue T-Zellen heranreifen zu lassen. Dies geht jedoch nicht mit der Beobachtung konform, daß ein anderes Tier trotz nachgewiesenen Thymusrests keine Rekonstitution zeigte. Eine weitere Erklärung für die Rekonstitution bei zwei der untersuchten Tiere könnte eine unvollständige T-Zell-Depletion sein; die verbliebenen Zellen erholten sich und konnten proliferierten.

Während sich das T-Zell-Repertoire bei Des-TZR transgenen Tieren innerhalb von 7 Wochen nach einer T-Zell-Depletion vollständig erholt, findet, wie bereits erwähnt, bei Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren eine Rekonstitution nur langsam statt, nach 7 Wochen liegt sie bei ca. 20 %. Dieses Ergebnis widerspricht der Aussage des vorhergehenden Versuchs, wenn nach einer Thymektomie und T-Zell-Depletion keine T-Zellen nachkommen, handelt es sich um eine thymusabhängige Entwicklung, denn mit einem funktionsfähigen Thymus müßte ein höherer Ausstoß junger T-Zellen möglich sein, vergleichbar mit den Des-TZR transgenen Tieren – es sei denn, Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen differenzieren nur zu bestimmten Zeitpunkten oder vor bzw. kurz nach der Geburt und sind danach auf homeostatische Proliferation angewiesen. Dies würde auch erklären, warum ein Tier trotz nachgewiesenen Thymusrests keine Rekonstitution zeigte.

Überraschend ist der Unterschied in der Proliferationsrate, vergleicht man die beiden folgenden Versuchsansätze: werden Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen in einen lymphopenen Empfänger überführt, findet innerhalb von 14 Tagen ein starke Proliferation statt, verbleiben jedoch einige T-Zellen im lymphopenen Tier, ist die Proliferationsrate nur gering. Hierbei kann es sich um eine optische Täuschung handeln, da lymphopene Empfänger mit einer hohen Anzahl an CFSE-markierten Zellen geschwemmt wurden, um die Proliferation erst sichtbar machen zu können. Jedoch bleibt der Unterschied zu den Des-TZR transgenen T-Zellen, die so stark proliferieren, daß innerhalb von 7 Wochen die Population wieder ihren vorherigen Zustand erreicht hat, im Gegensatz zu Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen, deren Rekonstitution bei 20-40% der ursprünglichen Populationsgröße lag.

Gleiches gilt für die Erklärung, daß Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen, die im Tier verblieben, im Gegensatz zu den Zellen, die in einen Empfänger überführt wurden, selbst dem depletierenden Antikörper ausgesetzt waren, bzw. der immunologischen Reaktion, die zur Depletion führte. Sie haben dabei möglicherweise einen Schaden erlitten, der eine Proliferation behindert, während bei den Versuchen zur Homeostase gesunde Zellen in einen lymphopenen Empfänger überführt werden – auch hier müßten Des-TZR transgene T-Zellen ebenso auf die Behandlung reagieren, es sei denn, Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen reagieren empfindlicher als Des-TZR transgene Zellen.

Für diese Vermutung spricht auch der folgende Versuch: stellt man *in vitro* Vergleiche zwischen der Vitalität von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR T-Zellen an, so sind Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen nach 48 h Inkubation stark apoptotisch bzw. nekrotisch, Des-TZR T-Zellen hingegen nur zu einem geringen Teil. Interessanterweise zeigen sich die Zellen umgekehrt anfällig für die Positivkontrolle zur Apoptose-Induktion, die vierstündige Inkubation in Ethanol. Dabei scheint es, daß Des-TZR x K^{b-lo} transgene T-Zellen weniger empfindlich auf eine kurze Störung reagieren, wie z.B. eine Aufreinigung mit anschließender CFSE- Färbung in DMSO oder eine kurze Inkubation in 5%iger Ethanol-Lösung zur Apoptose-Induktion, als eine T-Zell-Depletion im Tier oder eine 48stündige Inkubation unter physiologischen Bedingungen.

Hierin zeigen Des x K^{b-lo} transgene Zellen Ähnlichkeiten mit einem Modell muriner $CD8^{lo}V\beta 5^{lo}$ T-Zellen, beschrieben von Blish et al. Diese Zellen haben einen *memory* Phänotyp, proliferieren nach Aktivierung trotz exogenem IL-2 nur schwach und können ihre Zielzelle *in vitro* nicht zerstören. Mit Hilfe einer RT-PCR wurde in frisch isolierten, nicht aktivierten Zellen hohen Mengen an $IFN\gamma$ mRNA nachgewiesen. Auch diese Zellen sterben *in vitro* sehr schnell an Apoptose. Aus ihren Ergebnissen entwickelten C.A. Blish et al. das Modell $CD8^{+}$ T-Zellen, die nach erfolgter Aktivierung und Blastogenese ihren T-Zellrezeptor und Korezeptor herunterregulieren und in einen anergen Zustand verfallen, jedoch zu

Entzündungsorten wandern könnten, um dort $\text{IFN}\gamma$ zur Regulation der Immunantwort zu produzieren. Da *in vivo* eine etwas höhere Lebenszeit nachgewiesen werden konnte als *in vitro*, wurde vermutet, daß die Zellen durch ein Überlebenssignal, übermittelt durch IL-15, am Leben bleiben könnten [135]. Übertragen auf unser Modell könnte eine Abhängigkeit von IL-15 die Expression von CD122 begründen, zumal die Rolle von IL-15 bei der Homeostase bereits eingangs diskutiert wurde [31].

Um die Frage einer thymusabhängigen Entwicklung der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellen abschließend beantworten zu können, wurde die Differenzierung von Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Thymozyten untersucht. Tatsächlich findet man im Thymus neugeborener Tiere CD8^+ Thymozyten, die den Des-T-Zellrezeptor in hoher, bzw. intermediärer Dichte exprimieren.

Betrachtet man die Expression von CD4 und CD8 bei Des-TZR x K^{b-lo} und Des-TZR transgenen Thymozyten adulter Tiere, so lassen sich bereits am Bild der sog. Thymusschwalbe Unterschiede in der Differenzierung erkennen: bei den Des-TZR transgenen Thymozyten ist die CD8-einfach-positive Population größer als die der die CD4-einfach-positiven Population, bei den Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Thymozyten ist dieses Verhältnis umgekehrt. Dieses bereits veröffentlichte Ergebnis [11] beruht auf dem Modellansatz: der transgene Des-T-Zellrezeptor ist MHC-Klasse-I-restringiert, im einfach-transgenen Mausmodell der Des-TZR Maus haben CD8^+ Thymozyten somit einen Vorteil bei der positiven Selektion. Hingegen treffen potentiell autoreaktive, Des-TZR x K^{b-lo} Thymozyten im doppelt-transgenen Mausmodell im Thymus auf ihr Antigen, sie stellen somit für das Tier eine Gefahr dar und werden negativ selektioniert.

Dies spiegelt sich auch in der Größe des Thymus und der Anzahl der Thymozyten wieder: Bei Des-TZR x K^{b-lo} doppelt-transgenen Tieren ist der Thymus gegenüber den einfach-transgenen Tieren kleiner und die Anzahl der Thymozyten ist um das zwanzigfache reduziert [11].

Im neonatalen Thymus sind die Auswirkungen der negativen Selektion noch deutlicher. Generell steht das Bild der Thymusschwalbe für den Verlauf der T-Zell-Differenzierung: eingewanderte Vorläuferzellen entwickeln sich vom doppelt-negativen über das doppelt-positive Stadium hin zu einfach-positiven Zellen, die entweder den CD4- oder den CD8-Korezeptor zusammen mit CD3 exprimieren.

Während in der neonatalen Des-TZR transgenen Maus die Thymusschwalbe in Ansätzen schon ausgebildet ist, vor allem mit der großen Population doppelt-positiver Thymozyten und dem stärkeren Flügel CD8-einfach positiver Zellen, zeigt sich bei der Des-TZR x K^{b-lo} doppelt-transgenen Maus ein völlig anderes Bild: die Population doppelt-positiver Thymozyten ist kaum vorhanden, dafür ist die Population doppelt-negativer Zellen hier fast so groß wie die der doppelt-positiven Thymozyten der Des-TZR transgenen Maus. Fast untrennbar von der doppelt-negativen Population gehen die Thymozyten in das einfach-positive Stadium der $CD8^+$ Zellen über, ohne vorher das doppelt-positive Stadium zu durchlaufen.

