

**Funktionelle Analyse und Regulation des
Zinkfingerproteins Gfi1 bei Lymphozyten anhand
gentechnisch veränderter Mäuse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Raif Yücel

aus Kirsehir/Türkei

Juli 2004

Die der nachfolgenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Tarik Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Esche

3. Gutachter: Prof. Dr. Cornelia Hardt

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Angela Sandmann

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Dezember 2004

Sevgili Kizim

Enbiyâ'ya

Meiner lieben Tochter

Enbiyâ

Auszüge der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Fachartikeln veröffentlicht bzw. werden zur Veröffentlichung vorbereitet:

Yücel, R, Karsunky, H, Klein-Hitpass, L und Möröy, T (2003)

The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus.

J Exp Med 197:831-44.

Yücel, R, Kosan, C, Heyd, F und Möröy, T (2004)

Gfi1:GFP knock-in mutant reveals differential expression and auto-regulation of the gene *Growth factor independence 1 (Gfi1)* during lymphocyte development

J Biol Chem, in Druck

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
1.1 Hämatopoese im Knochenmark	3
1.2 B-Zelldifferenzierung im Knochenmark	5
1.3 T-Lymphozyten	7
1.3.1 Thymus als Ort der T-Zellreifung	8
1.3.2 Stadien der T-Zelldifferenzierung im Thymus	9
1.3.3 Prä-Thymozyten Differenzierungsschritte	10
1.3.4 TCR-abhängige Differenzierung	14
1.3.5 Regulation der Thymozyten-Entwicklung	17
1.3.6 Periphere T-Zelldifferenzierung	20
1.4 Der Transkriptionsfaktor Gfi1	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	28
2.1.2 Häufig verwendete Lösungen	28
2.1.3 Verwendete DNA-Sonden	31
2.1.4 Verwendete Oligodesoxynukleotide	31
2.1.5 Verwendete Antikörper	32
2.2 Organismen	34
2.2.1 Verwendeter Bakterienstamm	34
2.2.2 Mäusestämme	34
2.3 Bakterien-Kultur	34
2.3.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	34
2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien	35
2.4 Molekularbiologische Methoden	35
2.4.1 Rechnergestützte Sequenzanalyse	35

2.4.2	DNA-/RNA-Technik	36
2.4.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung	36
2.4.2.2	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA („Maxipräp“)	36
2.4.2.3	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“)	36
2.4.2.4	Isolierung von genomischer DNA	37
2.4.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.4.2.6	Restriktionsendonukleaseverdau	37
2.4.2.7	Konversion überhängender DNA-Enden	38
2.4.2.8	Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA	38
2.4.2.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	38
2.4.2.10	Ligation	38
2.4.2.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.4.2.12	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	39
2.4.2.13	Transfer von DNA (Southern-Blot)	39
2.4.2.14	Isolierung von RNA	40
2.4.2.15	Reverse Transkription	40
2.4.2.16	Auftrennung von RNA	40
2.4.2.17	Northern-Analyse	41
2.4.2.18	Chromatin Immunopräzipitation	42
2.4.3	Protein-Techniken	43
2.4.3.1	Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten	43
2.4.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
2.4.3.3	Auftrennung von Proteinen (SDS-Page)	43
2.4.3.4	Protein-Transfer (Western-Blot)	44
2.4.3.5	Immunologischer Nachweis	45
2.5	Zellkultur-Techniken	46
2.5.1	Medien/Lösungen und mitogene Substanzen	46
2.5.2	ES-Zellkultur	47
2.5.2.1	Transfektion und Selektion von ES-Zellen	47
2.5.2.2	Herstellung von embryonalen von Mausfibroblasten (MEF)	48
2.5.3	Passagieren von Zellen	48
2.5.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	48

2.5.5	Isolation von T- und B-Lymphozyten aus Organen	49
2.5.5.1	Herstellen einer Einzelzellsuspension	49
2.5.5.2	Erythrozytenlyse	49
2.5.5.3	Aufreinigung von Zellen durch MACS	49
2.5.6	Kultivierung von murinen Lymphozyten	50
2.6	Zytometrie	51
2.6.1	Durchflußzytometrie	51
2.6.1.1	Darstellung von Oberflächenmarkern	51
2.6.1.2	Intrazelluläre FACS-Analyse	52
2.6.1.3	Detektion apoptotischer Zellen über Annexin V	52
2.6.1.4	Bestimmung der DNA-Syntheserate	52
2.6.2	Immunofluoreszenz	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Untersuchung der Gfi1 Expression während Lymphozyten- Entwicklung anhand der Gfi1:GFP knock-in Maus	54
3.1.1	Generierung einer Gfi1 defizienten Mausmutante durch „knock-in“ eines Reportergens	54
3.1.2	Klonierung des Gfi1:GFP Rekombinationsvektors	54
3.1.3	Generierung von Gfi1:GFP heterozygoten embryonalen Stammzellen (ES)	56
3.1.4	Southern-Analyse der rekombinierten ES-Zellen und der knock-in Mäuse	57
3.1.5	Generierung der Gfi1:GFP knock-in Mausmutante	57
3.1.6	Nachweis der Gfi1:GFP knock-in Funktionalität	58
3.1.7	Gfi1 Expression nimmt während der B-Zellentwicklung ab	61
3.1.8	Gfi1 ist in aktivierten T-Lymphozyten hochreguliert und in differentieller Expressionshöhe in den Gedächtnis T-Zellen	63
3.1.9	Gfi1 wird während der b -Selektion und der CD4/CD8-Liniendeterminierung hochreguliert	65

3.2	Untersuchung der Gfi1 Autoregulation mittels Gfi1:GFP knock-in Maus	69
3.2.1	Gfi1 Autoregulation während der Thymozyten-Entwicklung	69
3.2.2	Gfi1 bindet direkt an den Gfi1 Promotor in Thymozyten	72
3.3	Funktionelle Charakterisierung der Thymozyten-Entwicklung in Gfi1 defizienten Tieren	75
3.3.1	Gfi1-Verlust wirkt sich negativ auf die CD4 SP Thymozyten-Entwicklung und beschleunigt die MHC I restringierte Positive Selektion der CD8 SP T-Zellen	75
3.3.2	Mangel an Gfi1 führt zur Apoptose bei proliferierenden DN/c-Kit ⁺ Thymozyten	81
3.3.3	Gfi1-Verlust führt zu Defekten in der frühen T-Zellentwicklung	86
3.3.4	Gfi1-KO Thymus Phänotyp ist assoziiert mit modulierter Expression potentieller Gfi1 Zielgene	91
4	Diskussion	95
4.1	Gfi1:GFP Knock-in Maus zeigt differentielle Expression und die Autoregulation des Gfi1 Genes während der Lymphozyten Entwicklung	95
4.1.1	Expressionsanalyse von Gfi1 und GFP in den Lymphozyten der Knock-in Maus	95
4.1.2	Analyse der GFP Expression in den Gfi1 ^{GFP/GFP} und Ick-Gfi1/Gfi1 ^{GFP/GFP} Mäusen deutet auf eine Gfi1 Autoregulation hin	99
4.2	Funtionelle Charakterisierung der Thymozyten-Entwicklung Anhand der Gfi1-defizienten Tiere	101
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis	109

7	Anhang	122
7.1	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	122
7.2	Lebenslauf	125
7.3	Danksagung	126
7.4	Erklärungen	127

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BrdU	5'-Bromo-2'-Deoxyuridin
CD	internationale Nomenklatur für Oberflächenmarker (cluster of differentiation)
cDNA	Kopie-DNA (copy-DNA)
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute (engl. „counts per minute“)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	"Dulbecco's modified eagles medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DP	doppelt positiv
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("acid")
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ("acid")
Fa	Firma
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	foetales Rinderserum (fetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FTOC	foetale Thymus Organkulturen (fetal thymic organ culture)
h	Stunde (hour)
hi	hoch (high)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
int	mittlere (intermediate)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knock out
lo	niedrig (low)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
F	Mikro-Faraday
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex (major histocompatibility complex)

min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl. „messenger RNA“)
NC	Nitrocellulose
NK	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PI	Propidiumiodid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (“acid“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SP	einzel positiv (single positiv)
SCF	stem cell factor (c-Kit Ligand)
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
TAE	Tris -Acetat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)

1. Einleitung

Das Immunsystem ist für den Organismus von zentraler Bedeutung, da es die Aufgabe hat ihn vor pathogenen Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten, zu schützen. Neben der Abwehr exogener Krankheitserreger ist die zweite Hauptaufgabe des Immunsystems die Erkennung und Zerstörung entarteter körpereigener Zellen (Chen et al., 1993). Dabei besteht seine essentielle Leistung in der Unterscheidung zwischen körpereigenen Strukturen, die toleriert werden, und körperfremden Strukturen, die als gefährlich erkannt werden und eine Immunantwort einleiten. Im Laufe der Evolution hat das Immunsystem dazu zwei bedeutende Zweige entwickelt: die angeborene, unspezifische und die erworbene, spezifische Immunität.

Die phylogenetisch ältere, angeborene Immunabwehr, die auch viele Invertebraten aufweisen, besteht aus humoralen Faktoren, wie die alternative Komplementaktivierung, Zytokinen, Enzymen und den Proteinen der „akuten Phase“ sowie aus zellulären Bestandteilen, zu denen sowohl die neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, als auch die natürlichen Killerzellen zählen. Das Funktionsprinzip beruht auf der Eliminierung von fremden Partikeln, Mikroorganismen und fremden Makromolekülen durch Phagozytose und dem folgenden lysosomalen Abbau mittels Enzymen. Durch die Prozessierung entstehende Fragmente werden auf der Zelloberfläche von sogenannten Antigen präsentierenden Zellen (APC) in einer Form präsentiert, in der sie durch weitere Zellen des Immunsystems erkannt werden können. Die angeborene Immunantwort ist nicht antigenspezifisch und erzeugt kein immunologisches „Gedächtnis“. Sie bildet die erste Verteidigungslinie gegen eine Vielzahl von Erregern. Ihre Reaktion ist schnell, aber unangepasst und verläuft auch bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Erreger immer gleich ab.

Hingegen zeichnet sich das phylogenetisch jüngere, erworbene Immunsystem der höheren Vertebraten durch hohe Spezifität, „Lernfähigkeit“ und ein „Gedächtnis“ aus. Diese spezifische Immunabwehr wird von Zellen der lymphatischen Reihe getragen, den Lymphozyten, und ist für die lebenslange Immunität verantwortlich, die als Folge einer Erkrankung oder einer Impfung entstehen kann. Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: die B-Lymphozyten oder B-Zellen welche den humoralen und die T-Lymphozyten oder T-Zellen, die den zellulären Anteil der erworbenen Immunabwehr darstellen. Während die Vorläufer der T-Lymphozyten aus dem Knochenmark auswandern und im Thymus heran-

reifen, findet die Reifung und Ausdifferenzierung der B-Zellen auch im Knochenmark statt. T- und B-Lymphozyten erkennen Fremdstoffe (sog. Antigene) auf grundlegend unterschiedliche Weise. Beiden gemeinsam ist, dass sie Antigene über spezifische Oberflächenrezeptoren erkennen. Diese werden durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus festgelegt, welcher während der Entwicklung dieser Zellen im Knochenmark und im Thymus abläuft. Im Falle der B-Zellen ist dies ein membrangebundenes Immunglobulin (Antikörper), das auch als sezerniertes Protein Teil des humoralen Systems ist (Reth, 1992). Hingegen erfolgt die Antigenerkennung bei der T-Zelle über den T-Zellrezeptor-Komplex (TCR). Dabei handelt es sich um ein membrangebundenes Polypeptid-Heterodimer (Bentley, 1996), das mit dem CD3-Komplex und einem zytoplasmatisch gerichteten Homodimer assoziiert ist. Die spezifische Bindung eines Antigens an den T-Zellrezeptor ist nur möglich, wenn das Antigen von einer APC prozessiert wurde und von einem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf ihrer Zelloberfläche so präsentiert wird, dass die Antigenbindungsstelle in den variablen Bereich des TCR kommt (Übersicht in Germain, 1994).

Die Spezifität der Antigenrezeptoren beider Zelltypen ist bereits vor dem ersten Antigenkontakt festgelegt (Janeway, 2002). Theoretisch kann für jede antigene Struktur ein passender Rezeptor gebildet werden. Diese Vielfalt wird durch Rekombinationsprozesse während der Reifung der Zellen erreicht. Welche Strukturen körpereigen sind und toleriert werden, und welche als fremd eingestuft werden und deshalb eine Immunantwort auslösen, muss vom adaptiven Immunsystem erst erlernt werden. Die meisten selbstreaktiven T-Zellen werden im Verlauf ihrer Entwicklung im Thymus eliminiert (Boehmer, 1993), bei B-Zellen geschieht dies im Knochenmark. Toleranz-Induktion und -Aufrechterhaltung finden auch in peripheren lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten statt. Bei Bindung eines Antigens kommt es zur klonalen Expansion der Lymphozyten, von denen ein Teil nach Beendigung der Infektion erhalten bleibt, so dass eine dauerhafte Immunität gegeben ist (Janeway, 2002).

1.1 Hämatopoese im Knochenmark

Alle Zellen des Blutes und des Immunsystems entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) (Orkin, 1995; Kondo et al., 2003). Die Hämatopoese beginnt in der embryonalen Ontogenese in Blutinseln des Dottersacks. Später wandern HSC in die Leber, die beim Menschen und anderen Säugetieren im Fötus primär ein blutbildendes Organ ist. Im letzten Drittel der pränatalen Entwicklung kolonisieren HSC das Knochenmark und gewährleisten ein Leben lang die gesamte Blutbildung (Cumano et al., 2001; Tavian et al., 2001).

Hämatopoetische Stammzellen sind definiert als multipotente Zellen, d.h. sie können alle Zelltypen des Blutes und des Immunsystems während der Ontogenese aufbauen und später ständig regenerieren. Sie sind außerordentlich seltene Zellen im Knochenmark mit einem Anteil von 0,05 %, die die Fähigkeit besitzen, sich stetig selbst zu erneuern und somit der Regeneration von Gewebe dienen (Reya et al., 2001, Weissman, 2000). Man kann sie in drei verschiedene Populationen unterteilen: in langlebige HSC (LT-HSC, engl. „long term HSC“), in kurzlebige HSC (ST-HSC, engl. „short term HSC“) und in multipotente Vorläuferzellen, die kein Selbsterneuerungspotential mehr besitzen (Bradford et al., 1997; Reya et al., 2001). In einer kontinuierlichen Folge von irreversiblen Differenzierungsschritten entwickeln sich aus ihnen zunächst Vorläuferzellen mit eingeschränktem Potential. Die einzelnen Populationen lassen sich über die differenzierte Expression von Oberflächenmarkern mittels Durchflußzytometrie darstellen und isolieren. Abbildung 1.1 fasst die verschiedenen Blutzelltypen mit den charakteristischen Oberflächenmarkern und ihre Entwicklungslinien zusammen.

Alle oben erwähnten Populationen der HSC bei der Maus sind gekennzeichnet durch das Expressionsprofil $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{lo}} \text{c-Kit}^+ \text{IL-7Ra}^- \text{Thy-1}^{-/\text{lo}}$ (Akashi et al., 2000a; Kondo et al., 2003). Dabei steht „Lin“ (engl. Lineage) für die Ganzheit von linienspezifischen Markern reifer hämatopoetischer Zellen (CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1, NK-1.1, Ter119, CD19 und IgM). Aus den HSC entstehen nun die beiden liniendeterminierten oligopotenten Vorläuferzellen der lymphatischen (CLP, engl. „common lymphoid progenitor“) und der myeloiden Reihe (CMP, engl. „common myeloid progenitor“) (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000b). Die myeloide Vorläuferzelle ist die Vorstufe der Granulozyten, Makrophagen, Megakaryozyten und der Erythrozyten (Abb. 1.1). Die Population der CLP ist ausschließlich befähigt Pro-T, Pro-B und NK-Zellen auszubilden.

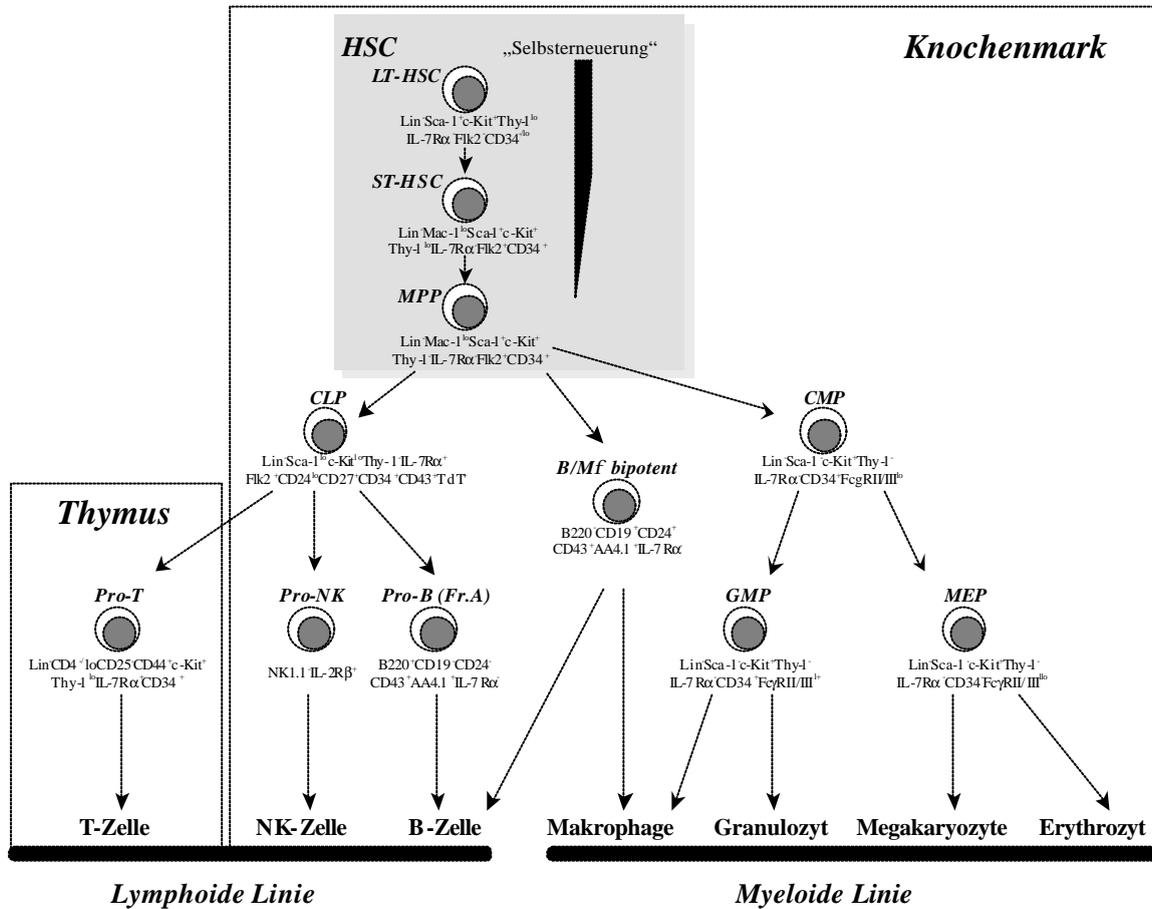


Abbildung 1.1: Der hämatopoetische Stammbaum

Pluripotente LT-HSC entwickeln sich zu ST-HSC und diese wiederum weiter zu multipotenten Vorläuferzellen (MPP, engl. „multipotent progenitor“). Nachfolgend differenzieren sich aus diesen die linienrestringierten Vorläufer CLP, aus denen die B-, T- und NK-Zellen hervorgehen, sowie CMP, aus denen sich sämtliche myeloide Zellen ableiten. Die CMP differenzieren über eine Zwischenstufe der oligopotenten Granulozyten-/Makrophagenvorläuferzellen GMP (engl. „granulocyte/macrophage progenitor“) und Megakaryozyten-/Erythrozytenvorläuferzellen MEP (engl. „megakaryocyte/erythrocyte progenitor“) zu myeloiden Bestandteilen des Blutes. Mit Ausnahme der T-Zellen findet die Differenzierung aller Zelltypen im Knochenmark statt. Angegeben sind ebenfalls die Expressionsprofile der jeweiligen Populationen (Abbildung ist modifiziert in Anlehnung an Kondo et al., 2003).

1.2 B-Zelldifferenzierung im Knochenmark

Die B-Zellentwicklung führt von der naiven Stammzelle zur reifen B-Zelle und schließlich zur Antikörper sezernierenden Plasmazelle oder zur Memoryzelle. Die einzelnen Differenzierungsschritte sind durch die aufeinanderfolgende Expression und Umordnung („Rearrangement“) der Gene für die schweren und leichten Immunglobulinketten, der kontrollierten Expression der Rekombinaseaktivierenden Gene (Rag-1/Rag-2), sowie der Terminalen Transferase während der V(D)J Rearrangement, gekennzeichnet (Opstelten, 1996; Abb. 1.2). Während der B-Zellentwicklung werden außer Immunglobulinen weitere Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert, die als Marker für B-Zellen der jeweiligen Entwicklungsstufe dienen (Hardy et al., 1991). In Abbildung 1.2 ist die Zusammenstellung ihrer Expressionsmuster dargestellt. Verschiedene Arbeitsgruppen entwickelten unterschiedliche Systeme zur Klassifizierung der B-Zellentwicklungsstadien im Knochenmark der Maus.