Diese Art der Differenzierung von Thymozyten wurde bereits für $CD4^+$ NKT-Zellen beschrieben, die den T-Zell-Rezeptor in intermediärer Dichte exprimieren [136]. Maruyama et al. konnten in künstlich akut-athrophierten Mäusen einen alternativen Weg der T-Zell-Differenzierung nachweisen, wobei die untersuchten Thymozyten einen selbst-reaktiven T-Zellrezeptor stets in intermediärer Dichte exprimierten - ganz im Gegensatz zur normalen Entwicklung (vgl. Abb.1) - und ohne eine doppelt-positiven Entwicklungsstufe entweder nur den CD4-Korezeptor exprimierten oder doppelt-negativ waren. Die Autoren vermuteten statt der gewöhnlichen Differenzierung einen Verlauf über $CD3^-CD4^-CD8^- \rightarrow CD3^-CD4^{lo} \rightarrow CD3^{int}CD4^{lo}$. Die Ursache für diesen Sonderweg sahen sie in der unvollständigen negativen Selektion der Zellen.

Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich in einem transgenen Mausmodell, in welchem MHC-I-restringierte T-Zellen das H-Y Antigen erkennen [137]. Auch hier findet sich in transgenen Männchen eine im Vergleich zum transgenen Weibchen reduzierte Population doppelt-positiver Thymozyten, und auch die Gesamtzahl der Thymozyten

beim Männchen ist stark reduziert. Die Autoren Kiselow et al. erklärten dieses Phänomen jedoch durch eine verstärkte Depletion auf der Stufe der doppelt-positiven Zellen, ebenfalls hervorgerufen durch die Expression des spezifischen T-Zell-Rezeptors.

Takahama et al. untersuchten ebenfalls das Phänomen, daß die Population doppelt-positiver Thymozyten in negativ-selektionierenden transgenen Mausstämmen nicht oder nur stark reduziert nachgewiesen werden kann. Sie kamen dabei zum Schluß, ähnlich wie Maruyama et al., daß die negative Selektion nicht wie von Kiselow et al. angenommen, im Stadium der doppelt-positiven Thymozyten stattfindet, sondern bereits im direkten Vorläufer-Stadium der $CD4^-CD8^{lo}$ Thymozyten [138].

Ähnlich den Ergebnissen von Maruyama et al. gibt es auch bei der Expression des Des^+ T-Zellrezeptors zwischen den beiden hier untersuchten Mausstämmen starke Unterschiede. Bei Des -TZR transgenen Tieren findet man im neonatalen Thymus keine $Des^{hi}CD8^{hi}$ Thymozyten, erst einige Tage später, am Tag 5, sind die Zellen nachweisbar und zwischen Tag 10 und Tag 23 wird die Population deutlich sichtbar.

Bei Des -TZR x K^{b-lo} transgenen Tieren findet man im neonatalen Thymus gleich zwei Des -TZR und CD8 exprimierende Populationen: $Des^{int}CD8^{lo}$ sowie $Des^{lo}CD8^{lo}$. Man findet also bei dem Mausstamm, der das negativ-selektionierende Antigen im Thymus exprimiert, eine schnellere Entwicklung der Thymozyten vor, als bei dem Mausstamm, der das Antigen nicht exprimiert.

Die beiden Thymozyten-Populationen $Des^{int}CD8^{lo}$ und $Des^{lo}CD8^{lo}$ in der Des -TZR x K^{b-lo} transgenen Maus unterscheiden sich in der Expression der beiden Oberflächenmarker CD69 sowie CD122: $Des^{int}CD8^{lo}$ Thymozyten exprimieren CD69 und zum großen Teil CD122, während $Des^{lo}CD8^{lo}$ kein CD122 exprimieren und nur die Hälfte CD69.

CD69 wird von doppelt-positiven Thymozyten exprimiert, die die positive Selektion durchlaufen oder durchlaufen haben. Hare et al. [16] konnten beweisen, daß es

dabei für die Expression von CD69 zwingend notwendig ist, daß der Thymozyt in Wechselwirkung mit dem selektionierendem MHC getreten ist. Des x K^{b-lo} transgene Thymozyten durchlaufen jedoch nicht das doppelt-positive Stadium.

Hanke et al. fanden hingegen heraus [139], daß Thymozyten CD69 exprimieren, wenn sie auf ihr negativ-selektionierendes Antigen treffen, und daß diese Zellen außerdem auch CD122⁺ sind. Die Expression der beiden Marker wird also im vorliegenden Modell durch die TZR:MHC-Wechselwirkung des Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Thymozyten induziert.

Vergleicht man nun die Des^{int}CD8^{lo} mit der Des^{lo}CD8^{lo} Population, scheint es sich bei der Des^{int}CD8^{lo} um die reifere Thymozytenpopulation zu handeln, da sie den T-Zellrezeptor in etwas höherer Dichte exprimiert und CD122⁺ ist. Die Population der Des^{lo}CD8^{lo} Thymozyten ist hinsichtlich der Expressionsdichte von CD69 zweigeteilt mit einer Population, die den Marker in geringer Dichte exprimiert und einer anderen, die ihn in höherer Dichte exprimiert. CD122 exprimiert sie nicht und scheint deswegen die weniger reife Population zu sein.

Diese Ergebnisse zeigen nicht nur erneut, daß die Negativselektion von Thymozyten bereits vor der Positivselektion stattfinden kann, es sich also hierbei um zwei voneinander unabhängige Prozesse handelt [12]. Vielmehr zeigen sie auf, daß auch die Positivselektion entgegen der gängigen Lehrmeinung [140–142] nicht nur im doppelt-positiven Stadium der Zelle stattfinden, sondern durch die Anwesenheit des selektionierenden Antigens auch zu einem früheren Zeitpunkt forciert werden kann.

Mit zunehmenden Alter der Des-TZR x K^{b-lo} transgenen Maus verändert sich das Bild Des-TZR und CD8 exprimierender Thymozyten: die Population der Des^{int}CD8^{lo} Thymozyten scheint sich in der Darstellung in die Population der Des^{int}CD8^{lo} Zellen zu senken, aber auch diese Population exprimiert bald keinen Des-T-Zell-Rezeptor mehr und schließlich findet man in der adulten Maus nur noch Des-TZR⁺CD8⁻ Thymozyten. Gleichzeitig bildet sich das Bild der Thymusschwalbe heraus, d.h. der

Sonderweg der T-Zelldifferenzierung wurde in der adulten Maus zugunsten der gewohnten Differenzierung mit Positiv-Selektion im doppelt-positiven Stadium aufgegeben.

Diesen Ergebnissen ähnlich konnten verschiedene Studien zur Entwicklung des Immunsystems in Huhn- bzw. Mausmodellen [143-145] zeigen, daß der fetale Thymus während der Ontogenese in Wellen von hämatopoietischen Vorläuferzellen besiedelt wird, die wiederum in Wellen den Thymus als ausgereifte T-Zellen verlassen. Der ersten Emigrationswelle wird hierbei eine besondere Bedeutung bei der Etablierung des peripheren T-Zellpools zugesprochen, zumal weitere Studien vermuten lassen, daß die Emigration reifer T-Zellen bei Neugeborenen zu einer höheren Rate erfolgt, als bei adulten Tieren [144].

Auch konnte gezeigt werden, daß sich Thymozyten, vergleicht man neonatale Zellen mit adulten, funktionell voneinander unterscheiden [145]. Bei Des x K^{b-lo} transgene Tieren scheint dieses Phänomen auf die Spitze getrieben zu sein: nicht nur, daß die Differenzierung Des-TZR⁺CD8⁺ T-Zellen im Gegensatz zu Des-TZR einfach-transgenen T-Zellen nicht über das Stadium doppelt positiver Thymozyten verläuft, sie erfolgt auch nur bis zu einem bestimmten Alter des Tieres und wird dann vollständig eingestellt.

Die Population der Des-TZR⁺CD8⁻ Thymozyten exprimiert ebensowenig den CD4-Korezeptor, es handelt sich also um doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen), die auch in der Peripherie der Des-TZR x K^{b-lo} Mäuse zu finden sind.

DN T-Zellen werden auch zu den regulatorischen T-Zellen gezählt. Sie zeigen antitumorale Aktivität [146], induzieren Transplantat-Toleranz [147, 148], regulieren Autoimmunität [149] und sie verhindern eine *Graft-versus-Host*-Reaktion [150]. DN T-Zellen entstehen erst spät in der Ontogenie [151, 152] und man vermutet, daß sie sich aus CD8⁺ Vorläuferzellen entwickeln, da sich ihr CD8 α -Genlocus im demethylierten Zustand befindet und die Anzahl der DN T-Zellen in $\beta_2^{-/-}$ Tieren stark

reduziert ist [153, 154]. Innerhalb dieser Population doppelt-negativer Zellen finden sich auch NKT-Zellen mit einem reduzierten T-Zellrezeptor-Repertoire, beschränkt auf $V\alpha 14$ - $J\alpha 281$ und $V\beta 8.2$, 7 oder 2 [49, 50, 57].