Hardy et al. (1991) unterteilten die Populationen der B-Zelllinie anhand der differentiellen Expression von Oberflächen-Antigenen in 7 Fraktionen (Fr. A bis Fr. F, Abb. 1.2). Zellen die kein Oberflächen-Ig, jedoch das B220-Antigen exprimieren, können in $CD43^+$ proB-Zellen und in $CD43^-$ prä-B-Zellen gegliedert werden (Coffman und Weissman, 1983; Hardy et al., 1991). Eine weitere Einteilung im frühen Stadium der B-Zellentwicklung, der $CD43^+$ B-Zellvorläufer, erfolgt durch das hitzestabile Antigen HSA und der Amino-peptidase BP-1 (Hardy et al., 1991).

Ehlich et al. (1993, 1994) bestimmte den Ig-Genrearrangementstatus der B-Zellpopulation der jeweiligen Fraktionen. In pro-B-Zellen erfolgt eine Umgruppierung des Locus für die schwere (H) Ig-Kette. Auf die Rekombination von D_H und J_H in der Fraktion B folgt in der Fraktion C die Verknüpfung von V_H mit DJ_H . Nach der erfolgreichen Umordnung der V(D)J Gene, wird ein vorläufiger prä-B-Zell-Rezeptorkomplex exprimiert, der aus der schweren μ -Kette des Immunglobulins besteht und in Assoziation mit einer surrogaten leichten Kette (SLC) auf der Oberfläche der frühen prä-B-Zellen (Fraktion C') exponiert wird (Karasuyama et al., 1990, 1994; Tsubata und Reth, 1990; Winkler et al., 1995; Melchers, 1993). Zu diesem Komplex gehören die Signalproteine $Ig\alpha$ und $Ig\beta$. Bevor die Fraktion C' dazu übergeht, einen Locus für die leichte Kette umzuordnen, wird diese frühe prä-B-Zelle größer und durchläuft mehrere Zellteilungsrunden. Zellen der Fraktion D werden als späte prä-B-Zellen bezeichnet, in denen die Gensegmente für die leichte Kette umarrangieren

(Ehlich et al., 1994; Ten Boekel et al., 1995). Zunächst erfolgt die Umlagerung am Ig κ -Lokus, wenn dies nicht erfolgreich war, am Ig λ -Lokus (Takemori und Rajewsky, 1981; Yamagami et al., 1999a, 1999b). B-Zellen der Fraktion D mit einem produktiven IgL-Rearrangement entwickeln sich nach Expression der IgL-Kette zu unreifen B-Lymphozyten (Fraktion E: B220⁺IgM⁺IgD⁻), die einen IgM-Antigenrezeptor im BCR-Komplex auf der Zelloberfläche präsentieren. Reife, langlebige und rezirkulierende B-Zellen entsprechen der Fraktion F mit dem Expressionsprofil B220⁺IgM⁺IgD⁺ (Förster et al., 1989; Hardy et al., 1991). Jede B-Zelle generiert eine schwere und eine leichte Kette, so dass jede reife Zelle nur Rezeptoren mit einzigartiger Spezifität exprimiert („allelic exclusion“). Nach der Reifung im Knochenmark wandern die B-Zellen zu den peripheren lymphoiden Organen wie z.B. Lymphknoten und Milz.

Melchers et al., klassifizieren die Stadien der B-Zelllinie aufgrund ihres IgH-Rearrangement-Status und der differentiellen Expression von Zelloberflächenmarkern, wie B220, CD43, c-Kit und CD25 (Melchers et al., 1993, 1995).

Die transkriptionelle Regulation verschiedener Gene spielt eine wichtige Rolle während der Differenzierung von B-Zellen. Das zeigt sich bei genetisch veränderten Mäusen, die die Fähigkeit verloren haben, die entsprechenden Proteine zu synthetisieren und folglich eine gestörte B-Zelldifferenzierung zeigen. Unter anderem scheinen die Transkriptionsfaktoren PU.1, Pax5, Ikaros, E2A und EBF an der Regulation dieser Differenzierungsprozesse beteiligt zu sein (Glimcher und Singh, 1999; Hardy, 2003). Mäuse bei denen das PU.1- oder das Ikaros-Gen inaktiviert wurde, entwickelten keine pro-B-Zellen (Scott et al., 1994; McKercher et al., 1996; Olson et al., 1995; Wang et al., 1996). Die Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und Pax5 sind essentiell für die Aktivierung von B-Zellspezifischer Gene, solche wie Ig α , Ig β , λ 5, VpreB und CD19 (Hardy, 2003; Bain et al., 1997; Romanow et al., 2000; Goebel et al., 2001; Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999).

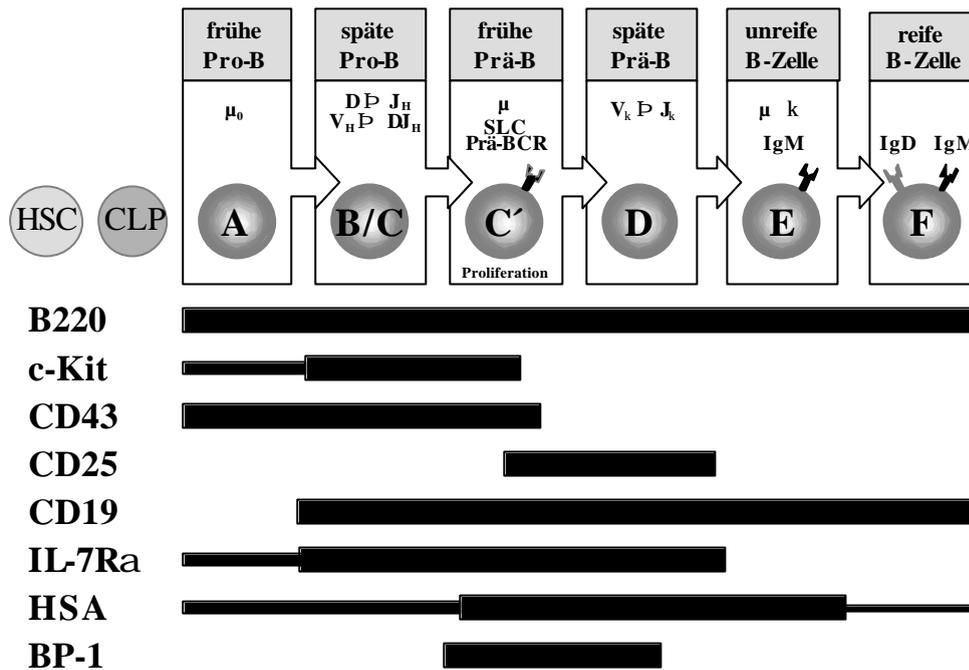


Abbildung 1.2: Modell der B-Zelldifferenzierung im Knochenmark der Maus

Die Einteilung der Zellen in die Fraktionen A-F erfolgte aufgrund der differentiellen Ausprägung der Oberflächenmarker, modifiziert nach Hardy und Hayakawa (2001) und Janeway (2002).

1.3 T-Lymphozyten

Wie bereits erwähnt erkennen die T-Lymphozyten das Antigen nicht in löslicher Form wie die B-Zellen, sondern sind darauf angewiesen, dass ihnen kurze Peptidfragmente des Antigens in Verbindung mit Molekülen des MHC auf anderen Zellen präsentiert werden. Für eine physiologische Immunantwort der T-Zellen in der Peripherie ist es von entscheidender Bedeutung, dass die T-Zelle mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (TCR) nicht nur fremde Antigene, sondern auch das antigen präsentierende MHC Molekül als körpereigen erkennt. Hierzu unterziehen sich die T-Zellen während der Differenzierung im Thymus zwei Selektionsvorgängen: der positiven und negativen Selektion. Die positive Selektion ist der Vorgang, durch den das T-Zell-Repertoire auf körpereigene MHC restringiert wird (Marrack und Kapplar, 1997; von Boehmer, 1992; Owen und Venkitaramen, 1996). Der zweite, negative Selektionsprozeß eliminiert oder inaktiviert Zellen, welche gegen körpereigene Peptide oder MHC Moleküle gerichtete T-Zellrezeptoren tragen, um sicherzustellen, dass die reifen T-Zellen eigentolerant sind (von Boehmer, 1992; Owen und Venkitaramen, 1996).

1.3.1 Thymus als Ort der T-Zellreifung

T-Zellen leiten sich im Knochenmark von den CLP ab. Die Vorläuferzellen der T-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern zur Reifung in den Thymus, weshalb die sich aus diesen Zellen entwickelnden Lymphozyten als Thymusabhängige (T-) Zellen oder Thymozyten bezeichnet werden. Die frühen T-Vorläuferzellen unterziehen sich einer Vielzahl geordneter Proliferations- und Differenzierungsschritte innerhalb des Thymus. Sie verlassen diesen als mit einem funktionellen T-Zellrezeptor und Korezeptoren ausgestattete T-Zellen, um in die peripheren, lymphatischen Organe einzutreten.

Der Thymus liegt im oberen Brustbereich direkt über dem Herzen und ist bereits vor der Geburt voll entwickelt. Er besteht aus zahlreichen Lappen (Lobuli), die in zwei Kompartimente gegliedert sind: in eine helle, zentrale Region, das Thymusmark (Medulla) und in eine äußere, kerndichte, kortikale Region, dem sog. Thymuskortex. Sich entwickelnde unreife T-Vorläuferzellen sind in ein epitheliales Netzwerk eingebettet, in dem sie von Stroma-Zellen umgeben sind (Thymusstroma). Dieser Zellkontakt zwischen sich differenzierenden, unreifen Thymozyten und den kortikalen, epithelialen Stroma- sowie den dendritischen Zellen des Thymus am Kortex-Medulla-Übergang ist mit von entscheidender Bedeutung für den Reifungsprozeß der T-Zellen (Übersicht in van Ewijk, 1991). Hingegen findet man die reifen Thymozyten angehäuft mit weiteren dendritischen Zellen und Makrophagen in der Medulla. Welche funktionelle Bedeutung dieser gegliederte Aufbau des Thymus für die Immunität hat, konnte sowohl durch Patienten mit dem DiGeorge-Syndrom als auch durch Experimente am Mausmodell (Nacktmäuse, die homozygot für die nude-Mutation sind) gezeigt werden (Di George et al., 1967, Pantelouris, 1971, Blackburn et al., 1996). In beiden Fällen sind die betroffenen Individuen aufgrund des Fehlens eines funktionellen Thymusepithels nicht fähig, T-Zellen zu produzieren.

1.3.2 Stadien der T-Zelldifferenzierung im Thymus

Im Verlauf der Thymozyten-Entwicklung ist es möglich, die verschiedenen Stadien anhand der charakteristischen Expression von differenzierten Oberflächenmolekülen zu definieren. Dabei spiegelt z.B. das Auftreten des prä-TCR, des TCR, der Korezeptoren CD4 und CD8, und des CD3-Komplexes, sowie von anderen Zelloberflächenmolekülen diskrete Phasen der funktionellen T-Zellreifung wider (Fehling und Boehmer, 1997). Die Hauptklassifizierung der unreifen und reifen Thymozyten wird aufgrund der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 vorgenommen. Diese Moleküle sind Korezeptoren des TCR und hilfreich bei der Unterscheidung der reifen T-Zellen in CD4⁺-T-Helferzellen bzw. CD8⁺-zytotoxische T-Zellen (Kisielow und Boehmer, 1995; Fehling und Boehmer, 1997).

Thymozyten sind bezüglich CD4 und CD8 entweder doppeltnegativ (DN, CD4⁻CD8⁻), doppeltpositiv (DP, CD4⁺CD8⁺) oder einzelpositiv (SP, CD4⁺ oder CD8⁺) (Sebzda et al., 1999). Somit ergibt sich eine grobe Einteilung der Thymozyten in vier Populationen, die in Abbildung 1.3 schematisch zusammengefasst ist.

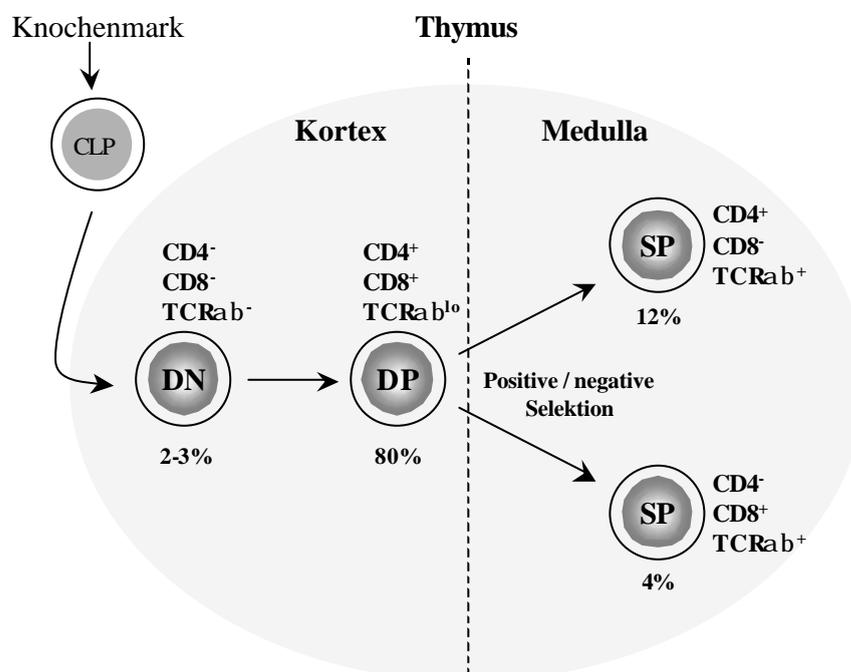


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der Thymozyten-Populationen im Thymus

T-Zellen leiten sich von dem gemeinsamen lymphatischen Vorläufer CLP aus dem Knochenmark ab. Die CD4- und CD8-Oberflächenmoleküle werden gemeinhin als Marker verwendet, um die Hauptklassen von Thymozyten einzuteilen, und um den Ablauf der Thymozyten-Reifung zu bestimmen („+“ bedeutet Expression, „-“ fehlende Expression und „lo“ niedrige Expression) (modifiziert nach Abbas et al., 1996).

1.3.3 Prä-Thymozyten Differenzierungsschritte

Die frühen Abläufe der T-Zellentwicklung ist durch drei Hauptereignisse gekennzeichnet: die Determinierung der T-Zelllinie, die Expansion durch Proliferation der T-Zellvorläufer und die Selektion des prä-TCR Komplexes (Möröy und Karsunky, 2000). Das Stadium der heterogenen DN-Population kann aufgrund ihrer Expression des Adhäsionsmoleküls CD44 (Phagocyte-Glykoprotein-1 (PGP-1)), der α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2R α ; CD25) oder des Rezeptors für das hämatopoetische Zytokin Stammzellfaktor (SCF) c-Kit (CD117) in weitere Subklassen unterteilt werden (Pearse et al., 1989; Godfrey und Zlotnik, 1993; Godfrey et al., 1993; Ceredig und Rolink, 2002; siehe Abb. 1.4).

Die früheste unreife Subpopulation innerhalb der DN Thymozyten stellen die CD44⁺CD25⁻c-Kit⁺ DN Zellen (DN1) dar. Aus dieser Zellpopulation können neben den NK-Zellen und dendritischen Zellen (DC) auch B-Zellen hervorgehen (Ardavin et al., 1993; Wu et al., 1996, s. Abb. 1.4). Die DN1 Population ist neben den oben erwähnten Oberflächenproteinen auch durch die schwache Expression des Korezeptors CD4 (CD4^{lo}) gezeichnet (Godfrey et al., 1992, 1993).

Hingegen ist die c-Kit Expression (Rezeptortyrosinkinase für SCF) und die Expression des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R) für die weitere Differenzierung zu DN2-Thymozyten (CD44⁺CD25⁺c-Kit⁺) von Bedeutung (Rodewald et al., 1995; Zlotnik et al., 1995). Verlust der CD4 Expression und die Expression von CD25 in diesen Zellen determiniert den ersten Schritt der T-Zellentwicklung. Zwar können sich aus diesen Zellen keine B-Zellen mehr entwickeln, sie können aber weiterhin lymphoid-dendritische und NK-Zellen hervorbringen (Ardavin et al., 1993; Wu et al., 1996; Moore und Zlotnik, 1996).

Im nachfolgenden Differenzierungsschritt werden CD44 und c-Kit in geringem Ausmaß exprimiert. In diesem DN3-Stadium (CD44^{-/lo}CD25⁺c-Kit^{lo}) treten die Zellen in die G1/G0-Phase des Zellzyklus und beginnen mit der Umlagerung der Gene für die TCR β -, γ - und δ -Ketten (Godfrey et al., 1994; Petrie et al., 1995). Sie haben damit dann auch die Fähigkeit verloren, sich in dendritische Stromazellen zu differenzieren. Gleichzeitig wird die Entscheidung getroffen, ob sie sich in eine $\alpha\beta$ oder in eine $\gamma\delta$ T-Zelle weiterentwickeln (Godfrey et al., 1994; Dudley et al., 1995).

Nur Zellen, die ihre TCR β -Kettengene produktiv rearrangiert haben, und somit einen funktionellen prä-TCR Komplex aufweisen können, werden als „ β -selektioniert“ bezeichnet. Diese CD44⁺CD25⁻ Thymozyten bilden das DN4-Stadium. Anschließend regulieren sie CD4 und CD8 hoch und werden somit zur DP-Zellen, der Hauptpopulation der Thymozyten (Anderson und Perlmutter, 1995; Penit et al., 1995; Zuniga-Pflücker und Lenardo, 1996; Abb. 1.4).

Die frühe Phase der T-Zellentwicklung kann in eine TCR-unabhängige und in eine prä-TCR-abhängige Differenzierung unterteilt werden (Abb. 1.4). Da bis zur β -Selektion keine Umgruppierung der TCR β -Gene in den DN Thymozyten stattfindet, und somit auch kein funktioneller TCR existiert, werden diese Schritte von Zytokinen gesteuert. Insbesondere sind dabei die vom Thymuskortex sezernierten Zytokine SCF (c-Kit Ligand) und IL-7 (Interleukin-7) von großer Bedeutung (Baird et al., 1999). In DN1 und DN2 Populationen ist c-Kit Expression stark ausgeprägt, wobei der IL-7R in allen DN-Phasen exprimiert wird (Ceredig und Rolink, 2002; Fry und Mackall, 2002). Welche bedeutende Rolle c-Kit bzw. IL-7 vermittelte Signale für die Thymozyten-Entwicklung spielen, konnte anhand gen-defizienter Mäuse dargelegt werden. Sowohl IL-7R α , als auch IL-7 defiziente Mäuse zeigen einen starken Defekt in der frühen T-Zellentwicklung, der jedoch zu keinem vollständigen Differenzierungsblock führt, wie dies bei Rag-1 bzw. Rag-2 defizienten Mäusen zu beobachten ist, sondern zu einer dramatischen Reduktion der frühen Thymozyten (Peschon et al., 1994; von Freuden-Jeffrey et al., 1995). Dass dieser Zellverlust auf den verstärkt auftretenden programmierten Zelltod der T-Zellen zurückzuführen ist, zeigte die Koexpression von Bcl-2 in IL-7R α defizienten Mäusen (Maraskovsky et al., 1997; Akashi et al., 1997). Diese Resultate deuten auf eine anti-apoptotische Funktion des Zytokins IL-7 hin.

Wie bereits erwähnt, ist der c-Kit Ligand SCF ein weiteres Zytokin, welches in der frühen Thymozyten-Entwicklung eine wichtige Rolle spielt. Die Notwendigkeit von SCF und c-Kit bei der Differenzierung wurde, wie bei IL-7 und IL-7R, anhand von SCF bzw. c-Kit defizienten Mäusen festgestellt (Rodewald et al., 1995, 1997). Diese Tiere zeigen eine Reduktion sämtlicher Leukozyten, wobei die Anzahl der Thymozyten durch starke Reduktion der Zellzahl der ersten drei DN-Subpopulationen, am stärksten betroffen ist. Somit wird c-Kit und SCF eine proliferative und Differenzierungsvorgänge auslösende Wirkung zugeschrieben (Rodewald et al., 1995, 1997).

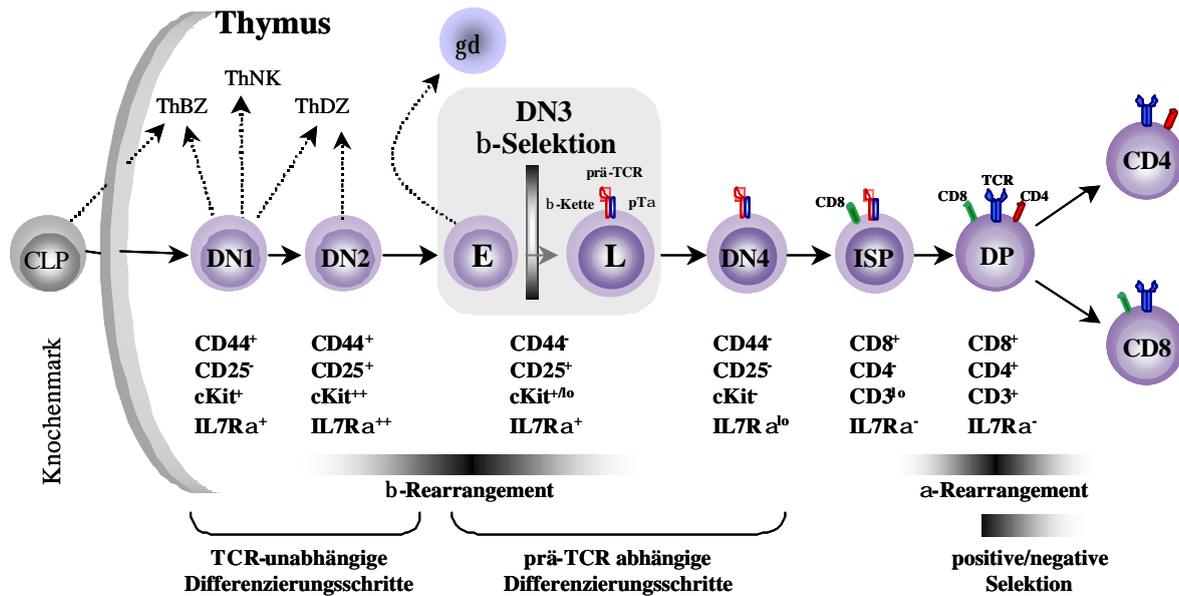


Abbildung 1.4: Die Entwicklung der DN Thymozyten

Die heterogene DN-Population bildet sich aus unreifen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP), die aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern und noch keine Linien determinierung aufweisen. Aus den unreifen Stadien können sich noch thymoide B-Zellen (ThBZ), NK-Zellen (ThNK) und dendritische Zellen (ThDZ) entwickeln. Hervorgehoben ist die für die Thymozyten-Reifung wichtigste Stufe, die β -Selektion, die in den „E“-Zellen (engl. „expected size“) der DN3 Population stattfindet. Die Ausbildung des prä-TCR führt zu großen, blastoiden „L“-Zellen (engl. „large size“). Im Verlauf der fortschreitenden DN-Differenzierung kann funktionell zwischen einem TCR-unabhängigen und einem prä-TCR-abhängigen Vorgang unterschieden werden. (pT α bedeutet prä-TCR α).

Mit dem Erreichen der DN3-Phase starten die CD44⁻CD25⁺-Thymozyten mit der Umgruppierung ihrer TCR β -, γ - und δ -Gene, ein Prozess der als V(D)J Rekombination bezeichnet wird (Lewis, 1994; Willerford et al., 1996). Während die Umlagerung dieser drei TCR Ketten gene nahezu gleichzeitig verläuft, findet das Rearrangement der TCR α -Kette erst später in der Population der ISP (engl. „immature single positive“) bzw. in den DP-Zellen statt. Der V(D)J-Rekombinationsprozess wird wesentlich von den beiden lymphoidspezifischen Enzymen Rag-1 und Rag-2 (Rekombinationsaktivierende Gene) initiiert. Die Entscheidung der DN3 Population, sich in eine $\alpha\beta$ T-Zelle weiter zu entwickeln, ist von einer erfolgreichen Umgruppierung der TCR β -Genen abhängig. In den meisten Fällen kommt es jedoch zu einer produktiven Umordnung dieser Gene, so dass eine funktionelle TCR β -Kette entsteht, die sich dann zusammen mit einer vorläufigen prä-TCR α -Kette (pT α) und dem CD3-Komplex paart, um den prä-TCR zu bilden und folglich die Zelle in die $\alpha\beta$ T-Zelllinie zu treiben (Mombaerts et al., 1992a; Saint-Ruf et al., 1994; Fehling et al., 1995). Die Mehrheit (95 %) der T-Zellen gehören der $\alpha\beta$ T-Zellreihen. Die vom prä-TCR vermittelten Signa-

le, die denen des reifen TCR ähneln dürften, verhindern den Zelltod der TCR β -exprimierenden Zellen und induzieren Proliferations- und Differenzierungsvorgänge. Dieser prä-TCR-vermittelte Prozess wird als „ β -Selektion“ bezeichnet.

Die Prä-TCR-exprimierenden Zellen treten in die S-Phase ein, werden groß und beginnen zu proliferieren. Somit lassen sich im DN3-Stadium anhand der Zellgröße die kleinen E-Zellen (engl. „expected size“, ca. 85 %), die (noch) keine funktionelle TCR β -Kette rearrangiert haben, von den großen L-Zellen (engl. „large size“; ca. 15 %) mit TCR β -Expression differenzieren (Abb. 1.4). Im Gegensatz zu den E-Zellen zeigen die L-Zellen alle Anzeichen von stark proliferierenden Zellen, u.a. größere Mengen an Zyklin A und B, hohe CDK2-Kinaseaktivität, RB-Phosphorylierung und vor allem die Abwesenheit von p27^{Kip1} (Hoffman et al., 1996; Schmidt et al., 1998b). Dieser G1 spezifische Inhibitor von Zyklin/CDK Komplexen ist in allen anderen Thymozyten-Subpopulationen, einschließlich der E-Zellen, sehr hoch exprimiert. Die massive Proliferation, welche mit der β -Selektion verbunden ist, setzt sich in abgeschwächter Form im nächsten Differenzierungsschritt den DN4-Thymozyten (CD4⁻CD25⁻) fort.

Alle DN4-Zellen weisen einen rearrangierten β -Lokus auf und werden ebenfalls durch die Expression des prä-TCR reguliert. Sie beginnen sehr schnell zuerst den CD8 Korezeptor auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, was zu der unreifen ISP-Population mit mittlerer CD8 Expression führt. Anschließend wird die Expression beider Korezeptoren initiiert, so dass schließlich die Hauptpopulation der Thymozyten, die CD4⁺CD8⁺-DP-Zellen, gebildet wird (Abb. 1.4). Sobald die großen DP Thymozyten aufhören, sich zu teilen, starten sie mit dem Rearrangement der Gene für die TCR α -Kette. In dieser Phase der Thymozyten-Entwicklung kommt es erneut zur Expression und Aktivierung der notwendigen Rekombinationsproteine, wie z.B. Rag-1 und Rag-2. Dabei können aufgrund der Organisation des α -Lokus mit einer Vielzahl an V α - und J α -Gensegmenten viele aufeinanderfolgende VJ α -Genumlagerungen ablaufen, da die Umlagerung der α -Kette nicht wie bei der β -Kette dem Allelausschluss unterworfen ist, und die Rekombinations-Komplex-Maschinerie auch nach erfolgreichem Rearrangement noch aktiv bleibt.

Die enorme Bedeutung der Rekombinationsereignisse und eines funktionellen prä-TCR für die T-Zellen konnte sowohl mittels natürlich vorkommender oder als auch induzierter Mutationen bei Mäusen gezeigt werden. Mäuse, in denen eines der Rag-Gene ausgeschaltet ist, leiden an einem kompletten Block der Thymozyten-Entwicklung innerhalb der DN3 Popu-

lation (Mombaerts et al., 1992b; Shinkai et al., 1992). Aufgrund des fehlenden prä-TCR findet bei diesen Mäusen keine β -Selektion statt, die zur Anreicherung der E-Zellen führt. Einen vergleichbaren Phänotyp zeigen auch Mäuse, die gendefizient für die CD3 ϵ -Kette, sind und denen somit ein funktioneller Bestandteil des TCR-Komplexes fehlt (Malissen et al., 1995). Trotz erfolgter Umgruppierung der β -Kette in diesen Mausstämmen kommt es zu keiner Expression eines funktionellen prä-TCR auf den DN4-Thymozyten. Umgekehrt wird der Phänotyp der Rag-1 und Rag-2 defizienten Mäuse durch Koexpression einer TCR β -Kette oder von konstitutiv aktivem cRaf-1 und Ha-Ras aufgehoben, so dass sich wieder DP Thymozyten bilden können (Shinkai et al., 1993; Swat et al., 1996; Iritani et al., 1999).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der in den DN3 Populationen stattfindet, und vom prä-TCR-Signal ausgeht, ist der Allelausschluss (allelic exclusion) (Robey und Fowlkes, 1994; von Boehmer et al., 1998). Bei diesem Vorgang wird in einer diploiden Zelle nur eines der beiden Allele eines gegebenen Gens exprimiert. Da jede T-Zelle nur einen TCR mit einer Spezifität tragen darf, muss nach erfolgter Umlagerung und Expression einer funktionellen β -Kette (oder γ -Kette) die Genumlagerung beendet werden, um eine Rekombination des zweiten Allels für die β - bzw. γ -Kette zu verhindern. Um die Bildung von $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ T-Zellen zu gewährleisten, durch Unterdrückung des γ - bzw. β -Lokus, findet gleichzeitig ein ähnlicher Mechanismus statt, der dem Isotypenausschluss zugrunde liegt. Ein bevorzugtes Modell der allelischen Exklusion ist das Abschalten der Rag-1 und Rag-2 Expression. Allerdings werden diese beiden Proteine später während des α -Rearrangements erneut gebraucht und exprimiert, so dass es weitere Mechanismen der allelischen Exklusion existieren. Diese verhindern die Zugänglichkeit des TCR β -Lokus für Transkriptionfaktoren und Rekombinasen durch strukturelle Änderungen des TCR β -Lokus (Möröy und Karsunky 2000). Die entsprechenden Signale werden dabei über die Tyrosinkinase p56^{Lck} vermittelt (Gärtner et al., 1999; Iritani et al., 1999).

1.3.4 TCR-abhängige Differenzierung

Der nächste wichtige Schritt der Thymozyten-Reifung, nach der Expression der TCR-, CD4- und CD8-Rezeptoren im Stadium der DP T-Zellen, ist die Selektion jener Zellen, die das Repertoire der reifen peripheren T-Zellen ausmachen. Für eine physiologische Immunantwort peripherer T-Zellen ist es von entscheidender Bedeutung, dass die T-Zelle mit Hilfe ihres TCR-Rezeptors nicht nur Fremdantigene, sondern auch das körpereigene

ihres TCR-Rezeptors nicht nur Fremdantigene, sondern auch das körpereigene MHC Molekül erkennt. Diese zur MHC Restriktion und Eigentoleranz führenden Selektionsprozesse werden als positive und negative Selektion bezeichnet (von Boehmer, 1994; Nossal, 1994). Der Vorgang der positiven Selektion stellt sicher, dass nur diejenigen Thymozyten, deren TCR mit eigenen oder fremden Peptiden verbundene körpereigene MHC Moleküle binden, überleben. Diese TCR-Spezifität kann sich mehrfach ändern, da die Umgruppierung der α -Ketten-Gene permanent stattfindet, mit der Konsequenz, dass unterschiedliche $\alpha\beta$ -Heterodimere mit der spezifischen β -Kette gleichzeitig auf einer T-Zelle vorkommen können, was zur Steigerung der Ausbeute an geeigneten T-Zellen führt (Borgulya et al., 1992). Exprimiert ein Thymozyt einen bestimmten funktionellen $\alpha\beta$ TCR, kann er dessen Spezifität nicht mehr verändern.

Neben der Expressionserhöhung ihrer $\alpha\beta$ TCR auf der Zelloberfläche, starten und verstärken die T-Zellen auch die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 (Barthlott et al., 1997, Abb. 1.5). Positiv selektionierte DP-Zellen regulieren die Expression der beiden Korezeptoren herab und erreichen das $CD4^{lo}CD8^{lo}TCR^{int}CD69^{+}$ -Stadium (Lucas und Germain, 1996). Zellen dieser Phase stellen die Expression der Rag Proteine ab, um damit die Möglichkeit zur weiteren Rekombination ihrer TCR α -Gene zu unterdrücken. Anschließend wird die CD4 Expression wieder erhöht, was zu der Subpopulation von $CD4^{+}CD8^{lo}TCR^{int/hi}CD69^{+}$ -Zellen führt. Unabhängige Experimente konnten zeigen, dass aus dieser Subpopulation direkt reife $CD4$ Einzelpositiven (SP) oder $CD4^{lo}CD8^{+}TCR^{int/hi}CD69^{+}$ -Zellen hervorgehen, wobei die letzteren MHC-I restringiert sind und in $CD8$ Einzelpositive T-Zellen differenzieren (Lundberg et al., 1995; Barthlott et al., 1997). Diese Entwicklungsschritte mit den jeweiligen Markern sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst.

Entscheidendes Kriterium für diese strengen Auswahlverfahren ist die Gesamtavidität des TCR gegenüber Eigen-MHC/Eigen-Ag-Komplexen (Sebzda et al., 1999). Thymozyten, deren TCR mit einer hohen Affinität an Eigenpeptid-Ag in Assoziation mit Eigen-MHC binden, werden infolge der TCR-MHC Interaktion durch den programmierten Zelltod eliminiert. Dieser Prozess wird als negative Selektion bzw. klonale Deletion bezeichnet (von Boehmer, 1992; Owen und Venkitaraman, 1996). Die Zellen können zu jeder Zeit der Thymozyten-Entwicklung ab dem DP $CD69^{+}$ -Stadium negativ selektioniert werden, die meisten

T-Zellen überleben diese Selektionsschritte nicht, während die überlebenden $\alpha\beta^+$ TCR-Thymozyten weiter zu $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -SP-Thymozyten reifen.

Der Vorgang der positiven und negativen Selektion ist verbunden mit der CD4/CD8-Linienentscheidung, die festlegt, dass CD4-T-Zellen MHC Klasse II und CD8-T-Zellen MHC Klasse I restringiert sind. Für diese Determinierung werden zwei Modelle diskutiert: Das stochastisch/selektive Modell (Guidos, 1996) propagiert, dass die Expression eines Korezeptors zufällig abgeschaltet wird und anschließend geeignete TCR/Korezeptor-Kombinationen selektioniert werden und überleben. Das instruktive Modell hingegen sieht vor, dass die Bindung des TCR an den Peptid/MHC-Komplex und die gleichzeitige Bindung des passenden Korezeptors die Differenzierung in Richtung dieses Wegs fördert, durch transkriptionelles abschalten des nicht passenden Korezeptor-Signals (Weiss und Littman, 1994).

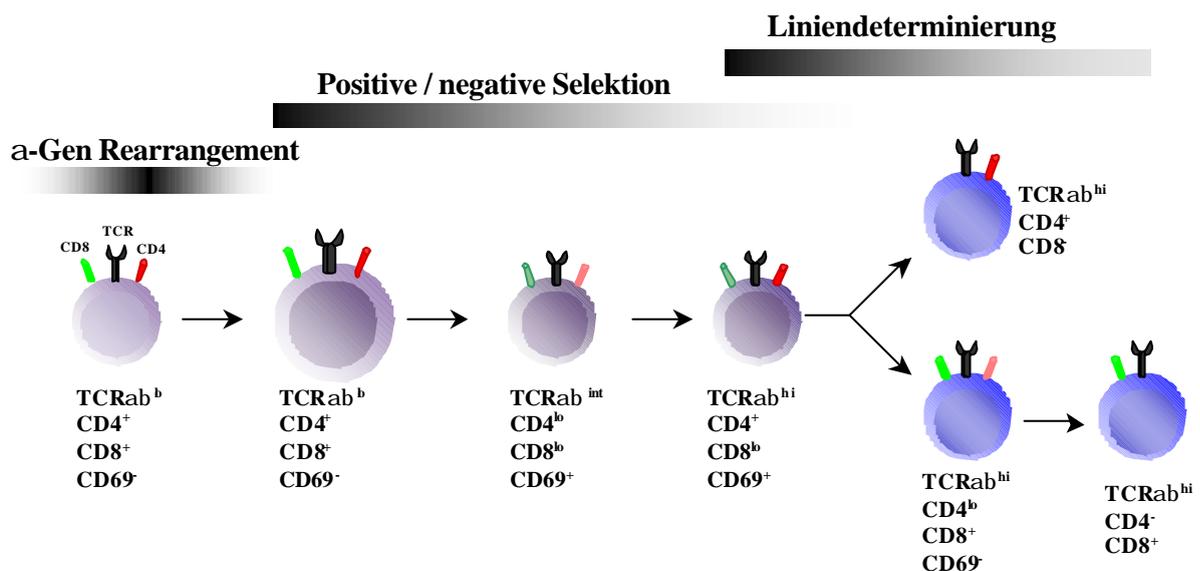


Abbildung 1.5: Entwicklungsprozesse während den DP- und SP-Stadien

Die jeweiligen Thymozyten-Populationen werden eingeteilt nach graduellen Unterschieden in der Expression der Oberflächenmarker TCR $\alpha\beta$, CD4, CD8 und CD69. Durch die dargestellten Balken werden die Populationen den bestimmten Entwicklungsprozessen zugeordnet. (Abbildung modifiziert nach Möröy und Karsunky, 2000).

1.3.5 Regulation der Thymozyten-Entwicklung

An der Entwicklung der T-Zellen ist eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. Viele von ihnen übernehmen Aufgaben bei der Regulation und Ausführung der aufeinander folgenden Entwicklungsprozesse während der sequentiellen Abfolge der Thymozyten-Populationen. In Abbildung 1.6 sind einige der Proteine zusammengestellt, die bei der T-Zellentwicklung eine Rolle spielen.

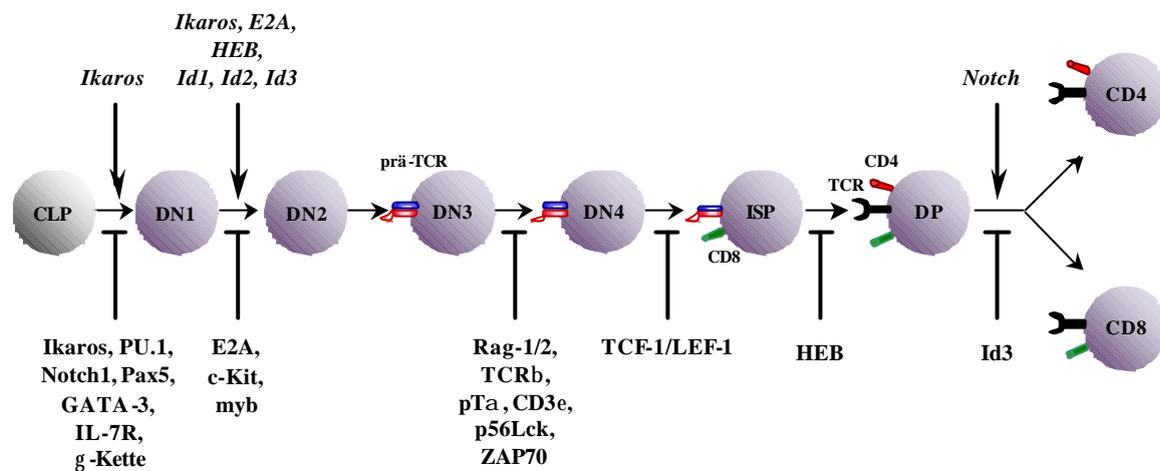


Abbildung 1.6: Regulation der T-Zelldifferenzierung im Thymus

Dargestellt ist die Regulation der thymoiden T-Zellentwicklung durch einige Familien von Proteinen. Die Anmerkungen in kursiver Schrift über dem Entwicklungsschema sind regulatorische Effekte der Faktoren in den jeweiligen Stadien, während die unten angegebenen Proteine den Block in den entsprechenden gendefizienten Mäusen wiedergeben.

Da bis zum Moment der β -Selektion kein funktioneller TCR existiert, müssen die vorangehenden Differenzierungsschritte von anderen Faktoren dirigiert werden. Unter diesen sind die bereits erwähnten Zytokine IL-7 und SCF hervorzuheben (Baird et al., 1999). Die Bedeutung von c-Kit bzw. IL-7 vermittelten Signalen für die T-Zellenentwicklung lässt sich anhand des Phänotyps gendefizienter Mäuse deutlich machen. Der Verlust von IL-7 und IL-7R führt zu einer dramatischen Reduktion der Thymozytenzahl sowie von pro-T- und pro-B-Zellen im Knochenmark (Peschon et al., 1994; von Freedon-Jeffrey et al., 1995). SCF und c-Kit gendefiziente Mäuse zeigen eine Reduktion sämtlicher Leukozyten, was für eine frühe Funktion bei Vorläuferzellen im Knochenmark spricht (Rodewald et al., 1995). Allerdings sind die Thymozyten deutlich stärker betroffen als andere Populationen. Dies ist wahrscheinlich vor allem auf eine mangelhafte Expansion der DN1 Population zurückzuführen. Dabei ist die Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden für die zwischen den

verschiedenen Subpopulationen ablaufenden Proliferationsschritte von entscheidender Bedeutung. Untermuert werden diese Ergebnisse durch Mangelmutanten, denen nicht nur die c-Kit Expression fehlt, sondern auch die vielen Zytokinrezeptoren gemeinsame γ -Kette (somit auch der IL-7R) (Rodewald et al., 1997). Diese Phänotypen unterstreichen die Wichtigkeit verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine in der frühen T-Zellentwicklung (Abb. 1.6).

Die rekombinationsaktivierenden Proteine Rag-1 und Rag-2 sind sowohl an der Umgruppierung von Immunglobulingenen, als auch an der Umordnung der Gene für den T-Zellrezeptor beteiligt. So ist die T-Zellentwicklung in Rag-1- und Rag-2- defizienten Mäusen, die kein produktives Rearrangement der β -Ketten Gene bilden können, in der Transition der Zellen von DN3 zu DN4 blockiert (Mombaerts et al., 1992a, b; Shinkai et al., 1992). Einen vergleichbaren Phänotyp zeigen Mäuse, denen entscheidende Komponenten des TCR fehlen, oder bei denen zugehörige Signaltransduktionswege inhibiert sind. Beispiele hierfür sind gendefiziente Mäuse der CD3 ϵ -Kette, der Tyrosinkinase p56^{Lck} und ZAP70 und des Adaptorproteins SL-76 (De Jarnette et al., 1998; Malissen et al., 1999; Levin et al., 1993; Clements et al., 1998; Pivniouk et al., 1998; Abb. 1.6).