DN T-Zellen entstehen aufgrund der Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit einem Selbst-Antigen. Budd und Mixter stellen dabei folgende Hypothese auf [155, 156]: auf Thymozyten und auf reifen T-Zellen in der Peripherie erscheint während der MHC:T-Zellrezeptor-Wechselwirkung auf der Zelloberfläche eine Kaskade von Oberflächenmolekülen, die die Intensität der T-Zellrezeptor- und kostimulatorischen Signale reflektiert. Am untersten Ende der Skala ist keine Interaktion und die Zelle stirbt aufgrund der Verweigerung, am obersten Ende steht das höchstmögliche Signal, das die Deletion hervorruft. Dazwischen liegt ein breites Spektrum an Möglichkeiten, die das Überleben der Zelle sichern und die insgesamt als positive Selektion bezeichnet werden. Bei einem starken Signal werden CD4 und CD8 herunterreguliert, um das Signal abzuschwächen. Gleichzeitig wird die Expression anderer Marker wie CD69, CD122, CD44 und NK1.1 induziert.

Dieses Modell geht im hohen Maße mit der Entwicklung der $Des^x K^{b-lo}$ transgenen T-Zellen konform: in der neonatalen Maus exprimieren $Des^{lo} CD8^{lo}$ Thymozyten kein CD122, beginnen aber mit der Expression von CD69, wie die Zweiteilung der Population im Histogramm zeigt. Mit der Heraufregulierung des T-Zellrezeptors bei den $Des^{int} CD8^{lo}$ Thymozyten exprimieren die Zellen CD122 und die gesamte Population exprimiert CD69. Diese Thymozyten haben eine so starke Wechselwirkung mit dem selektionierenden Antigen, das die positive Selektion über ein doppelt-positives Stadium ausbleibt. Vielmehr werden die Zellen bereits vorher negativ selektioniert. Mit dem Heranreifen des Thymus wird dieser Entwicklungsweg zugunsten einer positiven Selektion eingestellt. Da die zuvor entstanden T-Zellen nicht mehr durch Neuankömmlinge in der Peripherie ersetzt werden, hält sich die Population durch homeostatische Proliferation stabil.

Die jetzt durch die positive Selektion entstehenden Zellen haben aufgrund der starken Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit dem selektionierenden Antigen nur eine Überlebenschance, wenn kein Korezeptor exprimiert wird, also sind T-Zellen, die in der Des x K^{b-lo} Maus den T-Zellrezeptor in intermediärer Dichte exprimieren, doppelt-negativ.

In die gleiche Richtung zielt die Arbeit von Park et al. [157]. Sie fanden heraus, daß die Stimulation unreifer doppelt-positiver Thymozyten eine Differenzierung hervorruft, bei der durch IL-2 über den IL-2 Rezeptor β (CD122) die Reifung zugunsten von CD8 $\alpha\alpha$ Homodimeren ausfällt, um die Zellen vor der Deletion zu retten.

Der Phänotyp der Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen mit der Expression von CD122, CD44 und CD8 $\alpha^+\beta^-$ ergibt sich also durch die Umstände ihrer Differenzierung. Spätestens hier stellt sich die Frage, warum es zwei unterschiedliche Wege der T-Zell-differenzierung in der Des-TZR x K^{b-lo} Maus gibt, noch dazu der eine zeitlich begrenzt. Es ist jedoch bekannt, daß der neonatale Thymus bei der Vermittlung der klonalen Deletion ineffizient ist und autoreaktive Zellen während der ersten Lebensstage in die Peripherie gelangen können [158]. Der Grund für die zwei Differenzierungswege könnte also ein unreifer Thymus sein, der erst im Laufe der ersten Lebensstage in der Lage ist, die Neubildung von Des-TZR^{lo}CD8^{lo} T-Zellen zu unterbinden.

Andererseits reifen Des-TZR transgene Thymozyten durch ihren bereits rearrangiert vorliegenden T-Zellrezeptor schneller heran als Thymozyten mit einem natürlichen endogenen Rearrangement. Diese erste Welle von Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen könnte damit vor den endogenen Zellen die Thymusreifung durchlaufen, später aber kompetitiv unterdrückt werden.

Dies wiederum wirft die Frage auf nach Unterschieden in den Populationen der Des-TZR x K^{b-lo} T-Zellen, ob sogar die eine Population autoreaktiv ist und durch die andere in Schach gehalten werden muß.

Parallel zu den ersten Untersuchungen der T_{suppressor}-Zellen, die dann kurze Zeit später aufgrund von Falschinterpretationen für lange Zeit das Konzept in Verruf brachten, machten Nishizuka und Sakakura die Entdeckung, daß Mäuse, die im Alter von 3 Tagen thymektomiert wurden, eine Oophoritis entwickelten. Andere Forscher beschrieben weitere Autoimmunkrankheiten wie Gastritis, Pancreatitis und Thyroiditis, die in Abhängigkeit vom Mausstamm ausgebildet wurden [159, 160].

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden thymusabhängige Zellen vermutet, deren Entwicklung erst einige Tage nach der Geburt einsetzt und die immunregulatorische Fähigkeiten haben. Wird der Thymus vor ihrer Entstehung entfernt, entwickeln die Tiere Autoimmunkrankheiten.

Dementsprechend könnten Des-TZR^{lo}CD8^{lo} T-Zellen autoreaktive Zellen sein, die in den ersten Lebenstagen der Deletion entkommen, und Des-TZR^{int}CD8⁻ sind die regulatorischen T-Zellen, deren Aufgabe es ist, die autoreaktiven T-Zellen der ersten Generation in Schach zu halten. Da neonatale Mäuse jedoch für eine Thymektomie nicht zufriedenstellend betäubt werden können, konnten Untersuchungen, die Aufschluß über diese Vermutung hätten erbringen können, aufgrund der Tierschutzbestimmungen in Deutschland nicht durchgeführt werden.

Hammond et al. [158] konnten jedoch anhand NK1.1 exprimierender Tiere beweisen, daß es sich bei den regulatorischen T-Zellen bei Tag 3 thymektomierten Mäusen um klassische NKT-Zellen handelt, die nach der Thymektomie nicht mehr entstehen und ihre Funktion ausüben können. Allgemein zeigen die T-Zellen einer am Tag 3 thymektomierten Maus den Phänotyp von intermediären T-Zellen [158, 159]. Diese Ergebnisse lassen sich auf unser Modell übertragen, denn NKT-Zellen sind eine Subpopulation intermediärer T-Zellen und können auch doppelt-negativ sein.

4.5 Wirkmechanismus der $CD4^+ K^{b-1o}$ regulatorischen T-Zellen

Zum Wirkmechanismus regulatorischer T-Zellen werden verschiedene Modelle diskutiert. Zum einen wurde der Veto-Effekt postuliert: die regulatorische T-Zelle eliminiert die Zielzelle aufgrund einer Wechselwirkung ihres MHC-Moleküls mit dem CD8-Moleküle auf der (zytotoxischen) T-Zielzelle. Dabei wird ein Signal übermittelt, sofern im Gegenzug bei der Wechselwirkung die Zielzelle ihrerseits durch Erkennung eines MHC:Peptid-Komplexes auf der regulatorischen, also der Veto-Zelle aktiviert wurde [160, 161].

Es werden noch zwei weitere Effekte für die Induktion peripherer Toleranz verantwortlich gemacht, die sog. *linked suppression* und die infektiöse Toleranz. Beide Phänomene stehen in engem Zusammenhang zueinander und wurden für $CD4^+$ regulatorische T-Zellen beschrieben: *linked suppression* stellt sich ein bei Mäusen, die sich z.B. durch Verwendung eines nicht-depletierenden $CD4$ Antikörpers tolerant gegenüber einem Transplantat verhalten. Die Mäuse akzeptieren ein erneutes Transplantat der gleichen Spezifität, stoßen aber ein Transplantat einer anderen Spezifität ab, die Toleranz ist also antigenabhängig. Jedoch werden bestimmte Transplantate eines parentalen Spenders akzeptiert, sofern das Antigen von der gleichen Antigen-präsentierenden Zelle präsentiert wird, wie das tolerierte Antigen der F1-Generation zweier Spenderstämme.

Diese *linked suppression* einer Abstoßung kann beim Original-Tier beobachtet werden, oder aber bei Tieren, denen aufgereinigte $CD4^+$ T-Zellen des Original-Tieres übertragen wurden. Dabei wird die Toleranz nicht nur von den Spenderzellen übertragen, vielmehr erwerben auch die naiven T-Zellen des Empfängertieres diese Fähigkeiten, sie sind also von der Toleranz infiziert worden [162].

Die molekularen Mechanismen, die hinter den genannten Phänomenen stehen, sind noch unbekannt. Diskutiert werden für den Veto-Effekt das Fas/FasL-System oder TGF- β [163, 164].

Welches der genannten Phänomene dem regulatorischen Effekt der Des x K^{b-lo} transgenen T-Zellen zugrunde liegt, konnte mit dem Ansatz der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Sebastian Schwarte konnte jedoch im Zuge seines Ansatzes nachweisen, daß es sich nicht um den Veto-Effekt handelt.

Die Zielzelle, im Falle unseres *Graft-versus-Host*-Modells die Des-TZR⁺CD8⁺ T-Zelle, wird aufgrund der Wechselwirkung mit der Veto-Zelle eliminiert, jedoch konnten Des-TZR⁺CD8⁺ T-Zellen auch 14 Tage nach der Induktion der *Graft-versus-Host*-Reaktion trotz Koinjektion von Des x K^{b-lo} transgenen Zellen nachgewiesen werden.

Wendet man hingegen das Phänomen der infektiösen Toleranz auf unser Modell an, so entsprächen Des x K^{b-lo} transgene T-Zellen aufgrund ihres Entwicklungsweges im Thymus den T-Zellen eines Original-Tieres, die durch *linked suppression* Toleranz gegenüber dem Transplantat entwickelt haben. Werden diese T-Zellen nun zusammen mit Des-TZR transgenen T-Zellen in einen K^b -positiven Empfänger übertragen, übertragen sie ihre Toleranz auf die Des-TZR transgenen Zellen und eine *Graft-versus-Host*-Reaktion bliebe aus. Betrachtet man die beiden T-Zellpopulationen Des x K^{b-lo} transgener Tiere dabei noch getrennt, würde dies bedeuten, daß die toleranten DN Des-TZR transgenen T-Zellen ihre Toleranz auf die autoreaktiven Des-TZR^{lo}CD8^{lo} übertragen haben und beide Populationen zusammen wiederum im *Graft-versus-Host*-Modell auf die reaktiven Des-TZR transgenen Zellen.

Für diese Theorie spricht auch, daß sich die beiden Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellpopulationen, sieht man von der Expression des Des-TZR und des CD8-Korezeptors einmal ab, in keinem weiteren der untersuchten Marker unterscheiden. Funktionelle Unterschiede konnten innerhalb dieser Arbeit nicht ermittelt werden, da aufgrund der Ähnlichkeit die beiden Populationen nicht getrennt werden konnten. Eine Trennung über den CD8-Korezeptor hätte die Aktivierung der einen Population zur Folge gehabt, ein Vergleich wäre dann hinfällig geworden. Ob und wie sich die Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellpopulationen voneinander unterscheiden, müßte in nachfolgenden Versuchen, z.B. auf Gen-Ebene geklärt werden.

Diese Versuche könnten dann auch Aufschluß geben über die Theorie zur infektiösen Toleranz zwischen den beiden Des-TZR x K^{b-lo} transgenen T-Zellpopulationen und gegenüber Des-TZR transgenen T-Zellen im *Graft-versus-Host*-Modell. Auch könnten weitere Versuche Aufschluß geben über den molekularen Mechanismus insgesamt hinter der infektiösen Toleranz. Dieser ist bei Abschluß der vorliegenden Arbeit noch ungeklärt, wobei die erhöhte $IFN\gamma$ -Produktion der Des x K^{b-lo} transgenen T-Zellen eine Rolle spielen könnte, so daß eine Vermittlung des regulatorischen Effektes über Zytokine möglich wäre.

1. Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C., *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. Nature, 1987. **329**(6139): 506-12.
2. Townsend, A.R., Gotch, F.M., Davey, J., *Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein*. Cell, 1985. **42**(2): 457-67.
3. Schonrich, G., Alferink, J., Klevenz, A., Kublbeck, G., Auphan, N., Schmitt-Verhulst, A.M., Hammerling, G.J., Arnold, B., *Tolerance induction as a multi-step process*. European Journal of Immunology, 1994. **24**(2): 285-93.
4. Robey, E, Fowlkes, B.J., *Selective events in T cell development*. Annual Reviews of Immunology, 1994. **12**: 675-705.
5. Benoist, C., Mathis, D., *T-Lymphocyte differentiation and biology*. Fundamental Immunology. 4th ed. 1999, Philadelphia: Lippincott-Raven. 367-409
6. Janeway, C.A., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th ed. 2001, New York: Garland Publishing. 260-72.
7. Bendelac, A., Matzinger, P., Seder, R.A., Paul, W.E., Schwartz, R.H., *Activation events during thymic selection*. Journal of Experimental Medicine, 1992. **175**(3): 731-42.
8. Nossal, G.J., *Negative selection of lymphocytes*. Cell, 1994. **76**(2): 229-39.
9. Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., Carbone, F.R., *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. Cell, 1994. **76**(1): 17-27.
10. Ashton-Rickardt, P.G., Bandeira, A, Delaney, J.R., Van Kaer, L., Pircher, H.P., Zinkernagel, R.M., Tonegawa, S., *Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus*. Cell, 1994. **76**(4): 651-63.
11. Romermann, D., Heath, W.R., Allison, J., Bayer, B., Sorge, Y., Miller, J.F., Hoffmann, MW., *Density determines the efficiency of negative selection in the thymus*. Transplantation, 2001. **72**(2): 305-11.
12. Baldwin, K.K., Trenchak, B.P., Altman, J.D., Davis, M.M., *Negative selection of T cells occurs throughout thymic development*. Journal of Immunology, 1999. **163**(2): 689-98.
13. Brandle, D., Muller, S., Muller, C., Hengartner, H., Pircher, H., *Regulation of RAG-1 and CD69 expression in the thymus during positive and negative selection*. European Journal of Immunology, 1994. **24**(1): 145-51

14. Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T., Nakayama, T., *CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection*. International Immunology, 1993. **5**(9): 1139-50.
15. Swat, W., Dessing, M., von Boehmer, H., Kisielow, P., *CD69 expression during selection and maturation of CD4⁺8⁺ thymocytes*. European Journal of Immunology, 1993. **23**(3): 739-46.
16. Hare, K.J., Jenkinson, E.J., Anderson, G., *CD69 expression discriminates MHC-dependent and -independent stages of thymocyte positive selection*. Journal of Immunology, 1999. **162**(7): 3978-83.
17. Merckenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R., Fisher, A.G., *How many thymocytes audition for selection?* Journal of Experimental Medicine, 1997. **186**(7): 1149-58.
18. Dummer, W., Ernst, B., LeRoy, E., Lee, D., Surh, C., *Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment*. Journal of Immunology, 2001. **166**(4): 2460-8.
19. Van Parijs, L., Abbas, A.K., *Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off*. Science, 1998. **280**(5361): 243-8.
20. Berzins, S.P., Godfrey, D.I., Miller, J.F., Boyd, R.L., *A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 1999. **96**(17): 9787-91.
21. Kieper, W.C., Jameson, S.C., *Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 1999. **96**(23): 13306-13311.
22. Surh, C.D., Sprent, J., *Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands?* Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(4): F9-F14.
23. Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., Surh, C.D., *The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery*. Immunity, 1999. **11**(2): 173-81.
24. Goldrath, A.W., Bevan, M.J., *Low-Affinity Ligands for the TCR Drive Proliferation of Mature CD8⁺ T Cells in Lymphopenic Hosts*. Immunity, 1999. **11** (2): 183-190.
25. Murali-Krishna, A.K.R., *Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells*. Journal of Immunology, 2000. **165**(4): 1733-7.