Schließlich sind auch einige Regulationsproteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder Rekombinatinsenzyme, für die Thymozyten-Entwicklung erforderlich, von denen einige in Abb. 1.6 aufgeführt sind. Auch hier konnten gendefiziente (KO) Mäuse zeigen, für welches Stadium sie entscheidend sind. Viele von ihnen, wie etwa Ikaros, GATA-3, PU.1 oder Notch1 werden in den frühen T-Vorläuferzellen exprimiert. Das Fehlen dieser Faktoren führt bereits zu einer Blockierung der Transition von CLP zu der frühen T-Zelle DN1. Diesen KO-Mäusen fehlt die Fähigkeit der T-Zelllinien Determinierung (Georgopoulos et al., 1994, 1997; Winandy et al., 1999; Ting et al., 1996; Spain et al., 1999; Mak et al., 2001; Radtke et al., 1999, 2004). TCF-1 (engl. „T-cell factor-1“) oder LEF-1 (engl. „lymphoid enhancer factor-1“) wird erstmals im doppeltnegativen Stadium exprimiert. Fehlt dieses Protein, können die DN4 Thymozyten nach produktivem β -Rearrangement nicht in die Proliferationsphase eintreten und bilden somit nur wenig DP Thymozyten (Okamura et al., 1998). Aber auch Helix-Loop-Helix (HLH) Proteine, wie z.B. die Produkte des E2A-Gens und der HEB-Proteine, als auch die der Id Gene (engl. „Inhibitor of DNA binding“) spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Thymozyten Differenzierung (Übersicht siehe Benezra, 2001 und Quong et al., 2002). Die HLH Proteine lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Die erste Klasse sind die bHLH Transkriptionsfaktoren, welche E-Box bin-

denden Proteine beinhaltet, hierzu zählen die Produkte des E2A Gens (E12 und E47), sowie die HEB Proteine. Diese haben die Fähigkeit als homo- oder heterodimere Faktoren an palindromische DNA-Sequenzen der Art CANNTG, sog. EBoxen, zu binden. Für die Aufklärung der Rolle der bHLH Proteine in der lymphoiden und speziell in der T-Zellentwicklung waren maßgeblich die Studien E2A und HEB defizienter Mäuse, sowie die an Id überexprimierenden Mäusen. E2A defiziente Mäuse (E2A^{-/-}) haben deutlich weniger Thymozyten und zeigen eine deutliche Reduktion der DN und DP Thymozyten, aber auch eine erhöhte Anzahl der CD8-Einzelpositiven T-Zellen (Bain et al., 1997; 1999). Der Grund für die geringe Anzahl von DP Thymozyten liegt in der blockierten Entwicklung der DN1 T-Zellen zur DN2 Population in diesen Mäusen (Bain et al., 1997). HEB^{-/-} Mäuse zeigen den Differenzierungsblock in der Transition von den DN-Zellen zu DP-Zellen (Barndt et al., 1999). Die zweite Klasse der HLH Faktoren beinhaltet die Proteine der Id Familie, die aufgrund der fehlenden basischen Region die DNA nicht binden können, jedoch als Antagonist der E-Box Proteine fungieren (Benezra et al., 1990). Diese Funktion üben sie durch Bildung von Heterodimeren mit E-Box Proteinen aus, und wirken somit in einer dominant-negativen Weise auf die Funktion der E-Proteine. Hierdurch wird die Aktivität der E-Proteine kontrolliert (Rivera und Murre, 2001). In Säugetieren wurden vier Mitglieder der Id-Proteinfamilie identifiziert, Id1 bis Id4. Id Proteine werden in allen lymphoiden Organen, wie der fötalen Leber, dem Knochenmark, der Milz und dem Thymus, exprimiert. Untersuchungen sowohl an Id transgenen Mäusen, die Id Proteine konstitutiv überexprimieren, als auch fötale Thymuskultur-Experimente, in denen retroviral Id transduziert wurde, lieferten weitere unterstützende Daten für die bedeutende Rolle der HLH-Proteine während der Thymozyten-Differenzierung. So zeigen Id1 transgene Mäuse eine Verminderung der Thymozytenzahl, welche ein Resultat der massiven Apoptosis (programmiertem Zelltod) der schon ausdifferenzierten Zellen ist (Kim et al., 1999), aber auch diese Mäuse zeigen einen Block in der Differenzierung von DN1 zu DN2. Hingegen führt die Id2 Überexpression zu einem Differenzierungsblock mehrerer Stadien der T-Zellenwicklung und zu einer Erhöhung der ISP Population (Morrow et al., 1999). Die Rolle von Id3 in der Thymozyten-Differenzierung ist umfassender untersucht worden, humane CD34⁺CD1a⁻ Vorläuferzellen, mit einem Id3 kodierendem Retrovirus infiziert, differenzieren nicht zu $\alpha\beta$ TCR-Zellen, sondern verstärkt zu NK-Zellen (Heemskerk et al., 1997). Detaillierte Untersuchungen der T-Zellentwicklung bei Id3^{-/-} Mäusen zeigen dessen Funktion während der positiven und negativen Selektion durch einen Blockphänotyp in DP-Stadium (Rivera et al.,

2000). Diese Daten entsprechen den Phänotypen die auch in E2A und HEB defizienten Mäusen beobachtet wurden.

Zusammengefasst zeigen diese Studien die Bedeutung der HLH-Proteine in der Lymphozyten Entwicklung und die Rolle des Gleichgewichts zwischen der E-Box Proteinmenge auf der eine Seite und der Id Proteinmenge auf der anderen Seite.

1.3.6 Periphere T-Zelldifferenzierung

T-Zellen sind nach ihrer Ausbildung im Thymus für die Erkennung von körperfremden Peptiden geschult und werden dann als naive bzw. reife T-Zellen bezeichnet. Sie erkennen mit ihrem T-Zellrezeptor (TCR) ein bestimmtes MHC-Molekül und reagieren nicht auf darauf präsentierte, körpereigene Peptide. Körperfremde Peptide jedoch führen bei entsprechender Kostimulation zu einer Aktivierung einzelner T-Zellen, die dann im Allgemeinen für die Eliminierung des Pathogens sorgen.

Naive T-Zellen zirkulieren im Körper durch das Blut und wandern in besonderen, in Lymphknoten vorkommenden Venolen (HEV) in die Lymphknoten aus, wo sie in Kontakt mit Antigen präsентierenden Zellen kommen. Über die Lymphe gelangen sie wieder zurück in den Blutkreislauf. Naive T-Zellen sind klein (zirka 10 nm Durchmesser) und an verschiedenen Oberflächenmarkern erkennbar, die u.a. für das sogenannte Lymphknoten-Homing verantwortlich sind. So exprimieren sie z.B. L-Selektin (CD62L) und den CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR7), der die Chemokine CCL19 und CCL21 bindet (Ahmadzadeh et al., 2001; Berg et al., 1991; Gunn et al., 1998). Weiterhin zeigen sie keinerlei Aktivierungsmarker wie CD69, CD25 (IL2R α) und CD95L oder Wanderungsmarker wie z.B. CD44 (Zelladhäsionsmolekül). Ebenso exprimieren sie CD28, das für die Kostimulation bei Aktivierung durch APC notwendig ist. Naive T-Zellen haben eine verhältnismäßig lange Lebenszeit, die von ständiger Ligation des TCR zu Selbst-Peptid-MHC-Komplexen des restringierenden MHC-Moleküls und IL-7-Bindung abhängt (Brocker, 1997; Kirberg et al., 1997; Schluns et al., 2000).

Der T-Zellrezeptor ist auf der Zelloberfläche mit einem Komplex aus sechs Polypeptiden assoziiert, der als CD3 bezeichnet wird und der Signalweiterleitung dient (Malissen et al., 1996). Außerdem exprimieren die meisten T-Zellen die Korezeptoren CD4 oder CD8, welche durch Bindung an MHC-I bzw. MHC-II die Aktivierungsschwelle erniedrigen (Jane-

way, 1992). Die Bindung eines passenden MHC/Peptid-Komplexes durch den T-Zellrezeptor führt dazu, dass sich der TCR/CD3-Komplex mit CD4 oder CD8 und einer Protein-Tyrosin-Phosphatase, CD45, zusammenlagert. CD3 und CD4/8 sind mit zwei zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, fyn/lck assoziiert, welche durch die Zusammenlagerung aktiviert werden. CD45 verstärkt die Aktivierung beider Kinasen. Dadurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche schließlich zur Proliferation und Differenzierung führt (Cantrell; 1996).

Die Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes reicht zur vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen nicht aus. Hierfür wird ein zweites Signal benötigt, das durch kostimulatorische Moleküle auf Antigen präsentierenden Zellen vermittelt wird. Nur solche Zellen sind in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren, da nur sie sowohl das Antigen präsentieren als auch Kostimulation vermitteln. Bei den kostimulatorischen Molekülen handelt es sich um B7-1 (CD80) bzw. B7-2 (CD86), welche von Makrophagen, dendritischen Zellen sowie B-Zellen exprimiert werden können. Sie binden an CD28 auf der T-Zelle, welches das positive kostimulatorische Signal weiterleitet. Dabei wird von der T-Zelle gleichzeitig ein weiterer Rezeptor, CTLA-4, hochreguliert, der mit höherer Affinität an B7 bindet, aber der T-Zelle ein negatives Signal liefert. Dadurch wird eine Kontrollfunktion ausgeübt und die T-Zellantwort begrenzt (Lenschow et al., 1996; Thompson und Allison, 1997). Zusätzlich sind noch eine Reihe andere Kostimulatorische Moleküle an der T-Zellaktivierung beteiligt (Van Seventer et al., 1991).

CD8⁺-T-Zellen erkennen üblicherweise neun bis zehn Aminosäuren lange Peptide im Kontext von MHC Klasse I-Molekülen, sie sind verantwortlich für die Eliminierung virusinfizierter oder entarteter Zellen und töten durch direkten Zell-Zell-Kontakt: Entweder schütten sie, während sie an die Zielzelle gebunden sind, Perforin und Granzym aus, wodurch über den Kalziumstrom durch die so entstehenden Poren und das Granzym Apoptose induziert wird, oder sie lösen direkt Apoptose durch die Bindung des Fas-Liganden auf der Oberfläche der T-Zelle an das Fas-Molekül auf der Oberfläche der Zielzelle aus. Die CD8⁺-T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet (Janeway, 2002; Sprent und Surh, 2002).

Die zweite Klasse von T-Zellen exprimiert CD4, einen Korezeptor, der die Bindung des TCR an MHC-II-Moleküle vermittelt. MHC-II-Moleküle finden sich nicht auf allen Körper-

zellen, sondern nur auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen wie DC, Makrophagen, B-Zellen und Thymus-Epithelzellen (TEZ). Sie binden Peptide, die mit 13 bis 15 AS länger sind als die, die von MHC Klasse I-Molekülen gebunden werden. CD4⁺-T-Zellen sind in der Regel nicht zytotoxisch. Sie unterstützen stattdessen die humorale und zelluläre Immunantwort (T-Helfer-Zellen). Dabei werden sie wiederum in zwei Klassen unterteilt. Die Th1-Zellen schütten nach Aktivierung inflammatorische Zytokine wie INF- γ , TNF- β und IL-2 aus, wodurch Makrophagen aktiviert werden. Sie können auch andere T-Zellen zur Proliferation bringen und Zielzellen induzieren, die MHC-Expression hochzuregulieren. Th2-Zellen steuern die humorale Immunantwort, indem sie Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-10 ausschütten, die B-Zellen stimulieren können. Welcher Zweig der Th-Antwort favorisiert wird, hängt von der Antigenart, der Art des Antigenpräsentierenden Zelle und der lokalen Zytokinbalance ab. Dabei spielen auch die Zytokine eine Rolle, die von den Th-Zellen selbst sezerniert werden: IL-10 supprimiert die Aktivität der Th1-Zellen, IL-4 stimuliert Th2-Zellen, während IFN- γ sie suprimiert (Glimcher und Murphy, 2000; Murphy und Reiner, 2002).

Wenn das Pathogen eliminiert ist, sterben die meisten der spezifischen Effektor T-Zellen in einem Prozess, der aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) genannt wird. Der Mechanismus des AICD ist noch unklar, scheint aber nicht mit der Expression von CTLA-4, Fas, TNFR, Bcl-2 oder Bcl-XL zusammenzuhängen, es gibt Hinweise, dass IFN- γ beteiligt ist (Russell, 1995). Der überlebende Teil der spezifischen Zellen zirkuliert nun vor allem durch die peripheren Organe, d.h. Leber, Lunge, Nieren und Darm, aber auch durch Thymus und Knochenmark, wo er das sogenannte T-Zellgedächtnis bildet. Darunter versteht man die Fähigkeit der T-Zellen, schneller und effektiver auf Krankheitserreger reagieren zu können, denen es zuvor bereits begegnet ist (Dutton et al., 1998; Sprent und Surh, 2002).

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen sind Gedächtnis T-Zellen sofort nach Antigenkontakt ohne Kostimulation fähig, Effektormoleküle zu sekretieren. Dabei haben naive, Effektor und Gedächtnis T-Zellen den gleichen Aktivierungsschwellenwert, jedoch ist die Kinetik unterschiedlich (Janeway, 2002). Gedächtnis T-Zellen regulieren bei erneutem Antigenkontakt ihren TCR schneller und in höherem Maße nach unten, werden größer und teilen sich schneller als naive T-Zellen. Zusätzlich unterscheiden sie sich in einer ganzen Reihe von Oberflächenmarkern von naiven T-Zellen, haben aber viele Oberflächenmarker mit Effektor T-Zellen gemeinsam und können daher phänotypisch nur durch die von ihnen exprimierte

Markerkombination zugeordnet werden. Allgemein sind naive T-Zellen charakterisiert als CD62L^{hi}, CD45RB^{hi} und CD44^{lo}, während man die Gedächtnis T-Zellen durch die gegensätzliche Markerkombination identifizieren kann: CD62^{lo}, CD45RB^{lo} und CD44^{hi}. Diese Marker weisen auch auf aktivierte T-Zellen hin, die allerdings zusätzlich mittels der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 von den Gedächtnis T-Zellen unterschieden werden können. Somit gehören die zirkulierenden, ruhenden Gedächtnis T-Zellen zu den CD25⁻, CD69⁻, CD44^{hi}, CD45RB^{lo}, CD62^{lo} T-Zellpopulationen (Dutton et al., 1998; Sprent und Surh, 2002).

1.4 Der Transkriptionsfaktor Gfi1

Gfi1 ist ein nukleäres Zink-Finger Protein, das sich in sog. nuclear dots anreichert (Rödel et al., 2000) und vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Gfi1 wurde unabhängig voneinander in zwei verschiedenen Ansätzen Anfang der 90er Jahre entdeckt. In beiden Fällen wurde die Methode der Insertionsmutagenese mit dem Retrovirus vom Moloney Typ (MoMuLV, Moloney Murine Leukemia Virus) verwandt. In einem Fall wurde auf der Suche nach Genen, die in T-Zellen bei Überexpression eine Wachstumsfaktorunabhängigkeit hervorrufen, eine IL-2 abhängige Ratten T-Zelllinie mit dem Retrovirus infiziert und unter IL-2 Entzug selektioniert (Gilks et al., 1993). Die Untersuchung des resultierenden Klones führte zur Identifizierung des neuen Integrationsortes der als Gfi1 (engl. „growth factor independence-1“) bezeichnet wurde.

In der Arbeitsgruppe von Prof. T. Möröy wurde Gfi1 durch Insertionsmutagenese mit dem MoMuLV in transgenen Mäusen gefunden (Zörnig et al., 1996). Hierzu wurden L-Myc/Pim-1 doppeltransgene Tiere für die Infektion mit dem MoMuLV verwendet. Die lebensfähigen L-Myc/Pim-1 Mäuse entwickelten mit einer Latenzzeit von drei Monaten mit 100 % Inzidenz klonale Tumore (Möröy et al., 1991). Diese Latenzzeit erlaubte es, mit Hilfe der MoMuLV-Insertionsmutagenese weitere kooperierende Onkogene zu identifizieren. Die Analyse der klonalen Tumore und der Integrationstelle zeigte, dass neben dem bereits bekannten *pal-1* Locus ebenfalls das benachbarte Gfi1 Gen infolge der Virusintegration aktiviert wurde (Zörnig et al., 1996). Weiterführende Untersuchungen aller Tumore ergaben, dass in über 60 % der Tumore der Gfi1 Locus aktiviert vorlag, somit ein potentielles

Onkogen darstellt und sehr stark mit den Onkoproteinen der Myc Familie oder Pim-1 in der Tumorgenese kooperiert (Zörnig et al., 1996; Scheijen et al., 1997; Schmidt et al., 1998a).

Die nähere Charakterisierung der Gfi1 cDNA zeigte, dass sie für ein 55 kD großes Zinkfingerprotein des Typs C₂H₂ kodiert. Strukturell lassen sich drei Regionen ausmachen: Im N-terminalen Bereich eine konservierte Domäne mit Homologien zur Familie der snail/slug Proteine von transkriptionellen Repressoren, eine nicht näher charakterisierte mittlere Domäne und die sechs Zinkfinger am C-terminalen Ende (Zörnig et al., 1996; Grimes et al., 1996a). Biochemische Analysen bestätigten, dass Gfi1 sequenzspezifisch an DNA bindet und als positionsunabhängiger transkriptioneller Repressor die Expression von Zielgenen reguliert (Zweidler-McKay et al., 1996; Grimes et al., 1996a).

Sequenzvergleiche von Gfi1 und dem homologen Faktor Gfi1b zeigte, dass sie zur Familie der SNAG-Proteine gehören, wie auch die Proteine Snail und Slug (Grimes et al., 1996a; Fuchs et al., 1997; Rödel et al., 1998). Allen Familienmitgliedern gemeinsam ist die C-terminale Zinkfinger-Domäne und die charakteristische, stark konservierte 20 Aminosäuren große N-terminale SNAG-Domäne. Das Gfi1 Gen ist beim Menschen auf Chromosom 1p22 und bei der Maus in einem syntenen Bereich auf Chromosom 5 lokalisiert (Bell et al., 1995; Roberts und Cowell, 1997; Chelsea et al., 2000). Das homologe Protein Gfi1b ist auf dem menschlichen Chromosom 9q34.13 und auf dem Maus-Chromosom 2 lokalisiert (Rödel et al., 1998; Tong et al., 1998). Gfi1 und Gfi1b sind zu 97 % homolog in der Zinkfinger-Domäne und zu 95 % identisch in ihren SNAG-Domänen. Dieser Sequenzabschnitt ist wahrscheinlich für die Eigenschaft der Gfi Proteine als transkriptionelle Repressoren und für die nukleäre Lokalisation verantwortlich (Grimes et al., 1996; Rödel et al., 1998). Auch binden beide Transkriptionsfaktoren virtuell an die gleiche DNA Konsensus-Sequenz.

Die höchste Expression von Gfi1 wird in T-Zellen des Thymus und in aktivierten peripheren T-Zellen gefunden (Gilks et al., 1993; Zörnig et al., 1996; Schmidt et al., 1998a, b; Karsunsky et al., 2002a und 2002b). Der Befund, dass Gfi1 in allen untersuchten T-Zelltumorklinen und in HTLV1 transformierten Zellen exprimiert ist (Sakai et al., 2001 und Arbeiten aus der Gruppe von Prof. T. Möröy), deutet auf eine Rolle dieses Proteins bei der malignen Transformation von T-Zellen hin. Tatsächlich entwickeln transgene Mäuse, die Gfi1 konstitutiv in T-Zellen exprimieren auch T-Zell Lymphome, allerdings mit langer Latenzzeit und geringer Inzidenz (Zörnig et al., 1996; Schmidt et al., 1998a, b). Bisher ist nicht bekannt, wie Gfi1

bei der malignen Transformation eingreifen kann. Frühere Arbeiten zeigten, dass eine hohe Expressionsniveau von Gfi1 T-Zellen unabhängig von IL-2 machen kann (Gilks et al., 1993, Zörnig et al., 1996). Neuere Arbeiten aus dem Labor von Prof. W. E. Paul (NIH, USA) zeigen, dass Gfi1 für die Expansion von Th2 Effektor-Zellen, einer Untergruppe von T-Helfer Zellen, verantwortlich ist, und hier mit den Transkriptionsfaktor GATA3 kooperiert (Zhou et al., 2002).

Die Bedeutung von Gfi1 in der T-Zellentwicklung wurde deutlich durch Studien an transgenen Mäusen und Zellkulturen (Schmidt et al., 1998a, b; Scheijen et al., 1997). Protein und RNA Analysen zeigten, dass Gfi1 während der T-Zelldifferenzierung, beginnend in der frühen T-Zell Phase β -Selektion bis zu Ausprägung der CD4/CD8 Einzelpositiven Populationen, exprimiert wird (Schmidt et al., 1998b). Weitere Hinweise für die Rolle von Gfi1 in der frühen T-Zellentwicklung wurden aus Untersuchungen an lck-Gfi1 transgenen Mäusen geliefert, die einen Block in der β -Selektion durch einen reduzierten Anteil der L-Zellen zeigen und somit auch wenige reife CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aufwiesen (Schmidt et al., 1998b). Diese Ergebnisse über die Rolle von Gfi1 in den T-Zellen werden durch Arbeiten an Gfi1 defizienten Mäusen in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Möröy belegt (Karsunky et al., 2002a; Holger Karsunky, Doktorarbeit). Der Verlust von Gfi1 führt bei den Tieren zu drastischer Schrumpfung des Thymus, auf etwa 10 % der normalen Größe. Diese dezimierte Zellzahl ist vor allem auf eine erhöhte Apoptoserate und auf einen Differenzierungsblock in den frühen c-Kit⁺/DN-Populationen des Thymus von Gfi1 defizienten Mäusen zurückzuführen (Holger Karsunky, Doktorarbeit). Weiter konnte festgestellt werden, dass die DN3 Subpopulation, die der β -Selektion unterliegt, bei Gfi1^{-/-} Mäusen verändert war. Während die Überexpression von Gfi1 den Durchtritt der E-Zellen durch diese Selektion blockiert, beschleunigt der Verlust von Gfi1 diesen Vorgang der β -Selektion, ohne jedoch eine höhere Proliferationsrate der β -selektierten Zellen zu bewirken. Ein weiterer wichtiger Befund aus den Gfi1-KO Mäusen ist die prozentual vermehrte CD8 Einzelpositive Zellpopulation (Schmidt et al., 1998b; Holger Karsunky, Doktorarbeit).

Gfi1-KO Mäuse zeigen nicht nur einen Defekt in der T-Zelldifferenzierung, sondern haben auch einen dramatischen Phänotyp in der Determinierung der Myeloiden-Zellen (Karsunky et al., 2002a; Hock et al., 2003). Die ersten Untersuchungen in der Gruppe von Prof. T. Möröy an Gfi1-KO Mäusen zeigte eine massive Neutropenie, d.h. Abwesenheit reifer Granulozyten und eine Akkumulation von unreifen monozytären Blasten. Die Stimulierung mit dem

für die Granulozyten-Reifung verantwortlichen Zytokin G-CSF lieferte den Befund, dass Knochenmark-Vorläuferzellen aus dem Gfi1-KO Mäusen nicht in der Lage sind, in Granulozyten zu differenzieren (Karsunky et al., 2002a). Kürzlich wurde die Beobachtung im Maussystem durch Daten von Neutropenie-Patienten, die Aminosäure Mutationen in der Gfi1 aufwiesen, belegt (Person et al., 2003). Zwei unabhängige, heterozygote Mutationen wurden in der Zinkfinger-Domäne von Gfi1 gefunden, wobei die eine Mutation zu einer Beeinträchtigung der DNA-Bindung führte, die zweite keinen Einfluss auf die DNA-Bindung hatte (Person et al., 2003). Diese Befunde weisen auf eine neue, bisher völlig unbekannt Funktion von Gfi1 hin.

Um weitere Einsichten in die biochemischen Wirkmechanismen von Gfi1 zu gewinnen, wurden, in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Möröy über einen Hefe Interaktions-Klonierungsverfahren (2-Hybrid System) Bindungspartner von Gfi1 isoliert (Rödel et al., 2000). Einer dieser Bindungspartner ist das Protein PIAS3 (engl. „protein inhibitor of signal transducers and activators of transcription“ (STAT)), das ursprünglich als ein negativer Regulator des STAT3 Faktors und damit des Interleukin-6 Signalweges, angesehen wurde. Gfi1 kann diese negative Wirkung von PIAS3 auf STAT3 teilweise aufheben. Dies führt dazu, dass in Zellen, die mit IL-6 stimuliert werden und dieses Signal über phosphoryliertes STAT3 weiterleiten, die durch STAT3 aktivierten Zielgene stärker transkribiert werden. Rödel et al. konnten dies sowohl in Reporterassays mit STAT3 abhängigen Zielgenpromotoren zeigen, als auch mit primären T-Zellen aus CD2-Gfi1 transgenen Mäusen (Rödel et al., 2000). T-Zellen aus CD2-Gfi1 transgenen Mäusen proliferierten nach IL-6 Behandlung rascher als wild-Typ Vergleichszellen ohne CD2-Gfi1 Transgen (Rödel et al., 2000). Diese Daten belegen die Rolle von Gfi1 in Zytokin abhängigen Signalwegen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Daten zur Rolle, Funktion und zur Regulation des Zinkfingerproteins Gfi1 in T-Lymphozyten zu erheben. Vorarbeiten aus der Gruppe von Prof. T. Möröy ließen vermuten, dass Gfi1 an der Regulation von zwei wesentlichen Reifungsschritten in der Entwicklung von T-Zellen beteiligt ist. Die Expression dieses transkriptionell aktiven Faktors während der frühen Reifungsprozesse im Thymus und in reifen T-Zellen nach Antigenstimulation, nicht aber in reifen, unstimulierten T-Zellen, ließ

auf eine Funktion bei diesen Prozessen schließen. Nähere Einblicke in die physiologische Funktion von Gfi1 ergab die Analyse von transgenen bzw. gendefizienten Mäusen in der Gruppe von Prof. T. Möröy.

Zur Analyse der Regulation und zur Bestimmung des Expressionsmusters eines Proteins *in vivo* sollte ein weiteres Mausmodell, das knock-in (KI) Modell, generiert werden. Hierbei wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) in den Leserahmen des zu untersuchenden Gens eingefügt. Diese Methode sollte verwendet werden, um einen Teil des Gfi1 Gens zu deletieren, ohne die regulatorische Elemente, wie den Promoterbereich und das letzte Exon mit dem Polyadenylierungssignal zu zerstören. Es war beabsichtigt, mit dieser Mausmutante, Gfi1 Expression in primären Zellen unter normalen oder experimentell veränderten Bedingungen direkt und quantitativ mittels Durchflusszytometrie zu messen.

Vorangiges Ziel der Arbeit war daher eine Gfi1:GFP knock-in Maus herzustellen. Desweiteren sollte, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, an isolierten T-Zellen Untersuchungen zur Regulation, Proliferation, Apoptose und Signaltransduktion durchgeführt werden.

Ein zweiter Themenkomplex sollte die Frage betreffen, welche Rolle und Funktion Gfi1 während der T-Zelldifferenzierung im Thymus spielt. Zur Aufklärung bzw. zur Analyse dieser Fragestellung wurden die von Karsunky et al. (2002a) hergestellten Gfi1^{-/-} Tiere verwendet. Als nächstes sollte die Auswirkung des Gfi1 Verlustes auf die Expressionen von Genen in den Thymozyten der Gfi1^{-/-} Tiere mit Hilfe von Oligonukleotid-Genchips analysiert werden, die somit zur Identifizierung von Gfi1 Zielgenen führen sollte.

2. Material und Methoden

Einzelheiten zu den nicht näher beschriebenen Standardmethoden sowie Zusammensetzung gängiger Puffer und Lösungen finden sich in Sambrook et al., (1989) sowie in Current Protocols in Immunology, wenn nicht auf andere Literaturquellen verwiesen wurde. Des weiteren wird auf die Datenblätter der im Text genannten Hersteller verwiesen. Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, kommerziell bezogen.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Enzyme von den Firmen Invitrogen, Life Technologies, Merck Eurolab, New England Biolabs, Roche, Roth und Sigma bezogen. Radioaktiv markierte Substanzen wurden von Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen Life Technologies und MWG Biotech synthetisiert.

2.1.2 Häufig verwendete Lösungen

Bei Prozentangaben wird im Folgenden auf die Angabe (w/v) und (v/v) verzichtet. Beim Mischen von Flüssigkeiten wurden immer Volumenprozent verwendet (einzige Ausnahme: Glycerol); wurden Feststoffe zu Lösungen gegeben, erfolgte die Berechnung stets in Gewichtsprozent.

Acrylamidlösung	38	%	Acrylamid
	2	%	N,N'-Methylenbisacrylamid
100x Denhardts:	2	%	Ficoll 400
	2	%	BSA
	2	%	Polyvinylpyrrolidon
Ethidiumbromidlösung	10	mg/ml	Ethidiumbromid (EtBr) in TE

50x MOPS		1	M	MOPS	
		250	mM	Natriumacetat	
		5	mM	EDTA	
PBS		137	mM	NaCl	
		2,6	mM	KCL	
		6,5	mM	Na ₂ HPO ₄	
		1,5	mM	KH ₂ PO ₄	
Proteaseinhibitoren 1000x:	a)	1	mg/ml	Aprotinin	
		1	mg/ml	E64	
		1	M	Na ₃ VO ₄	
		1	M	Na ₂ MoO ₄	
	b)	1	mg/ml	Bestatin	
		1	mg/ml	Pepstatin	
		100	mg/ml	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	
				in 20 % DMSO/80 % Methanol (v/v)	
	4x SDS-Probenpuffer		62	mM	Tris-HCl, pH 6,8
			2	%	SDS
		10	%	Glycerin	
		5	%	β-Merkaptoethanol	
		0,025	%	Bromphenolblau	
20x SSC		3	M	NaCl	
		0,3	M	Natriumcitrat	
TAE		40	mM	Tris-Acetat, pH 7,8	
		2	mM	EDTA	

TBE	90	mM	Tris-Acetat, pH 7,8
	10	mM	Borsäure
	1	mM	EDTA
TE	10	mM	Tris-HCl, pH 7,9
	1	mM	EDTA
WCE-Puffer	50	mM	Hepes
	20	mM	NaF
	450	mM	NaCl
	0,2	mM	EDTA
	1	%	Nonidet-P40
	25	%	Glyzerol
6xDNA-Puffer	50	%	Glycerol
	0,02	%	Bromphenolblau
	0,04	%	Xylencyanol
	1	mM	EDTA
Ampicillin (1000x)	80	mg/ml	
Kanamycin (1000x)	25	mg/ml	
LB-Medium	10	g/l	NaCl
	10	g/l	Caseinhydrolysat
	5	g/l	Hefe-Extrakt
	pH 7,2 mit NaOH einstellen		
LB-Agar	15	g/l	Bacto-Agar in LB-Medium

2.1.3 Verwendete DNA-Sonden

Gfi1	0,8 kb EcoRI/SacI genomisches Fragment	R.Yücel, diese Arbeit
LKLF	EST-Klone, EcoRI/NotI cDNA Fragment	RZPD, Berlin
TRAF5	EST-Klone, EcoRI/NotI cDNA Fragment	RZPD, Berlin
Id1-(RY1)	PCR-fragment	R.Yücel, diese Arbeit
Id2-(RY2)	PCR-fragment	R.Yücel, diese Arbeit

2.1.4 Verwendete Oligodesoxynukleotide

Die benutzten Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

Id1-(RY1) sense	5'-GAACGCCTCTCCCCTCCTTGTCC-3'
Id1-(RY1) antisense	5'-CGGTGGCTGCGGTAGTGTCTTTC-3'
Id2-(RY2) sense	5'-AGGATGATCGTCTTGCCCAGGTGT-3'
Id2-(RY2) antisense	5'-GCATTCAGTAGGCTCGTGTCAAAA-3'
Id1 sense	5'-TCAGGATCATGAAGGTCGCCAGTG-3'
Id1 antisense	5'-TGAAGGGCTGGAGTCCATCTGGT-3'
Id2 sense	5'-TCTGAGCTTATGTCTGAATGATAGC-3'
Id2 antisense	5'-CACAGCATTTCAGTAGGCTCGTGTC-3'
β -actin sense	5'-TCCTGTGGCATCCATGAAACT-3'
β -actin antisense	5'-GAAGCACTTGCGGTGCACGAT-3'
5'Gfi1-I	5'-CCCGAGGCGCAGGTTTCTT-3'
3'Gfi1-I	5'-TTTGCGCAAGGGGTCAGGA-3'
5'Gfi1-II	5'-CATTGTCAGGTGCGTGGCGAAAGA-3'
3'Gfi1-II	5'-CTATTGATGGCAGGGCGGGGAGAG-3'

5'Gfi1-III	5'-GCTTCGTTGGGCGTATTTATCCTC-3'
3'Gfi1-III	5'-CCAGCCCCATCCCCAGT-3'
5'CTLA4-I	5'-CATTAGTATCTTGTGCGCCTTTGA-3'
3'CTLA4-I	5'-CATGGCCATCCCTCTTAGTCC-3'

2.1.5 Verwendete Antikörper

Durchflußzytometrie

(Anti-Maus Antikörper, Becton-Dickinson (BD), Caltag und eBioscience)

Bezeichnung	Markierung	Subtyp
CD3	Biotin, APC	Hamster IgG
CD4	Biotin, PE, APC, PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2a
CD8 α	Biotin, FITC, APC, PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2a
CD25 (II-2R α)	FITC, PE, APC	Ratte IgG1
CD44	FITC, APC, PE	Ratte IgG2b
CD43	Biotin, PE	Ratte IgG2a
CD117 (c-Kit)	FITC, PE, APC	Ratte IgG2b
CD62L	APC	Ratte IgG2a
CD69	FITC, PE	Ratte IgG1
CD45R (B220)	Biotin, PE, APC	Ratte IgG2a
CD90 (Thy1.2)	PE, APC	Maus IgG2b
α -TCR β	PE, APC	Hamster IgG
CD11b	Biotin	Ratte IgG2b
CD49b/Pan-NK	Biotin	Ratte IgM
Ter-119	Biotin	Ratte IgG2b
Ly-6G (Gr-1)	Biotin	Ratte IgG2b
CD16/CD32 (Fc γ III/II)	Fc γ -Block	Ratte IgG2b
T3.70 (α -HY-TCR)	Biotin; Philippe Poussier, Toronto/Kanada	Maus IgG1
CD127 (α -IL-7R α)	PE	Ratte IgG2a
α -BrdU (3D4)	FITC	Maus IgG1

Immunoblot Verfahren

Bezeichnung	Beschreibung/Verwendung	Herkunft
Gfi1	polyklonales Kaninchen Serum (IgG) gegen murines Gfi- 1 Protein	Schmidt et al., 1998
GFP	FITC-Konjugat	Santa-Cruz
Anti-Kaninchen	Peroxidase - gekoppelter Sekundär- antikörper gegen primäre Kaninchen Antikörper des Typs IgG	Fa. Dianova
Anti-Maus	Peroxidase - gekoppelter Sekundär- antikörper gegen primäre monoklonale Maus-Antikörper des Typs IgG	Fa. Dianova
Anti-Ziege	Peroxidase - gekoppelter Sekundär- antikörper gegen primäre monoklonale Ziegen-Antikörper des Typs IgG	Fa. Dianova
Streptavidin-Konjugate	FITC, PE, APC, PerCP-Cy5.5 gegen biotinylierte FACS-Antikörper	Caltag und BD

2.2 Organismen

2.2.1 Verwendeter Bakterienstamm

DH5 α : *supE44, hsdR17, recA, Δ lacU169, (ϕ 80lacZ Δ M15), endA1, gyrA96, thi-1, relA1*

Langsam wachsender *recA*⁻ Stamm, der sich für die Transformation und die Vermehrung von Plasmiden eignet.

2.2.2 Mäusestämme

Für Verpaarungen wurden C57BL/6 Mäuse verwendet, zur *cre*-Deletion Cre-Deleter-Mäuse des Mausstammes C57BL/6. Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten.

2.3 Bakterien-Kultur

2.3.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

SOB-Medium:	20	g/l	Trypton,
	5	g/l	Hefe-Extrakt,
	0,5	g/l	NaCl,
	0,19	g/l	KCl,

pH 7,0, autoklaviert, vor der Benutzung: 5 ml MgCl₂·2H₂O (2 M, steril)

TB-Puffer	10	mM	Pipes
	15	mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
	0,25	mM	KCl
	pH 6,8	mit	KOH
	55	mM	MnCl ₂ ·2H ₂ O
			sterilfiltriert

Zur Herstellung bzw. zur Steigerung der Kompetenz von *E. coli*-Zellen wurde die von Inoue et al. (1990) beschriebene Methode verwendet. Die Bearbeitung der Zellen erfolgte auf Eis.

250 ml SOB-Medium in einem 2 l-Erlenmeyerkolben wurden mit *E. coli*-Kolonien angeimpft und bei 18 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Der Kolben wurde dann für 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Kultur 10 Minuten

bei 6000 Upm, 4 °C abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 80 ml TB-Puffer (Eis gekühlt) resuspendiert. Die Suspension wurde erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch 10 Minuten Zentrifugation bei 6000 Upm und 4 °C wurden die Zellen geerntet und anschließend in 20 ml TB resuspendiert. Danach wurde der Suspension DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben, vorsichtig gemischt und erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann auf Eis in 200 – 500 µl-Aliquots in Eppendorfgefäße aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70 °C gelagert.

2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden je 100 µl tiefgefrorener kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und für 20 Minuten in Eiswasser inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden wurden die Zellen sofort wieder in das Eisbad transferiert. Zur Regeneration wurden die Zellen in 800 µl LB-Medium 60 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und dann auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikum-Zusätzen bei 37 °C über Nacht selektioniert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Rechnergestützte Sequenzanalyse

Für die Herstellung genspezifischer Primer, für Sequenzvergleiche, Umschreibung von DNA in Protein oder die Erstellung von Restriktionskarten wurde das Programm „Lasergene DNASTAR“ und „Clone Manager 5“ (Scientific & Educational Software)“ verwendet. Das Programm „MatInspector“ (<http://genomax.gsf.de>) ermöglicht eine definierte DNA-Sequenz auf potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Das Programm greift auf eine Datenbank zurück, in der Konsensus-Bindesequenzen (core-Matrix) für bekannte Transkriptionsfaktoren gespeichert sind und gibt die Kernsequenz-Ähnlichkeit in Prozent an.

2.4.2 DNA-/RNA-Technik

2.4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dazu wurden die Nukleinsäuren in der Regel 1:250 in Wasser verdünnt.

Dabei entsprechen:

- 1 OD₂₆₀ = 50 µg /ml für doppelsträngige DNA
- 1 OD₂₆₀ = 40 µg /ml für einzelsträngige DNA oder RNA

2.4.2.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA („Maxipräp“)

Antibiotikaresistente Einzelkolonien wurden gepickt und in 2 ml Antibiotikumhaltiges LB-Medium gegeben. Nachdem die Vorkultur dicht gewachsen war, wurden damit 500 ml LB-Medium in einem 2 l-Kolben beimpft und über Nacht in einen Bakterienschüttler bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des „Maxipräp Kits“ der Firma Qiagen.

2.4.2.3 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“)

Puffer 1 (P1):	50	mM	Tris/HCl pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNase A
Puffer 2 (P2)	0,2	M	NaOH
	1	%	SDS
Puffer 3 (P3):	3	M	Kaliumacetat
			pH 5,5 einstellen mit Essigsäure

3 ml Antibiotikumhaltiges Medium wurden mit einer Kolonie Bakterien beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die dicht gewachsenen Bakterien wurden 2 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl P1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse durch Zugabe von 150 µl P2 und 10 minütiger Inkubation bei RT. Schließlich wurde die Lösung mit 150 µl P3 neutralisiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit wurde der Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und nochmals 15 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und dann in 50 µl TE aufgelöst.

2.4.2.4 Isolierung von genomischer DNA

ES-Zellen wurden in 750 µl Lysispuffer aufgenommen, über Nacht bei 56 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (Mikrofuge, 15 Minuten, 13000 Upm). Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt, die präzipitierte DNA wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und in 50 µl TE aufgenommen. Die Lagerung von genomischer DNA erfolgte bei 4 °C.

MMTB-Puffer	100	mM	NaCl
	80	mM	EDTA pH 8,0
	50	mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,2	%	SDS
Lysispuffer	750	µl	MMTB-Puffer
	35	µl	Proteinase K (10 mg/ml)

2.4.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Restriktionsverdaute DNA wurde in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-2,0 %ige Gele in TAE-Puffer mit 0,01 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Gele wurden mit 0,1-3,0 µg DNA in DNA-Auftragepuffer beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 100-160 V mit TAE als Laufpuffer. Mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids konnte diese DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm sichtbar gemacht werden. Genomische DNA wurde über Nacht bei 26 V aufgetrennt.

2.4.2.6 Restriktionsendonukleaseverdau

Zu analytischen Zwecken wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in 15 µl Gesamtvolumen für 1 Stunde bei der entsprechenden Temperatur, in der Regel 37 °C, verdaut. Für präparative Zwecke wurden 5-10 µg Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz 2 Stunden verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab des Verdaus angepaßt, war jedoch nie größer als 10 % des Gesamtvolumens. Somit wurde sichergestellt, daß die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wurde.

2.4.2.7 Konversion überhängender DNA-Enden

Da es in einigen Fällen nicht möglich war, den Vektor und das DNA-Fragment (Insert) mit komplementären, überhängenden Enden zu generieren, mussten Enden ohne Überhang erzeugt werden. Dabei wurden 5'-Überhänge durch eine Auffüllreaktion, 3'-Überhänge durch eine Abbaureaktion konvertiert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau aufgereinigt und in 86 µl Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl T4-DNA-Polymerase-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl BSA (5 mg/ml) und 2 µl T4-DNA-Polymerase (3 U/µl, New England Biolabs) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 12 °C und dann für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, aufgereinigt und anschließend zur Ligation eingesetzt.

2.4.2.8 Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA

Um eine Religation des Vektors und damit den nichtrekombinanten Hintergrund zu verringern, wurde der zur Religation notwendige 5'-Phosphatrest des Vektors hydrolytisch abgespalten. Dazu wurde der Restriktionsansatz 15 Minuten vor Beendigung des Verdau mit 0,5 µl Alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (CIP, 10 U/µl, New England Biolabs) versetzt. Im Anschluß daran wurde die Vektor-DNA vom Enzym mit Hilfe eines Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt.

2.4.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus Agarosegelen ausgeschnitten. Zur Aufreinigung aus dem Gel wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Wenn PCR-Produkte und von Restriktionsendonukleasen verdaute DNA nicht durch Gelelektrophorese von anderen DNA-Fragmenten getrennt werden mußten, wurde der PCR-Purification Kit der Firma Qiagen zur Aufreinigung verwendet.