26. Cho, B.K., R.V., Quing, G., Eisen, H.N., Jianzhu, C., *Homeostasis-stimulated Proliferation Drives Naive T Cells to Differentiate Directly into Memory T Cells*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(4): 549-556.
27. Goldrath, A.W., Bogatzki, L.Y., Bevan, M.J., *Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(4): 557-64.
28. Oehen, S., Brduscha-Riem, K., *Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies?* European Journal of Immunology, 1999. **29**(2): 608-14.
29. Oehen, S., Brduscha-Riem, K., *Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division*. Journal of Immunology, 1998. **161**(10): 5338-46.
30. Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., Marrack, P., *Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines*. Science, 2000. **288**(5466): 675-8.
31. Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., Ma, A., *IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation*. Immunity, 1998. **9**(5): 669-76.
32. Badovinac, V.P., Tvinnereim, A.R., Harty, J.T., *Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma*. Science, 2000. **290**(5495): 1354-8.
33. Refaeli, Y., Van Parijs, L., Alexander, S.I., Abbas, A.K., *Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes*. Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(7): 999-1005.
34. Taams, L.S., van Rensen, A.J., Poelen, M.C., van Els, C.A., Besseling, A.C., Wagenaar, J.P., van Eden, W., Wauben, M.H., *Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell*. European Journal of Immunology, 1998. **28**(9): 2902-12.
35. Schwartz, R.H., *Models of T cell anergy: Is there a Common Molecular Mechanism?* Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(1): 1-8.
36. Zhang, L., Martin, D.R., Fung-Leung, W.P., The, H.S., Miller, R.G. *Peripheral deletion of mature CD8⁺ antigen-specific T cells after in vivo exposure to male antigen*. Journal of Immunology, 1992. **148**(12): 3740-5.
37. Carlow, D.A., The, S.J., van Oers N.S., Miller, R.G., The, H.S., *Peripheral tolerance through clonal deletion of mature CD4-CD8⁺ T cells*. International Immunology, 1992. **4**(5): 599-610.

38. Kurts, C., Sutherland, R.M., Davey, G., Li, M., Lew, A.M., Blanas, E., Carbone, F.R., Miller, J.F., Heath, W.R., *CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 1999. **96**(22): 12703-7.
39. Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hammerling, G.J., Arnold, B., *Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction*. Cell, 1991. **65**(2): 293-304.
40. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell, 2000. **101**(5): 455-8.
41. Sakaguchi, S., *Policing the regulators*. Nature Immunology, 2001. **2**(4): 283-4.
42. Roncarolo, M.G., Levings, M.K., *The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity*. Current Opinion in Immunology, 2000. **12**(6): 676-83.
43. Shevach, E.M., *Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells*. Journal of Experimental Medicine, 2001. **193**(11): F41-6.
44. Bluestone, J.A., Abbas A.K., *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(3): 253-7.
45. Takahashi T., Sakaguchi S., *The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance*. International Review of Cytology, 2003. **225**: 1-32.
46. McHugh R.S., Shevach E.M., *The role of suppressor T cells in regulation of immune responses*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2002. **110**(5): 693-702.
47. Zhang, Z.X., Young K., Zhang L., *CD3⁺CD4⁻CD8⁻ alphabeta⁻TCR⁺ T cell as immune regulatory cell*. Journal of Molecular Medicine, 2001. **79**(8): 419-27.
48. Bendelac A., Rivera M.N., Park S.H., Roark J.H., *Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function*. Annual Reviews of Immunology, 1997. **15**: 535-62.
49. Lantz O., Bendelac A., *An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4⁻ T cells in mice and humans*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**(3):1097-106.

-
50. Bendelac A., Lantz O., Quimby M.E., Yewdell J.W., Bennink J.R., Brutkiewicz R.R. *CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes*. *Science*, 1995. **268**(5212): 863-5.
 51. Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S.H., Beavis A., Koezuka Y., Bendelac A., *Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells*. *Journal of Immunology*, 1999. **163**(9): 4647-50.
 52. Chen H., Paul W.E., *Cultured NK1.1⁺ CD4⁺ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1*. *Journal of Immunology*, 1997. **159**(5): 2240-9.
 53. Yang Y., Wilson J.M., *Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4⁺ CTLs in vivo*. *Journal of Immunology*, 1995. **155**(5): 2564-70.
 54. Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Sato H., Kondo E., Harada M., Koseki H., Nakayama T., Tanaka Y., Taniguchi M., *Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1998. **95**(10): 5690-3.
 55. Takeda K., Dennert G., *The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms*. *Journal of Experimental Medicine*, 1993. **177**(1): 155-64.
 56. Mieza M.A., Itoh T., Cui J.Q., Makino Y., Kawano T., Tsuchida K., Koike T., Shirai T., Yagita H., Matsuzawa A., Koseki H., Taniguchi M., *Selective reduction of V α 14⁺ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice*. *Journal of Immunology*, 1996. **156**(10): 4035-40.
 57. MacDonald H.R., *NK1.1⁺ T cell receptor- α / β ⁺ cells: new clues to their origin, specificity, and function*. *Journal of Experimental Medicine*, 1995. **182**(3): 633-8.
 58. Vicari A.P., Zlotnik A., *Mouse NK1.1⁺ T cells: a new family of T cells*. *Immunology Today*, 1996. **17**(2): 71-6.
 59. Watanabe H., Miyaji C., Kawachi Y., Iiai T., Ohtsuka K., Iwanaga T., Takahashi-Iwanaga H., Abo T., *Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1⁺ T cells in various immune organs. NK1.1⁺ T cells are present within a population of intermediate TCR cells*. *Journal of Immunology*, 1995. **155**(6): 2972-83.

60. Moodycliffe A.M., Maiti S., Ullrich S.E., *Splenic NK1.1-negative, TCR alpha beta intermediate CD4⁺ T cells exist in naive NK1.1 allelic positive and negative mice, with the capacity to rapidly secrete large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon primary TCR stimulation.* Journal of Immunology, 1999. **162**(9): 5156-63.
61. Shinohara K., Ikarashi Y., Maruoka H., Miyata M., Sugimura T., Terada M., Wakasugi H., *Functional and phenotypical characteristics of hepatic NK-like T cells in NK1.1-positive and -negative mouse strains.* European Journal of Immunology, 1999. **29**(6): 1871-8.
62. Hammond K.J., Pelikan S.B., Crowe N.Y., Randle-Barrett E., Nakayama T., Taniguchi M., Smyth M.J., van Driel I.R., Scollay R., Baxter A.G., Godfrey D.I., *NKT cells are phenotypically and functionally diverse.* European Journal of Immunology, 1999. **29**(11): 3768-81.
63. Emoto M., Zerrahn J., Miyamoto M., Perarnau B., Kaufmann S.H., *Phenotypic characterization of CD8(+)/NKT cells.* European Journal of Immunology, 2000. **30**(8): 2300-11.
64. Park S.H., Benlagha K., Lee D., Balish E., Bendelac A., *Unaltered phenotype, tissue distribution and function of Valpha14(+) NKT cells in germ-free mice.* European Journal of Immunology, 2000. **30**(2): 620-5.
65. Takayama E., Seki S., Ohkawa T., Ami K., Habu Y., Yamaguchi T., Tadakuma T., Hiraide H., *Mouse CD8⁺ CD122⁺ T cells with intermediate TCR increasing with age provide a source of early IFN-gamma production.* Journal of Immunology, 2000. **164**(11): 5652-8.
66. Osman Y., Watanabe T., Kawachi Y., Sato K., Ohtsuka K., Watanabe H., Hashimoto S., Moriyama Y., Shibata A., Abo T., *Intermediate TCR cells with self-reactive clones are effector cells which induce syngeneic graft-versus-host disease in mice.* Cell Immunology, 1995. **166**(2): 172-86.
67. Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.* Cell, 1993. **75**(2): 263-74.
68. Buer J., Lanoue A., Franzke A., Garcia C., von Boehmer H., Sarukhan A., *Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo.* Journal of Experimental Medicine, 1998. **187**(2): 177-83.
69. Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., Roncarolo M.G., *A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.* Nature, 1997. **389**(6652): 737-42.

-
70. Berg D.J., Davidson N., Kuhn R., Muller W., Menon S., Holland G., Thompson-Snipes L., Leach M.W., Rennick D., *Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(4): 1010-20.
 71. Schreiber S., Heinig T., Thiele H.G., Raedler A., *Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): 1434-44.
 72. Asseman C., Fowler S., Powrie F., *Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000. **162**(4 Pt 2): S185-9.
 73. Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie F., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **190**(7): 995-1004.
 74. Hara M., Kingsley C.I., Niimi M., Read S., Turvey S.E., Bushell A.R., Morris P.J., Powrie F., Wood K.J., *IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo*. Journal of Immunology, 2001. **166**(6): 3789-96.
 75. Seewaldt S., Alferink J., Forster I., *Interleukin-10 is crucial for maintenance but not for developmental induction of peripheral T cell tolerance*. European Journal of Immunology, 2002. **32**(12): 3607-16.
 76. Annacker O., Asseman C., Read S., Powrie F., *Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis*. Journal of Autoimmunity, 2003. **20**(4): 277-9.
 77. de Waal Malefyt R., Yssel H., de Vries J.E., *Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation*. Journal of Immunology, 1993. **150**(11): 4754-65.
 78. Levings, M.K., Bacchetta, R., Schulz, U., Roncarolo, M.G., *The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells*. International Archives of Allergy and Immunology, 2002. **129**(4): 263-76.
 79. Espejo C., Penkowa M., Saez-Torres I., Xaus J., Celada A., Montalban X., Martinez-Caceres E.M., *Treatment with anti-interferon-gamma monoclonal antibodies modifies experimental autoimmune encephalomyelitis in interferon-gamma receptor knockout mice*. Journal of Experimental Neurology, 2001. **172**(2): 460-8.

-
80. Lublin F.D., Knobler R.L., Kalman B., Goldhaber M., Marini J., Perrault M., D'Imperio C., Joseph J., Alkan S.S., Korngold R., *Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis*. Journal of Autoimmunity, 1993. **16**(4): 267-74.
 81. Nakajima C., Uekusa Y., Iwasaki M., Yamaguchi N., Mukai T., Gao P., Tomura M., Ono S., Tsujimura T., Fujiwara H., Hamaoka T., *A role of interferon-gamma (IFN-gamma) in tumor immunity: T cells with the capacity to reject tumor cells are generated but fail to migrate to tumor sites in IFN-gamma-deficient mice*. Cancer Research, 2001. **61**(8): 3399-405.
 82. Chomarat P., Rissoan M.C., Banchereau J., Miossec P., *Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes*. Journal of Experimental Medicine, 1993. **177**(2): 523-7.
 83. Shakhov A.N., Woerly G., Car B.D., Ryffel B., *Interferon-gamma enhances tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting early phase interleukin-10 transcription*. European Cytokine Network, 1996. **7**(4): 741-50.
 84. Donnelly R.P., Freeman S.L., Hayes M.P., *Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes*. Journal of Immunology, 1995. **155**(3): 1420-7.
 85. Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R., Wood, K.J., *CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses*. Journal of Immunology, 2002. **168**(3): 1080-6.
 86. Wood, K.J., Sakaguchi S., *Regulatory T Cells in Transplantation Tolerance*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(3): 199-210.
 87. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., Sakaguchi, S., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nature Immunology, 2002. **3**(2): 135-42.
 88. McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., Byrne, M.C. *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity, 2002. **16**(2): 311-23.
 89. Reich-Zeliger, S., Zhao, Y., Krauthgamer, R., Bachar-Lustig, E., Reisner, Y., *Anti-third party CD8+ CTLs as potent veto cells: coexpression of CD8 and FasL is a prerequisite*. Immunity, 2000. **13**(4): 507-15.
 90. Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B., Zhang, L., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression*. Nature Medicine, 2000. **6**(7): 782-9.

-
91. Bach, J.F., *Regulatory T cells under scrutiny*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(3): 189-98.
 92. Wood, K.J., Luo, S., Akl, A. *Regulatory T cells: potential in organ transplantation*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): S6-8.
 93. Karim, M., Bushell, A.R., Wood, K.J., *Regulatory T cells in transplantation*. Current Opinion in Immunology, 2002. **14**(5): 584-91.
 94. Davies J.D., O'Connor E., Hall D., Krahl T., Trotter J., Sarvetnick N., *CD4+ CD45RB low-density cells from untreated mice prevent acute allograft rejection*. Journal of Immunology, 1999. **163**(10): 5353-7.
 95. Hua C., Boyer C., Buferne M., Schmitt-Verhulst A.M., *Monoclonal antibodies against an H-2Kb-specific cytotoxic T cell clone detect several clone-specific molecules*. Journal of Immunology, 1986. **136**(6): 1937-44.
 96. Sorge, Y., Ostermann P., Klempnauer, J., Hoffmann, M.W., *TCR transgenic regulatory T cells prevent lethal graft-versus-host disease*. Transplantation Proceedings, 2001. **33**(1-2): 90-1.
 97. Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hammerling, G.J., Arnold, B., *Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction*. Cell, 1991, **65**(2): 293-304.
 98. Heath, W.R., Carbone, F.R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S., Miller, J.F., *Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells*. European Journal of Immunology, 1995. **25**(6): 1617-23.
 99. Kubo R.T., Born W., Kappler J.W., Marrack P., Pigeon M., *Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine alpha beta T cell receptors*. Journal of Immunology, 1989. **142**(8): 2736-42.
 100. Patel T., Gores G.J., Kaufmann S.H., *The role of proteases during apoptosis*. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1996. **10**(5): 587-97.
 101. Dialynas D.P., Wilde D.B., Marrack P., Pierres A., Wall K.A., Havran W., Otten G., Loken M.R., Pierres M., Kappler J., *Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity*. Immunology Reviews, 1983. **74**: 29-56.
 102. Ledbetter J.A., Herzenberg L.A., *Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens*. Immunology Reviews, 1979. **47**: 63-90.

-
103. Springer T., Galfre G., Secher D.S., Milstein C., *Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens*. European Journal of Immunology, 1978. **8**(8):539-51.
104. Krop I., de Fougerolles A.R., Hardy R.R., Allison M., Schlissel M.S., Fearon D.T., *Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19*. European Journal of Immunology, 1996. **26**(1): 238-42.
105. Lowenthal J.W., Corthesy P., Tougne C., Lees R., MacDonald H.R., Nabholz M., *High and low affinity IL 2 receptors: analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61*. Journal of Immunology, 1985. **135**(6): 3988-94.
106. Gross J.A., Callas E., Allison J.P., *Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse*. Journal of Immunology, 1992. **149**(2): 380-8.
107. Trowbridge I.S., Lesley J., Schulte R., Hyman R., Trotter J., *Biochemical characterization and cellular distribution of a polymorphic, murine cell-surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues*. Immunogenetics, 1982. **15**(3): 299-312.
108. Shen F.W., Tung J.S., Boyse E.A., *Further definition of the Ly-5 system*. Immunogenetics, 1986. **24**(3): 146-9.
109. Johnson P., Maiti A., Ng D.H.W., *CD45: a family of leucocyte-specific cell surface glycoproteins*. Herzberg LA, Weir DM, Blackwell C (Hrsg.): Weir's Handbook of Experimental Immunology, Vol. 2. Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts, 1997: **62**.1-62.16.
110. Bottomly K., Luqman M., Greenbaum L., Carding S., West J., Pasqualini T., Murphy D.B., *A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce different cytokines*. European Journal of Immunology, 1989. **19**(4): 617-23.
111. Gallatin W.M., Weissman I.L., Butcher E.C., *A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes*. Nature, 1983. **304**(5921): 30-4.
112. Yokoyama W.M., Koning F., Kehn P.J., Pereira G.M., Stingl G., Coligan J.E., Shevach E.M., *Characterization of a cell surface-expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation*. Journal of Immunology, 1988. **141**(2): 369-76.
113. Tanaka T., Tsudo M., Karasuyama H., Kitamura F., Kono T., Hatakeyama M., Taniguchi T., Miyasaka M., *A novel monoclonal antibody against murine IL-2 receptor beta-chain. Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL-4 cells*. Journal of Immunology, 1991. **147**(7): 2222-8.

-
114. Fleming T.J., Fleming M.L., Malek T.R., *Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family.* Journal of Immunology, 1993. **151**(5): 2399-408.
115. Hämmerling, G. J., E. Rüsçh, N. Tada, S. Kimura, U. Hämmerling. *Localization of allodeterminants on H-2K^b antigens determined with monoclonal antibodies and H-2 mutant mice.* Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 1982. **79**(15): 4737-41.
116. Koo G.C., Peppard J.R., *Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody.* Hybridoma and Hybridomics, 1984. **3**(3): 301-3.
117. Dennert, G., Hyman, R., *Functional Thy-1+ cells in cultures of spleen cells from nu/nu mice.* European Journal of Immunology, 1980. **10** (8): 583-9.
118. Takei, F. *Inhibition of mixed lymphocyte response by a rat monoclonal antibody to a novel murine lymphocyte activation antigen (MALA-2).* Journal of Immunology, 1985. **134**(3): 1403-7.
119. Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Madrid, F., *Cell adhesion molecules: selectins and integrins.* Critical Reviews in Immunology, 1999. **19**(5-6): 389-429.
120. Croft, M., Duncan, D.D., Swain, S.L., *Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements.* Journal of Experimental Medicine, 1992. **176**: 1431-1437.
121. Marzio, R., Mauel, J., Betz-Corradin, S.. *CD69 and regulation of the immune function.* Immunopharmacology and Immunotoxicology, 1999. **21**(3): 565-82.
122. Simms, P.E., Ellis, T.M., *Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation.* Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 1996. **3**(3): 301-304.
123. Athanassakis, I., Vassiliadis, S., *T-regulatory cells: are we re-discovering T suppressors?* Immunology Letters, 2002. **84**(3): 179-83.
124. Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R., Lechler, R., *Anergic T cells as suppressor cells in vitro.* Science, 1994. **264**(5165): 1587-9.
125. Koyama, K., *NK1.1+ cell depletion in vivo fails to prevent protection against infection with the murine nematode parasite Trichuris muris.* Parasite Immunology, 2002. **24**: 527-33.