2.4.2.10 Ligation

In 10 µl 1xLigationspuffer (Takara) wurden 20 - 50 ng Vektor-DNA mit drei Äquivalenten DNA-Fragment versetzt. Der Ansatz wurde in Gegenwart von 0,5 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl, Takara) 15 Minuten bei RT oder über Nacht 4 °C inkubiert.

2.4.2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Erzeugung von definierten DNA-Fragmenten zur Klonierung oder zur Amplifikation von revers transkribierter RNA (RT-PCR) wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Der 50 µl Ansatz enthielt 50 ng Plasmid-DNA (bzw. 2 µl aus dem Ansatz einer Reversen Transkription), je 10 pmol eines 5'- und eines 3'-Oligodesoxynukleotides (Primer), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 µl PCR-Puffer und 1 U Taq-Polymerase. Der Ansatz wurde auf 95 °C erhitzt und nach 2 Minuten bei 95 °C wurde folgendes Programm mit 30-35 Zyklen gestartet:

Denaturierung	15 Sekunden 95 °C
Primer-Anlagerung	20 Sekunden 55-65 °C (je nach Primer)
Taq-Polymerase-Reaktion	60 Sekunden 72 °C (ca. 1 Minute/1000 nt Produkt)

Nach dem letzten Zyklus wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten bei 72 °C inkubiert. Je 5 µl eines Ansatzes wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.4.2.12 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die für die Hybridisierungstechniken verwendeten radioaktiv markierten Sonden wurden unter Verwendung der Megaprime Labeling Kits (Fa. Amersham) hergestellt. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden 50 ng des zu markierenden Fragmentes, 50 µCi α -³²P-dCTP und 5 U Klenow-Fragment eingesetzt, und der Ansatz 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute freie Nukleotide wurden unter Verwendung des Nucleotide Removal-Kits der Fa. Qiagen nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Vor Einsatz der radioaktiv markierten Sonden wurden diese für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

2.4.2.13 Transfer von DNA (Southern Blot)

DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten in 0,25 M HCl depurinieren und danach in 0,4 M NaOH neutralisiert (20 Minuten). Zum Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Blotting-Nylon Membran, Fluka) wurde die Methode des Schwerkraft-Alkali-Transfers verwendet. Durch UV-Vernetzung wurde die DNA in einem Stratalinker (Fa. Stratagene) bei 120 mJ kovalent an die Membran gebunden.

2.4.2.14 Isolierung von RNA

Das Arbeiten mit RNA erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor RNase-Kontaminationen. Deshalb wurden ausschließlich autoklavierte oder für mindestens 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisierte Geräte verwendet. Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, welches zuvor mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt worden war (0,1 % DEPC, mehrere Stunden bei RT gerührt, autoklaviert).

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µg der RNA im Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht beurteilt. Die gewonnene RNA wurde photometrisch vermessen und bei -80 °C zur Lagerung weggefroren.

2.4.2.15 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 4,5 µg Gesamt-RNA mit 3,3 µl Erststrangpuffer (Life Technologies) und 0,5 µl DNaseI (Roche) in 25 µl Volumen für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,8 µl EDTA (75 mM) gestoppt. Nach Zugabe von 2 µl Zufallshexanukleotid (200 ng/µl, Roche) wurde dieser Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und dann auf 4 °C abgekühlt. Je 12,5 µl des Reaktionsansatzes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 µl Erststrangpuffer, 0,5 µl MgCl₂ (56 mM), 2,0 µl DTT (100 mM), 0,5 µl RNasin (30 U/µl, Promega) und 1 µl dNTP-Mix gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 37 °C wurde einem der beiden identischen Ansätze 1 µl SuperscriptTMII RT (200 U/µl, Life Technologies) zugefügt, beide Ansätze wurden ansonsten gleich behandelt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 49 °C wurde die Reverse Transkriptase durch eine 15 minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Anschließend wurde 1 µl RNase H (2 U/µl, Takara) zugesetzt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert um die RNA aus dem Ansatz zu entfernen.

2.4.2.16 Auftrennung von RNA

Für die elektrophoretische Auftrennung von RNA fanden denaturierende Formaldehydgele Verwendung (Lehrach, 1977). Dazu wurden 1,5 g Agarose und 120 ml DEPC-behandeltes in einem Erlenmeyerkolben aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Danach wurden 26 ml 37 % Formaldehyd-Lösung und 3 ml 50x MOPS hinzugefügt und das Gel in einen waagerechten Schlitten gegossen. Von der aufzutragenden RNA wurden 5-10 µg bis zu einem Volumen von unter 6 µl eingedampft, mit 20-30 µl Denaturierungspuffer versetzt und für 15 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge 6x

Probenpuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 100 V für etwa 6 h in 1x MOPS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt

Denaturierungspuffer	356	µl	37 % Formaldehyd-Lösung
	124	µl	Formamid
	22	µl	50x MOPS
	1	µl	Ethidiumbromid-Lsg.

2.4.2.17 Northern-Analyse

Kapillartransfer von RNA

Der Transfer Aufbau erfolgte nach dem „Alkali-Schwehrkraft-Blot“ Prinzip (Koetsier *et al.*, 1993). Das Formaldehydgel wurde jedoch zuvor 20 Minuten in 10x SSC äquilibriert und als Transferlösung wurde 10x SSC verwendet. Der Transfer erfolgte ausschließlich auf Hybond N⁺ Membranen (Fa. Amersham). Zur kovalenten Bindung der RNA an die Membran wurde diese in einem UV-Stratalinker (Fa. Stratagene) für 30 Sekunden mit 120 mJ/cm² kreuzvernetzt.

Hybridisierung von RNA auf Nylonmembranen

Bei der Hybridisierung wurde analog der DNA-Hybridisierung verfahren. Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde dieselbe Lösung benutzt, die Inkubationen fanden bei 65 °C statt.

Hybridisierungslösung	7	%	SDS
	1	%	BSA
	15	%	Formamid
	0,2	M	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2
	2	mM	EDTA
	1	ml	Heringssperma-DNA (10 mg/ml), denaturiert;
	ad 100 ml DEPC-H ₂ O		

2.4.2.18 Chromatin Immunopräzipitation

Mit dieser Methode können in Zellsystemen *in vivo*-Bindungen von Proteinen an genomischer Kern-DNA nachgewiesen werden. Zuerst erfolgte der DNA/Protein-Crosslink in Thymozyten aus der Wildtyp (WT) und Gfi1-KO Maus. Dafür wurden 7×10^7 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und danach durch Zugabe von 1/10 Volumen vom 11 %igen Formaldehyd fixiert. Dabei erfolgte die kovalente Bindung der interagierenden Proteine an die DNA. Die Fixierung wurde nach 1 Stunde durch Glycerin-Zugabe (Endkonzentration 0,125 M) beendet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 Upm geerntet, in kaltem PBS resuspendiert und schließlich aufeinanderfolgend je 20 Minuten zuerst mit dem Puffer A (0,25 % Triton X-100, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und zuletzt mit dem Puffer B (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) gründlich gewaschen. Danach wurde das abzentrifugierte Pellet im IP-NP40 Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 % NP-40, 3 % BSA, inklusiv Protease-Inhibitoren) resuspendiert und 5 x 15 Sekunden mit Ultraschall behandelt, um die genomische DNA in Fragmente zwischen 500-1000 bp zu zerkleinern.. Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden die sonifizierte DNA mit IP-NP40 Puffer auf 1 ml aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C mit 20 µg des entsprechenden Antikörpers (α -Gfi1, Schmidt et al., 1998) inkubiert. Die Bindung der gebildeten Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von je 100 µl Protein G-Sepharose und anschließender Inkubation für 3 Stunden bei 4 °C. Die Präzipitate wurden 6x mit je 5 ml IP-NP40 Puffer, einmal mit 5 ml Hochsalz-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM M NaCl, 1 % NP-40, 3 % BSA, 0,2 mM EDTA) und zum Schluss zweimal mit je 5 ml IP Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl) gewaschen. Die DNA/Protein-Komplexe wurden durch zweimalige Inkubation mit je 50 µl TE-Elutionspuffer (mit 1 % SDS) für 15 Minuten bei Raumtemperatur eluiert. Zum Eluat wurde DNase freie RNase A (50 µg/ml) zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden mit Proteinase K (500 µg/ml) zuerst bei 37 °C für 2 Stunden, anschließend bei 65 °C für 6 Stunden verdaut.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit je 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1). Die Ansätze wurden für eine Minute mit einem Vortex-Gerät gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Nach Zugabe von 20 µg Glykogen und 500 µl Ethanol (96 %) zur separierten oberen wässrige Phase, erfolgte die DNA-Fällung bei -20 °C über Nacht. Diese Ansätze wurden anschließend bei 14.000 Upm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet 2x mit 70 % -igen Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 50 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen und je 1-3 µl

kamen als Template in der PCR zum Einsatz. Die PCR erfolgte wie oben beschrieben. Die PCR Produkte wurden in einem 2 % -igen Agargosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.4.3 Protein-Techniken

2.4.3.1 Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten

Vor Gebrauch des WCE-Puffers wurden Proteaseinhibitoren frisch zugegeben.

Zur Isolierung von gesamtzellulären Proteinen wurden Zellen einer konfluent bewachsenen Gewebekulturschale oder Suspensionszellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Gummischabers in 1 ml PBS von der Schale abgelöst. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (Minifuge, 2 Minuten, 2000 Upm, 4 °C) und in 100 µl WCE-Puffer (inkl. Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorffzentrifuge, 10 Minuten, 14000 Upm, 4 °C). Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden nach einer Proteinbestimmung in Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.4.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältliches Farbreagenz (Bradford-Reagenz, Bio-Rad) benutzt. 2 µl der jeweiligen Probe wurden mit 800 µl Wasser und 200 µl Farbreagenz in einer Polystyrol-Einmalküvette vermischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Aus einem Leerwert und einer Verdünnungsreihe aus BSA-Standards (1 mg/ml) wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Die Auswertung erfolgte mit einem Photometer bei $\lambda = 595$ nm.

2.4.3.3 Auftrennung von Proteinen (SDS-Page)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit einem Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA für 2-3 Stunden in 1x SDS-Laufpuffer.

Tabelle 1: Zusammensetzung der denaturierenden Proteingele

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	4 %
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	–
Sammelgelpuffer	–	–	–	1,25 ml
H ₂ O	4,09 ml	3,25 ml	2,42 ml	3,03 ml
Rotiphorese® Gel 30	3,33 ml	4,17 ml	5,00 ml	0,67 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	25 µl

Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4 %	SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 %	SDS
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M	Tris-Base
	1,9 M	Glyzin
	1 %	SDS
Rotiphorese® Gel 30 (Roth)	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bisacrylamid

2.4.3.4 Protein-Transfer (Western-Blot)

Für die Immobilisierung von Proteinen auf einer Membran wurde das sogenannte „semi-dry“ Verfahren in einer Transfer-Apparatur (Fa. Keutz) angewandt. Dazu wurde auf der Anode ein Blot in nachstehender Reihenfolge aufgebaut: 3 Whatman 3MM-Papiere mit Anodenpuffer 1 angefeuchtet, 4 Whatman 3M-Papiere mit Anodenpuffer 2 angefeuchtet, eine Nitrozellulosemembran (Fa. Schleicher & Schuell) ebenfalls mit Anodenpuffer 2 angefeuchtet, das Proteingel und abschließend 5 Whatman 3M-Papiere mit Kathodenpuffer angefeuchtet. Der Transfer fand für 2 Stunden bei 1,5 mA/cm² Membran statt. Danach wurde die Membran zur Kontrolle eines homogenen Transfers und zum Markieren der

Standardbanden mit 0,2 % (w/v) Ponceau-S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure gefärbt und mit PBS wieder entfärbt.

Anodenpuffer 1 25 mM Tris-HCl
 20 % Methanol
 pH-Wert auf 10,4 einstellen

Anodenpuffer 2 300 mM Tris-HCl
 20 % Methanol
 pH-Wert auf 10,4 einstellen

Kathodenpuffer 25 mM Tris-HCl
 40 mM 6-Aminohexansäure
 20 % Methanol
 pH-Wert auf 9,4 einstellen

2.4.3.5 Immunologischer Nachweis

Vor Zugabe des primären Antikörpers wurde zur Absättigung freier unspezifischer Bindungsstellen die Membran zunächst für 30 Minuten in PBS/0,5 % Tween20/5 % Magermilchpulver geschwenkt. Hiernach wurde der Erst-Antikörper in entsprechender Verdünnung in derselben Lösung zugegeben und für 2 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/0,1 % Tween20 wurde die Membran für 2 Stunden bei RT mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Der Blot wurde nach wiederholtem Waschen mit PBS/0,1 % Tween20 in ein luminiszierenden Lösung der Fa. Amersham (ECL) gelegt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

2.5 Zellkultur-Techniken

2.5.1 Medien/Lösungen und mitogene Substanzen

anti-CD3 ϵ	100 mg/ml (Klon 2C11; Fa. Pharmingen)
anti-CD28	100 mg/ml (Klon 37.51; Fa. Pharmingen)
2-Mercaptoethanol	10 mM (Fa. Invitrogen)
Concanavalin A	1 mg/ml PBS (Fa. Sigma)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium mit 4,5 % (w/v) Glucose; pH 7,0 (Fa. Invitrogen)
ESGRO [®] -LIF	10 ⁷ Units/ml
FBS	Fötales Rinderserum (Fa. Invitrogen)
G418	100 mg/ml PBS (Fa. Invitrogen)
Ganciclovir (Cymeven)	400 mM in PBS (Fa. Syntex, Roche)
Gentamicin	10 mg/ml H ₂ O (Fa. Invitrogen)
Interleukin-2 (recombinant)	100 μ g/ml PBS/0,1 % FBS (Fa. Sigma)
L-Glutamin	200 mM L-Glutamin in PBS (Fa. Invitrogen)
Mitomycin C	1 mg/ml PBS (Fa. Sigma)
Na-Pyruvat	100 mM (Fa. Invitrogen)
nicht-essentielle Aminosäuren	100x in PBS (Fa. Invitrogen)
Penicillin/Streptomycin	10.000 U Penicillin/10.000 U Streptomycin (Fa. Invitrogen)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium; pH 7,0 (Fa. Invitrogen)
Trypsin/EDTA	1x Trypsin/EDTA (Fa. ICN)
Lipopolysaccharid-Stammlösung:	LPS aus <i>E. coli</i> , Serotyp O111:B4 wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in sterilem H ₂ O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.5.2 ES-Zellkultur

Zur Herstellung heterozygoter Gfi1:GFP knock-in Allel ES-Zellen wurde die Linie R1 verwendet, die von A. Nagy (Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada) zur Verfügung gestellt wurde. Die Kultivierung erfolgte in Cytoperm Brutschränken (Fa. Heraeus) bei 6,5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchte. ES-Zellen wurden stets auf MEF-Zellen in Anwesenheit von 500 U/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor) kultiviert. Zur Vorbereitung der Zellen für die Blastozysten-Injektion oder Elektroporation wurden die ES-Zellen für ca. 40 Minuten auf MEF-Zellen-freie Kulturschalen inkubiert und anschließend der Überstand mit den ES-Zellen abgenommen, um die MEF-Zellen abzutrennen.

ES-Zellmedium	80 %	DMEM
	20 %	FBS
	0,1 mM	nicht-essentielle Aminosäuren
	1 mM	Na-Pyruvat
	2 mM	L-Glutamin
	10 ⁻⁶ M	2-Mercaptoethanol
	1.000 U	Penicillin/Streptomycin
	500 U	LIF

2.5.2.1 Transfektion und Selektion von ES-Zellen

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden 7,5 x 10⁶ R1 ES-Zellen in 750 µl PBS aufgenommen und 40 µg linearisierte Vektor-DNA in 50 µl PBS hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen Stromstoß von 250 V und 500 µF mittels Gene Pulser II der Fa. Biorad. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml ES-Zellmedium in 90 mm Platten (Fa. Nunc) auf Neomycin-resistente MEF-Zellen ausgesät. 12-18 Stunden nach der Elektroporation wurde das Medium gegen Selektionsmedium mit 250 µg/ml G418 und 2 µM Ganciclovir ausgetauscht. Nach ca. 8 Tagen Selektion mit täglichem Mediumwechsel konnten einzelne Klone mit Hilfe eines Mikroskops isoliert und in 96-Lochplatten transferiert werden. Nach Dichtwachsen der 96-Lochplatten wurden die Zellen auf eine mit MEF-Zellen bedeckte 48- und eine gelatinisierte 24-Lochplatte aufgeteilt. Die 48-Lochplatte wurde nach zwei weiteren Tagen Kultur und Zugabe von 100 µl Einfriermedium pro Vertiefung bei -80 °C weggefroren. Die 24-Lochplatte diente zur DNA-Extraktion und deren Analyse durch das Southern-Blot Verfahren. Nach

Identifizierung von Klonen mit entsprechender homologen Rekombinationsereignis wurden diese aus der 48-Lochplatte aufgetaut und expandiert.

2.5.2.2 Herstellung von embryonalen Mausfibroblasten (MEF)

Trächtige C57/B16 oder MTK-Neo wurden am Tag 13-14 *post coitum* getötet und die Embryonen isoliert. Nach Entfernung des Kopfes und aller inneren Organe wurde der Torso mechanisch zerkleinert. Das Gewebe wurde einmal mit PBS gewaschen und für 2 x 15 Minuten in Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die jeweiligen Überstände wurden abgenommen und ein gleicher Teil Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 145 mm Zellkulturschale (Fa. Nunc) ausgesät. Konfluent gewachsene Kulturen wurden im Verhältnis 1:5 aufgeteilt. Vor Einsatz der MEF-Zellen für die ES-Kultur wurden diese für 3 Stunden mit Mitomycin C (0,01 mg/ml) behandelt, trypsiniert und auf entsprechende 90 mm Kulturschalen bzw. 96- und 48-Lochplatten ausplattiert.

2.5.3 Passagieren von Zellen

Zellen, die die Gewebekulturschale konfluent bewachsen hatten, mußten auf neue Kulturschalen verteilt werden. Die Ablösung der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS durch Inkubation in 0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA. Der Prozeß wurde durch Zugabe des fünffachen Volumens Zellkulturmedium (DMEM+10 % FBS) gestoppt und die Zellen auf neue Schalen verteilt.

2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zelllinien wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 Upm pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen (Fa. Nunc) transferiert und in Qualifreezer Cyroeinfrierbehälter (Fa. Nunc) bei -80 °C weggefroren. Nach 24 Stunden konnten die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt werden. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst schnell in einem 37 °C-warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und tropfenweise entsprechendes Medium zugefügt. MEF Zellen wurden direkt ausplattiert und bei ES-Zellen wurde durch Zentrifugation zunächst

das DMSO-haltige Einfriermedium abtrennt und die Zellen in frischem Medium aufgenommen.

Einfriermedium	50	%	vollständiges Medium
	40	%	FBS
	10	%	DMSO

2.5.5 Isolation von T- und B-Lymphozyten aus Organen

2.5.5.1 Herstellen einer Einzelzellsuspension

Bei den Versuchen mit primären T-Zellen und B-Zellen war es notwendig, zunächst die Zellen in Suspension zu bringen. Dazu wurden Thymus und Milz zwischen zwei geschliffenen Objektträgern in kaltem PBS/1 % FBS zerrieben. Zur Untersuchung der B-Zellen im Knochenmark wurden Femur und Tibia, nachdem das Fell und umliegendes Fett- und Muskelgewebe sorgfältig entfernt wurden, mittels einer Spritze und Kanüle mit PBS gespült. Die Zellen wurden gewaschen und zur Abtrennung von Gewebereste über mit Baumwolle gestopfte Pasteurpipetten filtriert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000 Upm wurden die Zellen in Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte stets mit dem Zellzählgerät CASY-1 (Fa. Schärfe).

2.5.5.2 Erythrozytenlyse

Vor der weiteren Aufreinigung von Lymphozyten, besonders aus der Milz und Knochenmark, war es z.T. notwendig die Erythrozyten zu lysieren. Dazu wurden abzentrifugierte Zellen jeweils einer Milz in 1 ml 1x Ammoniumchlorid-Lysispuffer (Fa. Pharmingen) aufgenommen und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml vollständiges Medium hinzugegeben, um die Lysisreaktion zu stoppen. Nach erneuter Zentrifugation konnten die Zellen zur weiteren Verwendung in Medium oder PBS aufgenommen werden.

2.5.5.3 Aufreinigung von Zellen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sort)

Die magnetische Sortierung von Zellen ermöglicht die quantitative Ausbeute hochreiner Zellpopulationen aus verschiedenen Geweben (hier: Milz und Lymphknoten). Die Zellen werden dabei entweder negativ sortiert, d. h. alle nicht gewünschten Zellen werden aus dem

Zellgemisch depletiert, oder die gewünschten Zellen werden positiv direkt aus dem Zellgemisch sortiert. In beiden Fällen werden die Zellen mit einem für den Zelltyp spezifischen monoklonalen Antikörper (mAK) markiert. Entweder ist der spezifische mAK direkt an superferromagnetische Partikel (Microbeads) gebunden, oder der spezifische mAK wird von einem Zweit-Antikörper erkannt. Dieser Zweit-Antikörper ist an Microbeads gebunden und erkennt den Fc-Anteil des Erst-Antikörpers. Die Kopplung der Microbeads an die Zelle geschieht so indirekt. Die an Microbeads gebundenen Zellen können in einem magnetischen Feld über eine Säule des autoMACS-Geräts getrennt werden. Die methodischen Einzelheiten sind aus den Angaben des Herstellers ersichtlich (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland).

Die Qualität der Aufreinigung wurde stets mittels Durchflußzytometrie überprüft und lag durchschnittlich bei 85 % bis 96 %.

2.5.6 Kultivierung von murinen Lymphozyten

Die Kultivierung primärer Lymphozytenkulturen erfolgte in Cytoperm Brutschränken (Fa. Heraeus) bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre in sog. MTC-Medium. Alle Stimulationsexperimente wurden mit einer Zelldichte von 1 – 2 x 10⁶ Zellen/ml MTC-Medium durchgeführt.

MTC-Medium	85 %	RPMI 1640
	15 %	FBS
	0,1 mM	nicht-essentielle Aminosäuren
	1 mM	Na-Pyruvat
	2 mM	L-Glutamin
	10 ⁻⁶ M	2-Mercaptoethanol
	1000 U	Penicillin/Streptomycin
	100 µg/ml	Gentamicin

Für die Stimulation von T-Zellen in vitro wurden die mitogenen Substanzen α-CD3 Antikörper, α-CD28-Antikörper und Concanavalin A zunächst in den Zellkulturschalen immobilisiert. Dazu wurden die für diese Versuche benutzten 96- bzw. 24-Lochplatten mit jeweils 20 µl bzw. 100 µl einer Lösung der jeweiligen mitogenen Substanz in PBS für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen beziehen sich

immer auf die Endkonzentration des Mitogens. Zur Stimulierung von B-Zellen wurde LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml in das Medium zugegeben.

2.6 Zytometrie

2.6.1 Durchflußzytometrie

2.6.1.1 Darstellung von Oberflächenmarkern

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS) können Zellpopulationen aufgrund ihrer Morphologie, der Expression fluoreszierender Moleküle wie dem GFP-Protein, und durch Darstellung von Oberflächenmolekülen über Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper analysiert und sortiert werden. Für die Analyse von Oberflächenproteinen auf Leukozyten mittels Durchflußzytometer wurden Einzelzellsuspensionen wie unter 2.5.5.1 beschrieben hergestellt und 1×10^6 Zellen in 300 μ l PBS/2 % FBS aufgenommen und in 5 ml Polystyren Rundbodenröhrchen überführt. Entsprechende Mengen an Fluorochrom- oder Biotin-gekoppelter Antikörper (je nach Hersteller 1-5 μ l Antikörperlösung) wurden hinzugegeben und die Ansätze für 30 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Die Proben wurden nach einmaligem Waschen der Zellen mit CellWash (Fa. Becton Dickinson) in 1 ml CellWash resuspendiert. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung eines FACScan Calibur (alle Fa. Becton Dickinson) und mittels des Computerprogramms CellQuest (Fa. Becton Dickinson). Dabei wurden zunächst über die Parameter Vor- und Seitwärtsstreulicht lebende, intakte Zellen elektronisch ausgewählt und mindestens 10.000 Signale aufgenommen.

Die Sortierung verschiedener Zellpopulationen wurde an einem FACS-Vantage und FACS-DiVA der Fa. Becton Dickinson durchgeführt.

Für die spätere Auswertung der Messdaten wurden neben CellQuest noch die Programme FlowJO (Tree Star) und WinMDI (TSRI, Freie-Software von Joe Trotter) benutzt.

2.6.1.2 Intrazelluläre FACS-Analyse

Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbungen für FACS-Analysen erfolgen wie für Oberflächen-Färbungen beschrieben, nur dass die Zellen vor der Färbung durch 2 % Paraformaldehyd fixiert wurden (20 Minuten bei 4 °C) und in den Färbe- und Waschpuffer 0,1 % Saponin zur Permeabilisierung der Zellmembran zugegeben wurde. Vor der FACS Messung wurden die Zellen in PBS gewaschen (zum Prinzip der FACS-Analyse siehe oben).

Alternativ wurde zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen das CytoFix/CytoPerm-Kit (Becton-Dickinson) nach Angaben des Herstellers benutzt.

2.6.1.3 Detektion apoptotischer Zellen über AnnexinV

Die Analyse apoptotischer Zellen erfolgte unter Verwendung des „Apoptosis Detection Kit“ der Fa. Pharmingen nach Protokoll des Herstellers. Sollte die AnnexinV Anfärbbarkeit einzelner Populationen differenziert dargestellt werden, wurde auf die Inkubation mit PI verzichtet und stattdessen PE- oder PerCP-gekoppelte Antikörper eingesetzt und die Zellen zusätzlich einmal mit CellWash gewaschen.

2.6.1.4 Bestimmung der DNA-Syntheserate

Die Zellvermehrung ist mit der Replikation genomischer DNA verbunden, so daß die DNA Neusynthese als Parameter für die Zellproliferation und auch für die Regulation der DNA Synthese verwendet werden kann. Der Einbau von 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in neusynthetisierte DNA ermöglicht daher die Bestimmung der Zellproliferation über die Messung der eingebauten BrdU.

Die Mäuse erhielten eine einzige intraperitoneale (i.p.) BrdU (Roth)-Injektion in einer Dosis von 1,8 mg/200 µl und anschließend in einem Zeitraum von 3 Tagen über das zugeführt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Organe entnommen und die Zellen für die Messung der BrdU-Einbau wie oben beschrieben verarbeitet. Die weiteren Schritte zur Oberflächenmolekülen- und intrazellulären BrdU-Färbung für die FACS-Analyse erfolgten wie unter Punkt 2.6.1.1 und 2.6.1.2 aufgeführt. Die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem anti-BrdU Antikörper (Caltag) nach den Instruktionen des Herstellers gefärbt.

2.6.2 Immunofluoreszenz

Immunfluoreszenz (IF) -Puffer	10	mM	Tris-HCl, pH 7
	100	mM	NaCl
	0,05	%	Tween 20
	0,5	%	BSA

Um Thymozyten für die Immunofluoreszenzanalyse vorzubereiten, wurden zunächst Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden in einem kleinen Volumen PBS auf vorher mit einem Fettstift markierte Objektträger aufgetropft, getrocknet und mit Roti-Histofix (4,5 % Formaldehyd-Lösung, Fa. Roth) fixiert. Anschließend mit 2x mit PBS gewaschen, 30 Minuten mit IF-Puffer äquilibriert und 1 Stunde mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (α -GFP, Santa-Cruz) inkubiert. Darauf wurde dreimal mit PBS gewaschen und der fluoreszenzmarkierte (FITC) Zweit-Antikörper zugegeben und erneut bei RT im Dunkeln für 1 Stunde inkubiert. Der Kern wurde für 30 Minuten mit DAPI gefärbt. Nach neuerlichem Waschen mit PBS und entfernen der überstehenden Flüssigkeit wurden die Zellen mit dem Prolong Antifade-Kit (Fa. Molecular Probes) eingedeckelt. Die Immunofluoreszenzaufnahmen wurden an dem Laser-Scan-Mikroskop (Fa. Zeiss) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Gfi1 Expression während Lymphozyten-Entwicklung anhand der Gfi1:GFP knock-in Maus

3.1.1 Generierung einer Gfi1-defizienten Mausmutante durch “knock-in“ eines Reportergens

Die gezielte Mutagenese von Genen in der Keimbahn von Mäusen eröffnet neuartige Möglichkeiten, Einblicke in die *in vivo* Funktion dieser Gene und ihrer Rolle im Immunsystem zu erlangen. Um sowohl die Expression und Regulation als auch die Funktion von Gfi1 in einem Organismus untersuchen zu können, wurde durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen eine Gfi1-defiziente Mausmutante generiert, in der das Reportergen GFP in den Gfi1 Leserahmen inseriert wurde. Der große Vorteil dieser knock-in (KI) Strategie liegt darin, dass es möglich ist, in heterozygoten Mäusen, die auf einem Allel noch das funktionstüchtige Gfi1 exprimieren, die Expression und Regulation dieses Gens auf dem anderen Allel über das GFP untersuchen zu können, während der homozygote Zustand der Gfi1:GFP Mäuse einen knock-out (KO) darstellt.

3.1.2 Klonierung des Gfi1:GFP Rekombinationsvektors

Die Strategie zur Insertion und somit auch zur Inaktivierung des Gfi1 Gens durch das GFP wurde so gewählt, dass fast der gesamte Leserahmen des Gfi1 Gens bis auf das dritte und siebte Exon durch die cDNA des GFPs und einer Neomycin-Resistenz (Neo) Kasette ersetzt wurde (Abb. 3.1). Diese beiden Gene wurden von beiden Seiten von unterschiedlich langen homologen Bereichen des Gfi1 genomischen Lokus flankiert. Der 6 kb lange 5' homologe Bereich beinhaltet alle 5' regulatorischen Elemente des Gfi1 Gens. Zur späteren Diagnose der homologen Rekombination in den Gfi1 Lokus wurde die BamHI-Schnittstelle in der flankierenden 5' homologen Region deletiert. Während der kurze 3' homologe Bereich das letzte Exon und die polyA Region beinhaltet und ungefähr 3 kb groß ist. Das 5' Ende des Rekombinationsvektors enthält das Gen für die virale Thymidinkinase (TK). Das Konstrukt konnte durch einen NotI Verdau linearisiert werden (Abb. 3.1).

Zunächst wurde mittels PCR ein Basenaustausch am Translationsstart (AUG) des Gfi1 Gens eine NcoI-Schnittstelle erzeugt. Hierdurch war es möglich die GFP cDNA, mit einem Stopp-Kodon und ohne Polyadenylierungssignal, durch einen NcoI Verdau in den GfiLese-rahmen einzubringen. Der Rekombinationsvektor enthält das Gen für die Neomycin Phosphotransferase als einen Marker zur Positivselektion, die das Wachstum von rekombinierten ES-Zell Klonen in Gegenwart des Antibiotikums Geneticin (G418) erlaubt. Die Neo-Kassette war an beiden Seiten von loxP Erkennungssequenz flankiert, so dass sie später durch die Verpaarung mit der ubiquitär CRE exprimierenden CRE Deleter Maus von der CRE-Rekombinase mediierten Deletion entfernt werden konnte (Sternberg und Hamilton, 1981; Schwenk et al., 1995). Bei der Klonierung des Gfi1:GFP Knock-in Konstrukts wurde die Neo-Kassette in antisense Orientierung zum Gfi1 Gen eingebaut, um mögliche Auswirkungen auf den Gfi1 Lokus zu minimieren (Abb. 3.1).

Der Einbau der TK Kassette in den Rekombinationsvektor erlaubte die Negativselektion aller ES-Zell Klone, bei denen der Rekombinationsvektor zufällig und nicht über homologe Rekombination ins Genom integrierte. Solche Klone wären sensitiv für die Phosphorylierung und den nachfolgenden Einbau des Thymidinanalogs Gancyclovir in die DNA, was zur Blockade der DNA-Replikation und zum Zelltod führt. Da bei homolog rekombinierten ES-Zell Klonen die TK-Kassette nicht ins Genom integriert und die endogene Thymidinkinase Gancyclovir nicht zu aktivieren vermag, sind diese dagegen resistent und können selektioniert werden (Wurst und Joyner, 1993).

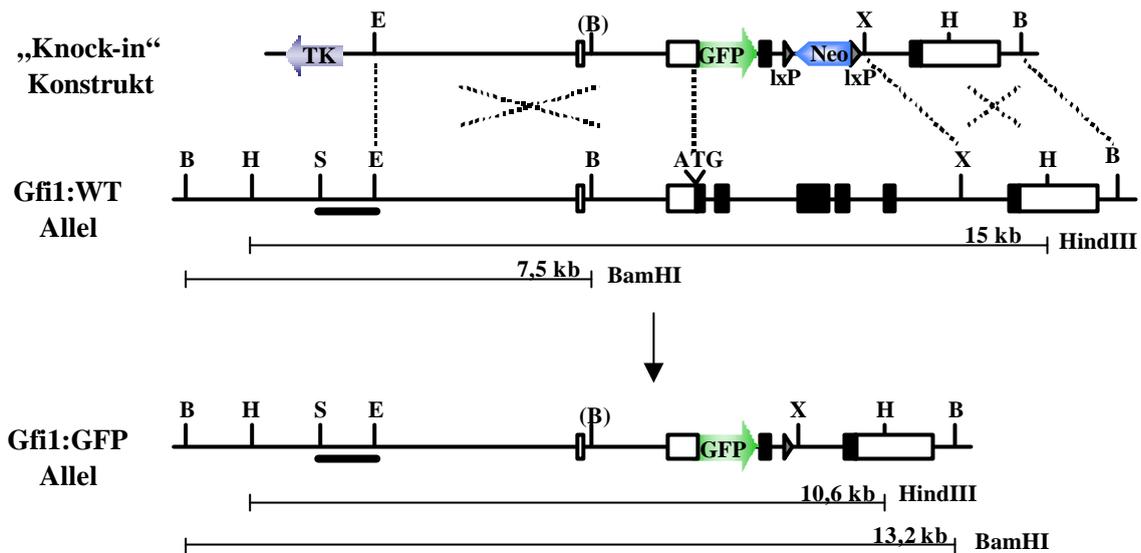


Abbildung 3.1: Strategie zur Herstellung der Gfi1:GFP knock-in Maus

Insertionsmutagenese des Gfi1 Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus. Fast der gesamte Leserahmen des Gfi1 Gens wurde durch den Einbau der GFP cDNA (grün) und der Neomycin-Resistenz Kasette (blau) deletiert. Die Lage der Sonde für die Analyse der ES-Klone ist angegeben. Die im Southernblot verwendeten Restriktionsendonukleasen und die entsprechenden Größen der entstehenden Fragmente sind ebenfalls aufgeführt. Die Balken stellen Exons des Gfi1 Lokus dar, wobei die ausgefüllten Segmente die kodierenden Sequenzen zeigen. Dabei stellt die Pfeilrichtung die Orientierung der Transkription des Gens dar. Großbuchstaben bezeichnen die Schnittstellen für Restriktionsenzyme: B: BamHI, E: EcoRI, H: HindIII, S: SacI, X: XbaI. Die loxP-Sequenzen (lxP) flankieren das Neo Gen, welches durch Cre-Rekombinase medierte Deletion entfernt wird.

3.1.3 Generierung von Gfi1:GFP heterozygoten embryonalen Stammzellen (ES)

Für die Transfektion des oben beschriebenen Rekombinationsvektors wurden R1 ES-Zellen, abgeleitet vom Mausstamm 129/Ola, verwendet. Die Kultivierung erfolgte stets auf murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF) und in Anwesenheit von rekombinantem LIF (engl. „leukemia inhibiting factor“), um eine Differenzierung der ES-Zellen in Kultur zu verhindern. Für den Zeitraum der Selektion wurden MEFs aus MTK-Neo transgenen Mäusen benutzt, die eine G418 Resistenz besitzen. Alle Fibroblasten wurden aus Tag 14 Embryonen gewonnen und vor Kokultivierung mit ES-Zellen für 3 h mit Mitomycin C behandelt, um ein Überwachsen der Kulturen mit Fibroblasten zu verhindern. Der linearisierte Rekombinationsvektor wurde in die ES-Zellen elektroporiert, nach zehntägiger Doppelselektion der Zellen mit G418 und Gancyclovir wurden resistente Klone in 96-well Platten gepickt und expandiert. Ein Teil der Zellen wurde bei -80 °C gelagert, während der andere Teil mittels Southern-Analyse auf homologe Rekombination getestet wurde.

3.1.4 Southern-Analyse der rekombinierten ES-Zellen und der knock-in Mäuse

Die Anzucht der Zellen erfolgte auf Zellkulturplatten ohne embryonale Fibroblasten, um das Verhältnis des Wildtypsignals zum homolog rekombinierten Signal nicht zu verändern. Die chromosomale DNA des ES-Klons (Abb. 3.2a) und der daraus generierten knock-in Mäuse (Abb. 3.2b) wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut, die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Abbildung 3.2 zeigt ein Autoradiogramm nach Southernblot der genomischen DNA aus der Schwanzbiopsie der entsprechenden Tiere. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit einer radioaktiv markierten 5' EcoRI/SacI-Sonde (Abb. 3.1), die außerhalb des Rekombinationsvektors lag, somit wurde nicht nur die Integration detektiert sondern das spezifische homologe Rekombinationsereignis innerhalb des Gfi1 Locus. Das Wildtyp Allel ergab nach BamHI Verdau eine Bandengröße von 7,5 kb (Abb. 3.1 und 3.2). Das Hybridisierungssignal von 13,2 kb ist spezifisch für das knock-in Allel. Zusätzlich als Kontrolle wurde die genomische DNA auch mit dem Restriktionsenzym HindIII analysiert. Diese Analyse ergab ein 15 kb endogenes Fragment und ein 10,6 kb großes Fragment des mutierten Allels (Abb. 3.2)

3.1.5 Generierung der Gfi1:GFP knock-in Mausmutante

Der so gewonnene homolog rekombinierte ES-Zell Klon R1#379 wurde in Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren von Wojciech Wegrzyn (AG Möröy, Institut für Zellbiologie) injiziert und anschließend in pseudoschwangere (C57BL/6 x BALB/c) F1 Weibchen transferriert. Auf diese Weise wurden chimäre Mäuse generiert. Der Grad des Chimärismus spiegelt den Anteil wieder, den die homolog rekombinierten ES-Zellen am Gesamtorganismus besitzen und kann leicht an der Fellfarbe abgeschätzt werden. Hochchimäre Mäuse, also diejenigen mit einem überwiegend agoutifarbenen Fell, wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart und auf Keimbahntransmission getestet. Bei den agoutifarbenen Nachkommen lag die Wahrscheinlichkeit, dass das mutierte Allel transmittiert wurde, bei 50 %. Alle agoutifarbenen Nachkommen aus der Testverpaarung von chimären Mäusen mit C57BL/6 Mäusen wurden zunächst mittels Southernblot auf das Vorhandensein des mutierten Gfi1:GFP Allels getestet. Die Gfi1:GFP heterozygoten knock-in Mäuse waren phänotypisch normal. Durch Verpaarung der heterozygoten Gfi1^{GFP/+} Tiere untereinander wurden Gfi1-defiziente Mäuse erhalten, die dem publizierten Gfi1 knock-out (Karsunky et al., 2002) phänotypisch glichen.

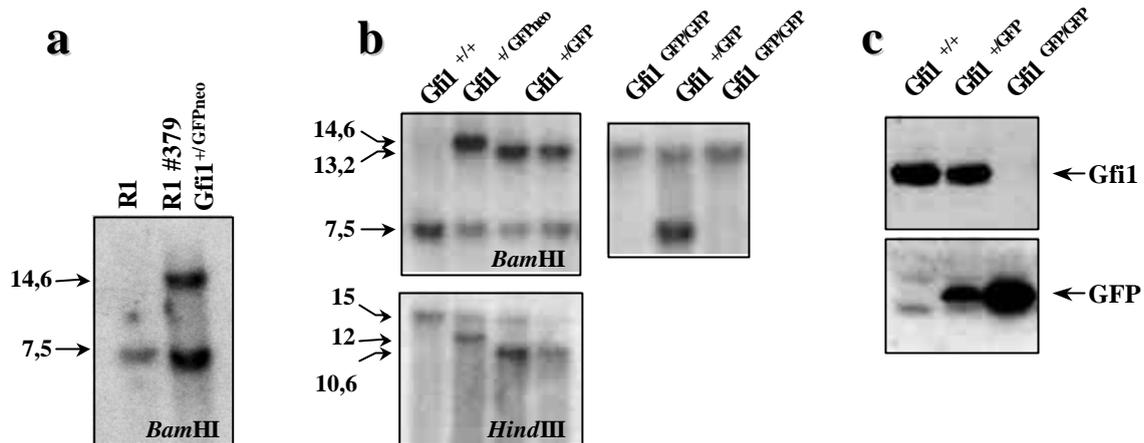


Abbildung 3.2: Nachweis der homologen Rekombination, der Gfi1 Defizienz und der GFP Expression

a. Genomische Southernblotanalyse homolog rekombinierter ES-Zell Klone. Die DNA der homolog rekombinierten ES-Zellklone R1 #379 und eines Kontrollklons R1) wurde mit BamHI restringiert und mit der 5' flankierenden Sonde hybridisiert. Die Intensitäten der Signale für das Wildtypallel (7,5 kb) und das homolog rekombinierte Allel (14,6 kb) waren gleich. Für die Lage der Sonden und Größe der Hybridisierungssignale siehe Abb. 3.1.

b. Autoradiogramm nach Southernblot von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien der knock-in Mäuse. Die Neo-Kassette in den $Gfi1^{+/GFPneo}$ Tieren wurde durch die Verpaarung mit der CMV-Cre transgenen Maus deletiert. Durch Kreuzung der heterozygoten $Gfi1^{+/GFP}$ Tiere der F1-Generation erhält man die homozygoten knock-in $Gfi1^{GFP/GFP}$ Mäuse, die gleichzeitig auch den Gfi1 knock-out ergeben. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte wie oben beschrieben mit den Enzymen BamHI und HindIII.

c. Westernblot-Analyse von Gfi1 und GFP Protein. Aus Thymozyten der drei unterschiedlichen Genotypen $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{+/GFP}$ und $Gfi1^{GFP/GFP}$ wurden Proteinextrakte gewonnen, über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Gfi1 und GFP erfolgte durch Inkubation mit dem polyklonalen α -Gfi1 Serum (Schmidt et al., 1998a; 1:1500) und α -GFP (Santa Cruz; 1:1000).