-
126. Dubey, D.P., Husain, Z., Levitan, E., Zurakowski, D., Mirza, N., Younes, S., Coronell, C., Yunis, D., Yunis, E.J., The MHC influences NK and NKT cell functions associated with immune abnormalities and lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2000. **113**(2):117-34.
127. Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T., *The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes*. *Annual Reviews of Immunology*, 1993. **11**: 245-68.
128. Nakamura, K., Kitani, A., Strober, W., 2001. *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β* . *J Journal of Experimental Medicine*, 2001. **194**: 629–644.
129. Sprent, J., Kishimoto, H., *The thymus and central tolerance*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 2001. **356**(1409): 609-16.
130. Goldrath, A.W., Bevan, M.J., *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. *Nature*, 1999. **402**(6759): 255-62.
131. Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C., Vassalli, P., *Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation*. *Journal of Experimental Medicine*, 1991. **173**(2): 471-81.
132. Rocha, B., Vassalli, P., Guy-Grand, D., *The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8⁺ intraepithelial T cell receptor alpha/beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation*. *Journal of Experimental Medicine*, 1991. **173**(2): 483-6.
133. Iiai, T., Watanabe, H., Seki, S., Sugiura, K., Hirokawa, K., Utsuyama, M., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Ohteki, T., Abo, T., *Ontogeny and development of extrathymic T cells in mouse liver*. *Immunology*, 1992. **77**(4): 556-63.
134. Ohtsuka, K., Iiai, T., Watanabe, H., Tanaka, T., Miyasaka, M., Sato, K., Asakura, H., Abo, T., *Similarities and differences between extrathymic T cells residing in mouse liver and intestine*. *Cell Immunology*, 1994. **153**(1): 52-66.
135. Blish, C.A., Dillon, S.R., Farr, A.G., Fink, P.J., *Anergic CD8⁺ T Cells can persist and funktion in vivo*. *Journal of Immunology*, 1999. **163**: 155-164.
136. Maruyama, S., Tsukahara, A., Suzuki, S., Tada, T., Minagawa, M., Watanabe, H., Hatakeyama, K., Abo, T., *Quick recovery in the generation of self-reactive CD4^{low} natural killer (NK) T cells by an alternative intrathymic pathway when restored from acute thymic atrophy*. *Clinical and Experimental Immunology*, 1999. **117**(3): 587-95.

-
137. Kieselow, P., Bluthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., von Boehmer, H., *Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes*. *Nature*, 1988. **333**(6175): 742-6.
138. Takahama, Y., Shores, E.W., Singer, A., *Negative selection of precursor thymocytes before their differentiation into CD4+CD8+ cells*. *Science*, 1992. **258**(5082): 653-6.
139. Hanke, T., Mitnacht, R., Boyd, R., Hunig, T., *Induction of Interleukin 2 Receptor beta Chain Expression by Self-recognition in the Thymus*. *Journal of Experimental Medicine*, 1994. **180**: 1629-36.
140. Jameson, S.C., Hogquist, K.A., Bevan, M.J. *Positive selection of thymocytes*. *Annual Reviews of Immunology*, 1995. **13**: 93-126.
141. Schonrich, G., Strauss, G., Muller, K.P., Dustin, L., Loh, D.Y., Auphan, N., Schmitt-Verhulst, A.M., Arnold, B., Hammerling, G.J., *Distinct requirements of positive and negative selection for selecting cell type and CD8 interaction*. *Journal of Immunology*, 1993. **151**(8): 4098-105.
142. Boehmer, H., Rajewsky, K., *Lymphocyte development*. *Current Opinion in Immunology*, 1993. **5** (2): 175-176.
143. Dunon, D., Courtois, D., Vainio, O., Six, A., Chen, C.H., Cooper, M.D., Dangy, J.P., Imhof, B.A., *Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves*. *Journal of Experimental Medicine*, 1997. **186**(7): 977-88.
144. Jotereau, F., Heuze, F., Salomon-Vie, V., Gascan, H., *Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration*. *Journal of Immunology*, 1987. **138**(4): 1026-30.
145. Morin, C., Jotereau, F., Augustin, A., *Patterns of responsiveness of T cell lines and thymocytes reveal waves of specific activity in the post-natal murine thymus*. *International Immunology*, 1992. **4**(10): 1091-101.
146. Young, K.J., Kay, L.S., Phillips, M.J., Zhang, L., *Antitumor activity mediated by double-negative T cells*. *Cancer Research*, 2003. **63**(22): 8014-21.
147. Young, K.J., Yang, L., Phillips, M.J., Zhang, L., *Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells*. *Blood*, 2002. **100**(9): 3408-14.
148. Strober, S., Cheng, L., Zeng, D., Palathumpat, R., Dejbakhsh-Jones, S., Huie, P., Sibley, R. *Double negative (CD4-CD8- alpha beta+) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity*. *Immunology Reviews*, 1996. **149**: 217-30.

-
149. Shevach, E.M., *Regulatory T Cells in Autoimmunity*, Annual Reviews of Immunology, 2000. **18**: 423-449.
150. Young, K.J., DuTemple, B., Phillips, M.J., Zhang, L., *Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells*. Journal of Immunology, 2003. **171**(1): 134-41.
151. Moroda, T., Iiai, T., Kawachi, Y., Kawamura, T., Hatakeyama, K., Abo, T., *Restricted appearance of self-reactive clones into T cell receptor intermediate cells in neonatally thymectomized mice with autoimmune disease*. European Journal of Immunology, 1996. **26**(12): 3084-91.
152. Takahama, Y., Kosugi, A., Singer, A., *Phenotype, ontogeny, and repertoire of CD4-CD8- T cell receptor alpha beta + thymocytes. Variable influence of self-antigens on T cell receptor V beta usage*. Journal of Immunology, 1991. **146**(4): 1134-41.
153. Caveno, J., Zhang, Y., Motyka, B., The, S.J., The, H.S., *Functional similarity and differences between selection-independent CD4-CD8- alphabeta T cells and positively selected CD8 T cells expressing the same TCR and the induction of anergy in CD4-CD8- alphabeta T cells in antigen-expressing mice*. Journal of Immunology, 1999. **163**(3):1222-9.
154. Budd, R.C., Mixter, P.F., *The origin of CD4-CD8-TCR alpha beta+ thymocytes: a model based on T-cell receptor avidity*. Immunology Today, 1995. **16**(9): 428-31.
155. Mixter, P.F., Russell, J.Q., Morrissette, G.J., Charland, C., Aleman-Hoey, D., Budd, R.C., *A model for the origin of TCR-alphabeta+ CD4-CD8- B220+ cells based on high affinity TCR signals*. Journal of Immunology, 1999. **162**(10):5747-56.
156. Budd, R.C., Mixter, P.F., *The origin of CD4-CD8-TCR-alphabeta+ thymocytes: a model based on T-cell receptor avidity*. Immunology Today, 1995. **19**(9): 428-431.
157. Park, J.-H., Mitnacht, R., Torres-Nagel, N., Hünig, T. *T Cell Receptor Ligation induces Interleukin (IL) 2R β Chain expression in Rat CD4,8 Double Positive Thymocytes, Initiating an IL-2-dependent Differentiation Pathway of CD8 α^+ β^- T cells*. Journal of Experimental Medicine, 1993. **177**: 541-546
158. Hammond, K., Cain, W., van Driel, I., Godfrey, D., *Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1⁺ T cells*. International Immunology, 1998. **10** (10): 1491-1499.

-
159. Moroda, T., Imai, T., Kawachi, Y., Kawamura, T., Hatakeyama, K., Abo T., *Restricted appearance of self-reactive clones into T cell receptor intermediate cells in neonatally thymectomized mice with autoimmune disease*. European Journal of Immunology, 1996. **26**(12): 3084-91.
160. Sprent, J., Miller, J.F., Mitchell, G.F., *Antigen-induced selective recruitment of circulating lymphocytes* Cell Immunology, 1971. **2**(2): 171-81.
161. Sambhara, S.R., Miller, R.G., *Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the alpha 3 domain of class I MHC*. Science, 1991. **252**(5011): 1424-7.
162. Waldmann, H., Cobbold, S., *Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells?* Immunity, 2001. **14**(4): 399-406.
163. George, J.F., Thomas, J.M., *The molecular mechanisms of veto mediated regulation of alloresponsiveness*. Journal of Molecular Medicine, 1999. **77**(7): 519-26.
164. Asiedu, C., Meng, Y., Wang, W., Huang, Z., Contreras, J.L., George, J.F., Thomas, J.M., *Immunoregulatory role of CD8alpha in the veto effect*. Transplantation, 1999. **67**(3):372-80.

Zur Person

Yanina Sorge
Geboren am 4. September 1973
in Uelzen

Schulbildung

1979-1983	Grundschule Hämelerwald
1983-1985	Orientierungsstufe Lehrte-Ost
1985-1992	Gymnasium am Silberkamp, Peine

Abschluß: Abitur

Studium

1992-1998	Studium der Biologie an der Universität Hannover
Sommer 1994	Diplomvorprüfung Im Hauptstudium Schwerpunkte Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Immunologie
Februar 1997	Diplomprüfung
1997-1998	Diplomarbeit unter Anleitung von PD Dr. Emmendorffer am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Abteilung Immunbiologie Thema: Etablierung des MCMV-Infektionsmodells in der BALB/c-Maus
1998-2002	Anfertigung der Dissertation unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Matthias W. Hoffmann an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Transplantationslabor

Hilfswissenschaftliche Aktivitäten während des Studiums

Während des Studiums Assistenz bei Herrn Prof. Diekmann, Herrn Prof. Herzfeld und Herrn PD Dr. Emmendorffer als Hilfswissenschaftler bei der Ausbildung der nachfolgenden Studentengeneration.

Wissenschaftliche Aktivitäten während der Anfertigung der Dissertation

Sorge, Y., Ostermann, P., Bayer, B., Hoffmann, M.W., *Mechanisms of regulatory T cell function in a TCR transgenic mouse model*; Vortrag anlässlich der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Köln, 1.-4. März 2000.

Hoffmann, M.W., Ostermann, P., Sorge, Y., Bayer, B., Römermann, D, *Prevention of graft-versus-host-disease by regulatory T cells in vivo*; Vortrag anlässlich des Thymoz III Workshops „An International Workshop on T Lymphocytes“ auf Heron Island, Australien, 11.-16. April 2000.

Sorge, Y., Ostermann, P., Bayer, B., Hoffmann, M.W., *Low avidity T cells: protection from graft-versus-host disease by NKT-like T cells*; Posterpräsentation anlässlich des John Humphrey International Course of immunology on Self-Tolerance and Self-Recognition in Sinaia, Rumänien, 15.-19. Mai 2000.

Sorge, Y., Ostermann, P., Bayer, B., Klempnauer, J., Hoffmann, M.W., *Kontrolle der letalen Graft-versus-Host-Erkrankung durch NKT-ähnliche T-Zellen*; Vortrag anlässlich des 11. Workshops für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie in Wilsede, 29. Juni-1. Juli 2000.

Hoffmann, M.W., Sorge, Y., Ostermann, P., Bayer, B., Klempnauer, J., *TCR transgenic regulatory T cells prevent lethal graft-versus-host disease*; Vortrag anlässlich des XVIII. International Congress of the Transplantation Society in Rom, 27. August-1. September 2000.

Sorge, Y., Bayer, B., Schwarte, S., Hoffmann, MW, *Studies into the development of regulatory T cells in the Thymus*; Posterpräsentation anlässlich der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Dresden, 26.-29. September 2001

Sorge, Y., Bayer, B., Schwarte S., Hoffmann, M.W., *Studies into the development of regulatory T cells in the Thymus*; Posterpräsentation anlässlich der EuroConference on Molecular Aspects of the Initiation and Regulation of the Immune Responses in San Feliu de Guixols, Spanien, 13.-18. Oktober 2001

Sorge, Y., Hoffmann, M.W., *Ontogenese und funktionelle Charakterisierung von „memory phenotype“ T-Zellen in einem transgenen Mausmodell*; Vortrag anlässlich des Kolloquiums des SFB 265 in Hannover 6. Februar 2002.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen während der Anfertigung der Dissertation

Sorge, Y., Ostermann P., Klempnauer, J., Hoffmann, M.W., *TCR transgenic regulatory T cells prevent lethal graft-versus-host disease*. Transplant Proceedings, 2001. **33**(1-2): 90-1.

Romermann, D., Heath, W.R., Allison, J., Bayer, B., Sorge, Y., Miller, J.F., Hoffmann, M.W., *Density determines the efficiency of negative selection in the thymus*. Transplantation, 2001. **72**(2): 305-11.

Sorge Y., Ostermann, Bayer B., Klempnauer J., Hoffmann M.W., *Kontrolle der lethalen Graft-versus-Host-Erkrankung durch NKT-ähnliche T-Zellen*. Zeitung für Gastroenterologie, 2000. **38**: 532 (Abstract).

Weitere wissenschaftliche Aktivitäten während der Anfertigung der Dissertation

Jäger, M.D., Battmer, K., Deiwick, A., Sorge, Y., Klempnauer, J., Schlitt, H.J., Ganser, A., Scherr, M., *Transduction of murine hematopoietic stem cells by improved lentiviral vector leads to high level transgene expression in non-myeloablative BMT protocols*. Posterpräsentation anlässlich des internationalen Symposiums on the clinical Use of Cellular Products in Regensburg, 29.-30. März 2001.

Jäger, M.D., Sorge, Y., Battmer, K., Deiwick, A., Klempnauer, J., Schlitt, H.J., Ganser, A., Scherr, M., *High level transgene expression achieved by transduction of murine bone marrow cells by improved lentiviral vector and non-myeloablative BMT*; Posterpräsentation anlässlich des Kongresses der European Hematology Association in Frankfurt/Main, 21.-24. Juni 2001.

Jäger, M.D., Battmer, K., Deiwick, A., Sorge, Y., Klempnauer, J., Schlitt, H.J., Ganser, A., Scherr, M., *High level transgene expression achieved by transduction of murine bone marrow cells by improved lentiviral vector and non-myeloablative BMT*; Posterpräsentation anlässlich des Kongresses der European Society for Organ Transplantation in Lissabon, Portugal, 6.-11. Oktober 2001.

Beruflicher Werdegang

Seit Juni 2002

Tätig für die Firma IQ Products, Groningen, die Niederlande, als Technical Specialist mit einjährigem Aufenthalt in Groningen von Juni 2002 bis Juni 2003.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Hoffmann für die Überlassung des Themas und seine hervorragende Betreuung.

Für die herzliche Atmosphäre im Labor und ihre Hilfsbereitschaft danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Transplantationslabors, insbesondere Frau Bettina Heid und Herrn Dr. Sebastian Schwarte sowie Frau Christa Ziegowski vom Zentralen Tierlabor, die verantwortlich war für die exzellente Betreuung der Tierzucht.

Herrn Prof. Klemnauer, Direktor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie, und Herrn Prof. Wonigeit, Leiter des Transplantationslabors, danke ich für die Möglichkeit, in ihrer Abteilung unter hervorragenden Bedingungen arbeiten zu dürfen.

Herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie, meinen Freunden und bei meinen Kollegen von IQ Corporation bedanken, ich war mir immer ihrer vollen Unterstützung sicher. Besonders die liebevoll gestellte Frage „Und - was macht die Doktorarbeit?“ (zumeist der Frage „Wie geht es Dir?“ vorangestellt oder sie ganz ersetzend) half mir, mein Ziel immer vor Augen zu haben.

Erklärung

Ich erkläre, daß ich die Dissertation mit dem Titel

Ontogenese und funktionelle Charakterisierung immunregulatorischer T-Zellen in einem transgenen Mausmodell

in der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Herrn Prof. Matthias W. Hoffmann und mit der Unterstützung von Frau Bettina Heid ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, daß ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Teilergebnisse der Dissertation wurden veröffentlicht bei:

Transplant Proceedings, 2001. 33(1-2): 90-1.

TCR transgenic regulatory T cells prevent lethal graft-versus-host disease.

Sorge, Y., Ostermann P., Klempnauer, J., Hoffmann, M.W.

Hannover, den.....

.....

(Yanina Sorge)