3.1.6 Nachweis der Gfi1:GFP knock-in Funktionalität

Zunächst wurde sowohl die Gfi1 als auch die GFP Proteinmenge in Thymozyten der drei unterschiedlichen Genotypen untersucht. Dazu wurden Thymozyten isoliert, Proteinextrakte gewonnen und 50 μ g Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zum Nachweis von Gfi1 und GFP wurde der in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Möröy hergestellte α -Gfi1 (Schmidt et al., 1998a) und der kommerzielle α -GFP (Santa Cruz) Antikörper verwendet.

Wie erwartet zeigten die heterozygoten $Gfi1^{+/GFP}$ Mäuse keinen Unterschied in der Gfi1 Expression im Vergleich zum Wildtyp. Abbildung 3.2c zeigt die endogene Gfi1 Expression von WT und $Gfi1^{+/GFP}$ Mäusen, während in $Gfi1^{GFP/GFP}$ Tieren kein Protein detektiert werden konnte. $Gfi1^{GFP/GFP}$ Tiere zeigten die größte Menge an GFP Protein. In den heterozygoten $Gfi1^{+/GFP}$ Thymozyten war die GFP Proteinmenge gegenüber den homozygoten Mäusen auf etwa die Hälfte reduziert (Abb. 3.2c).

Die *in vivo* Funktionalität der GFP Fluoreszenz in den Thymozyten der jeweiligen Mäuse ist in Abbildung 3.3 als Histogramm nach Durchflußzytometrie (FACS) und als Immunofluoreszenz von Thymozyten der verschiedenen Mauslinien dargestellt. Die Fluoreszenz-Intensität war in den homozygoten Gfi1:GFP knock-in Mäusen deutlich höher als in den heterozygoten Tieren (Abb. 3.3b und 3.4). Die Quantifizierung der transkriptionellen Gfi1 Aktivität erfolgte durch Messung der GFP Fluoreszenz als MFI (engl. „mean fluorescence intensity“) –Wert, der für die Intensität der Fluoreszenz steht.

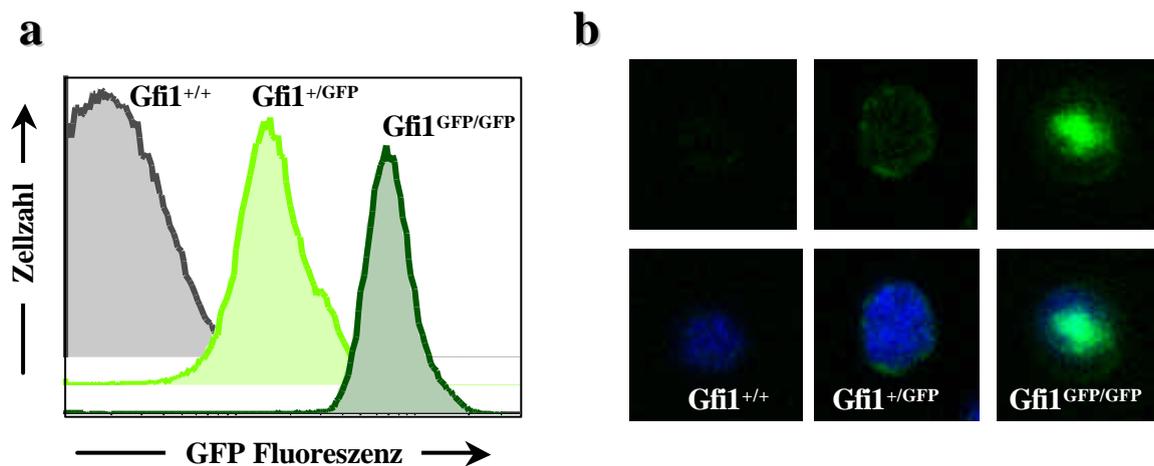


Abbildung 3.3: *In vivo* Funktionalität der GFP Insertion

a. Durchflußzytometrische Analyse des Thymus. Isolierte Thymozyten aus Mäusen mit drei unterschiedlichen Genotypen $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{+/GFP}$ und $Gfi1^{GFP/GFP}$ wurden nach der GFP Fluoreszenz im FACSCalibur untersucht. Die GFP Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal detektiert und als MFI-Wert ausgewertet. Der MFI-Wert der homozygoten $Gfi1^{GFP/GFP}$ Thymozyten (MFI = 47, n = 11) ist etwa dreimal so hoch wie der der heterozygoten $Gfi1^{+/GFP}$ Thymozyten (MFI = 14, n = 8).

b. Immunofluoreszenz Analyse mit dem Laser-Scan-Mikroskop (LSM). Isolierte Thymozyten aus $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{+/GFP}$ und $Gfi1^{GFP/GFP}$ wurden mit ROTifix fixiert und mit α -GFP als Erst-Antikörper inkubiert. Die Detektion von GFP in den Zellen erfolgte durch Inkubation mit einem FITC konjugierten Zweit-Antikörper. Der Zellkern wurde durch die Färbung mit DAPI (blau) detektiert.

Als nächstes wurde die relative Menge der Gfi1 und GFP spezifischen Transkripte in sortierten DN, DP, $CD4^+$ sowie $CD8^+$ SP Thymozyten aus $Gfi1^{+/GFP}$ Mäusen miteinander verglichen. Die Analyse mittels quantitativer PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Kosan (AG Möröy, Institut für Zellbiologie) vorgenommen. Zusätzlich zu den Transkripten wurden die Proteinmengen in den jeweiligen Thymozyten-Subpopulationen untersucht.

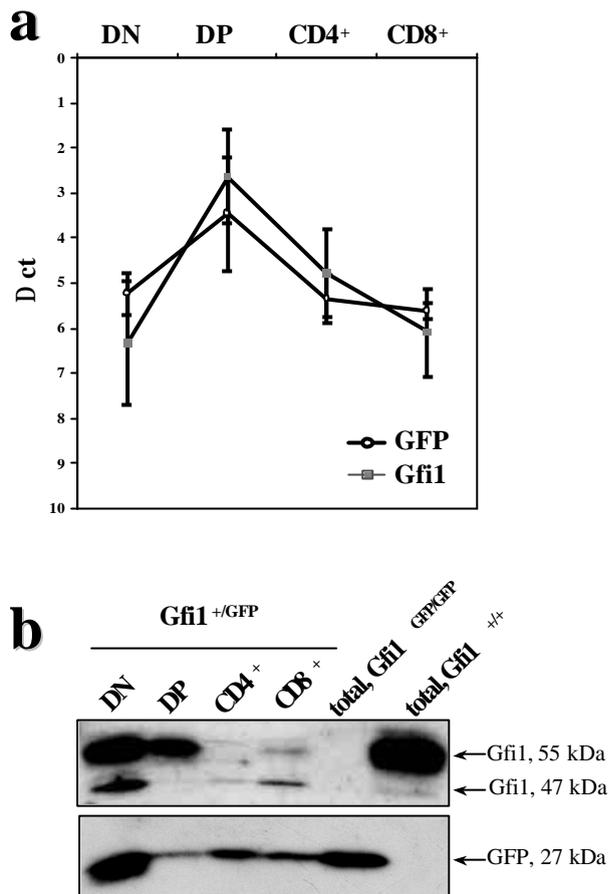


Abbildung 3.4: Gfi1 und GFP Transkripte und Proteinniveau in Thymozyten

a. Real-time PCR Analyse: Thymozyten aus Gfi1^{+/GFP} wurden mit α -CD4-PE und α -C8-APC gefärbt und mittels FACSDiVA nach DN, DP, CD4 und C8 SP Populationen sortiert. Aus diesen wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA mittels RT-PCR hergestellt und anschließend mit Gfi1 sowie GFP spezifischen Primern von Applied Biosystems quantitative PCR durchgeführt. Die Normierung erfolgte gegen GAPDH-PCR-Produkte.

b. Western-Blot Analyse: Die angegebenen Thymozyten-Subpopulationen (je Spur 1×10^6 Zellen) wurde wie oben beschrieben sortiert, lysiert durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Gfi1 und GFP erfolgte durch Inkubation mit dem polyklonalen α -Gfi1 Serum (Schmidt et al., 1998a) und α -GFP (Santa Cruz).

Beide Allele, Gfi1-WT und GFP knock-in, zeigten nahezu die gleichen mRNA Level in den untersuchten DN, DP, CD4 SP sowie CD8 SP Thymozyten-Subpopulationen (Abb. 3.4a). Dies zeigt, dass die homologe Rekombination keine Auswirkung auf die Genregulation hatte, so dass die transkriptionelle Aktivität des KI-Allels ähnlich dem des Gfi-WT Allels ist. Um festzustellen, ob der Proteinlevel ein ähnliches Bild ergibt, wurden die sortierten Thymozyten auf Gfi1 und GFP Protein untersucht. Die Analyse auf Gfi1 Proteinexpression in den CD4/CD8-Subpopulationen mit dem zuvor publizierten α -Gfi1 Antikörper (Schmidt et al., 1998) zeigte die Existenz von zwei Isoformen des Gfi1 Proteins mit Molekulargewichten von 55 kDa und 47 kDa, die in den Gfi1^{GFP/GFP} knock-out Mäusen nicht zu detektieren waren (Abb. 3.4b). Beide Gfi1 Isoformen sind am stärksten in den DN-Thymozyten exprimiert und wurden weniger stark in den DP- sowie SP-T-Zellen exprimiert (Abb. 3.4b). Allerdings war in SP Thymozyten die 47 kDa Isoform stärker vorhanden, als in den DP Zellen, während die 55 kDa Form verstärkt in DP- und DN-Populationen vorkam (Abb. 3.4b). Das GFP Protein folgte im Allgemeinen dem Expressionsmuster der Gfi1 Isoformen. Damit konnte die GFP Fluoreszenz in Gfi1:GFP knock-in Mäusen als direktes Maß für die Gfi1 Expression angesehen werden.

3.1.7 Gfi1 Expression nimmt während der B-Zellentwicklung ab

Die verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien im Knochenmark wurden basierend auf dem von Hardy et al. (1991) eingeführten System anhand der differentiellen Expression der Oberflächen-Antigene CD45R/B220 und IgM in Kombination mit CD43 unterschieden (siehe Einleitung und Abb. 3.5). Zusätzlich wurde die Ausprägung des von Melchers et al. zur Identifizierung von prä-B-Zellen verwendeten Oberflächenmarkers CD25 (IL-2R α -Kette) untersucht.

Schematische Darstellung der B-Zelldifferenzierung:

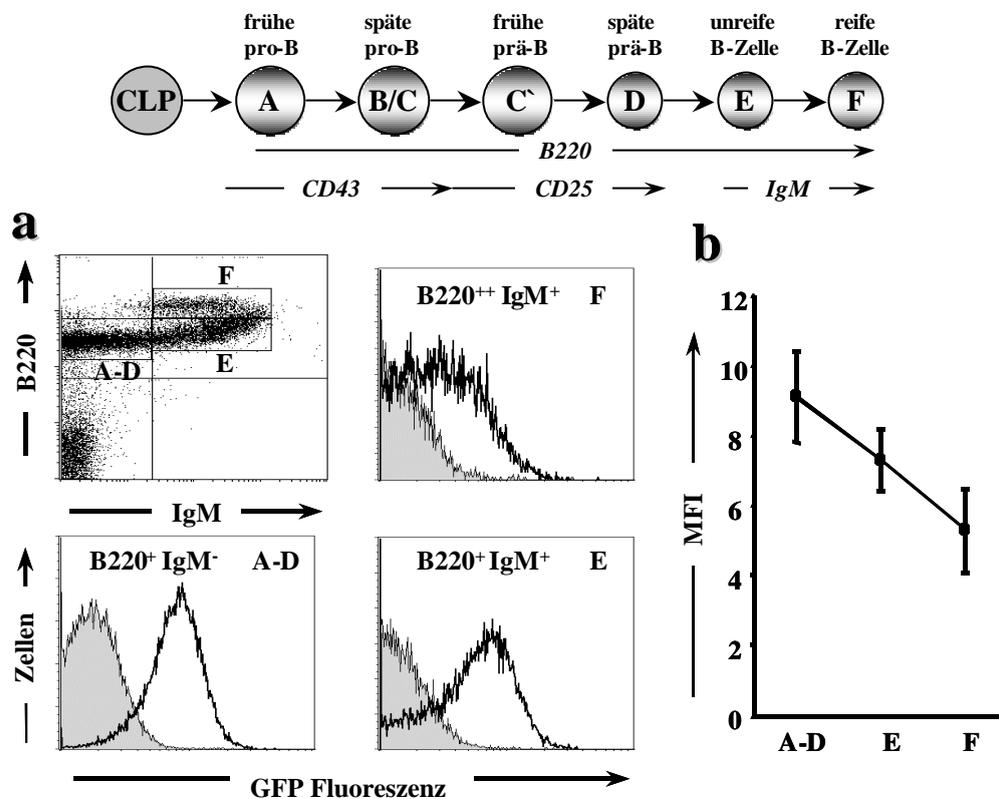


Abbildung 3.5: Gfi1:GFP Fluoreszenz während B-Zellentwicklung im Knochenmark

a. Durchflusszytometrische Analyse der B-Zelldifferenzierung. Um die GFP Fluoreszenz Intensität während der B-Zellentwicklung zu ermitteln wurden Knochenmarkszellen aus Gfi1^{+/+} und Gfi1^{+/GFP} isoliert und mit α -CD45R (B220)-APC und α -IgM-PE gefärbt. Repräsentative Histogramme zeigen die GFP Fluoreszenz in den von Hardy et al. (1991) eingeführten Fraktionen (A-F) der B-Zellentwicklung in der Gfi1^{+/+} (grau ausgefüllte Kurve) und Gfi1^{+/GFP} (schwarze Linie) Maus.

b. Zusammenfassung des Gfi1:GFP Fluoreszenzverhaltens während der B-Zelldifferenzierung. Gezeigt ist die repräsentative graphische Darstellung der GFP MFI-Werte in den angegebenen Fraktionen der B-Zellentwicklung in der Gfi1^{+/GFP} Maus. Die Punkte der Kurve geben Mittelwert mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken wieder (n = 5).

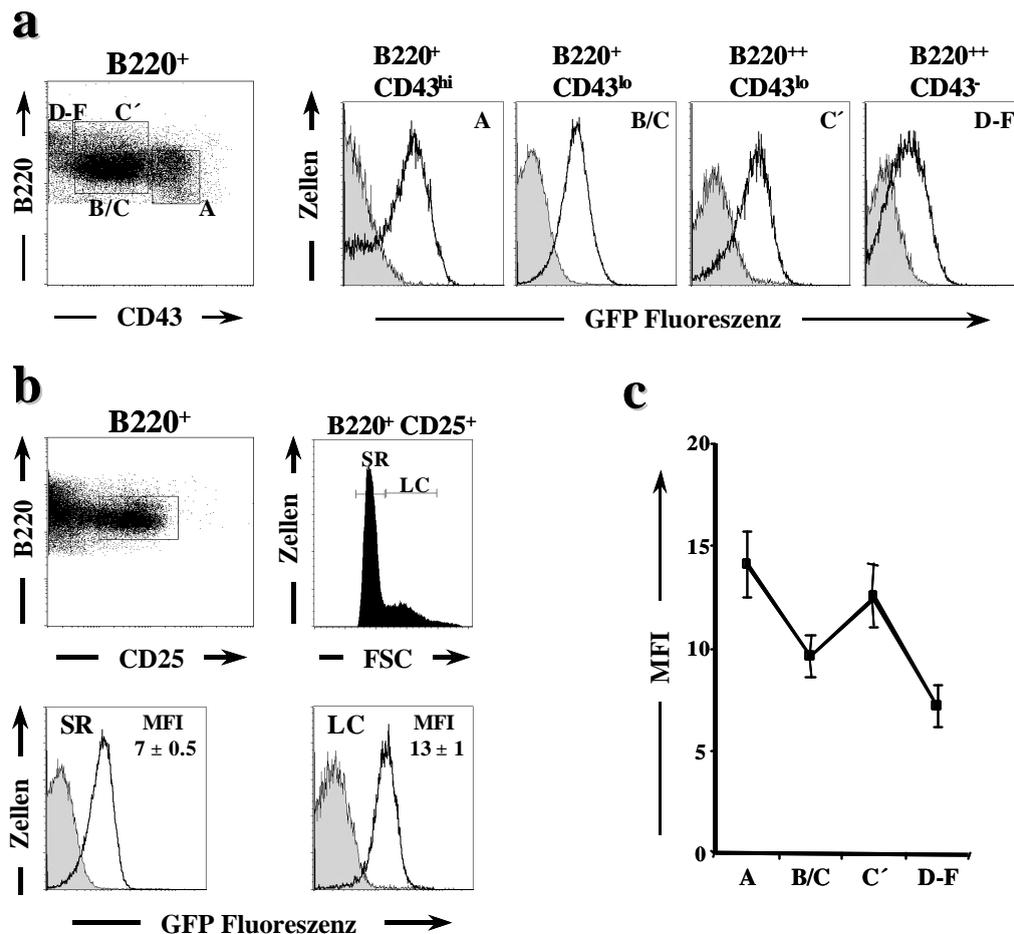


Abbildung 3.6: Transkriptionelle Aktivität des Gfi1 Lokus während der frühen B-Zellentwicklung

a. Durchflußzytometrische Darstellung der Prä-B-Zelldifferenzierung: Knochenmarkszellen aus Gfi1^{+/+} und Gfi1^{+GFP} wurden mit α -CD45R (B220)-APC und α -CD43-PE gefärbt. Repräsentative Histogramme zeigen die GFP Fluoreszenz der elektronisch ausgewählten Populationen aus den Gfi1^{+/+} (grau ausgefüllte Kurve) und Gfi1^{+GFP} (schwarze Linie) Tieren.

b. Darstellung der CD25⁺ prä-B-Zellen im Knochenmark durch Färbung mit CD45R/B220-PE und CD25-APC Antikörpern, sowie deren Größenverteilung über den FSC. Die unterschiedliche Größe der prä-B-Zellen erlaubt eine weitere Unterteilung in SR- („small resting“) und LC- („large cycling“) Zellen. Der jeweilige Bereich dieser Zellen wurde elektronisch markiert und nach der GFP Fluoreszenz Intensität analysiert. Die Gfi1:Expression ist in den LC-Zellen deutlich höher als in den SR-Zellen.

c. Zusammenfassende graphische Darstellung der GFP Fluoreszenz Intensität der in a) elektronisch ausgewählten Populationen (n = 5).

Die Analyse der GFP Fluoreszenz-Intensität mittels FACS in den jeweiligen Populationen der B220/IgM-Stadien zeigte eine deutliche Abnahme der Gfi1 Expression während der B-Zelldifferenzierung (Abb. 3.5a und b). Eine detaillierte Untersuchung der frühen B-Zellen mittels CD43 und CD25 zeigte, dass die frühen B-Zellen (Fr. A, B220⁺CD43^{hi}) Gfi1 exprimieren und mit der Abschaltung des Oberflächen-Antigens CD43 diesen herunterregulieren (Abb. 3.6a und c).

Interessanterweise konnte eine Zunahme der GFP Fluoreszenz und folglich auch die Gfi1 Expression in der Fraktion C', in der die Zellen den prä-BCR bereits auf der Zelloberfläche präsentieren, gemessen werden (Abb. 3.6a und b). Weiterhin wurden die CD25 positiven Populationen innerhalb des prä-B-Zellstadiums nach ihrer Größe elektronisch separiert und somit in „SR“- und in „LC“-Zellen unterteilt (Abb. 3.6b). Beide Zelltypen zeigten GFP Fluoreszenz, wobei die proliferierenden LC-Zellen eine eindeutig höhere Gfi1 Expression aufwiesen als die SR-Zellen (Abb. 3.6b).

3.1.8 Gfi1 ist in aktivierten Lymphozyten hochreguliert und in differentieller Expressionshöhe in den Gedächtnis T-Zellen

Im Folgenden sollte die Gfi1 Expression in peripheren Lymphozyten, insbesondere in T-Lymphozytenpopulationen, mit Hilfe der GFP Fluoreszenz in heterozygoten knock-in Mäusen untersucht werden. Es wurden Zellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten hergestellt, mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

Kleine ruhende reife B-Zellen ($B220^+CD3^-$) in der Peripherie zeigten keine GFP Fluoreszenz, während ruhende T-Lymphozyten ($B220^-CD3^+$) deutliche GFP Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 3.7a). Diese Fluoreszenz Intensität in den Lymphozyten wurde um ca. das sechsfache durch α -CD3 Stimulierung in T-Zellen und durch LPS-Stimulation in B-Zellen verstärkt, was auf eine Induktion der Gfi1 Expression in T und B-Zellen hindeutet (Abb. 3.7a). Dabei erschien die Gfi1 Induktion durch die TCR-Stimulation in den $CD4^+$ T-Zellen effizienter als in $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 3.7b).

In einem weiteren Experiment wurde die Gfi1 Expression in Gedächtnis T-Zellen untersucht. Hierzu wurden zusätzlich zu den CD4 oder CD8 Antikörpern noch Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD44 und CD62L benutzt. Es zeigte sich, dass CD4 Gedächtnis T-Zellen ($CD44^{hi}CD62L^{lo}$) eine viel höhere GFP Fluoreszenz haben als die naiven CD4 Helfer T-Zellen, während das Gfi1 Niveau in ruhenden, naiven als auch in Gedächtnis CD8-T-Zellen gleich war (Abb. 3.7c).

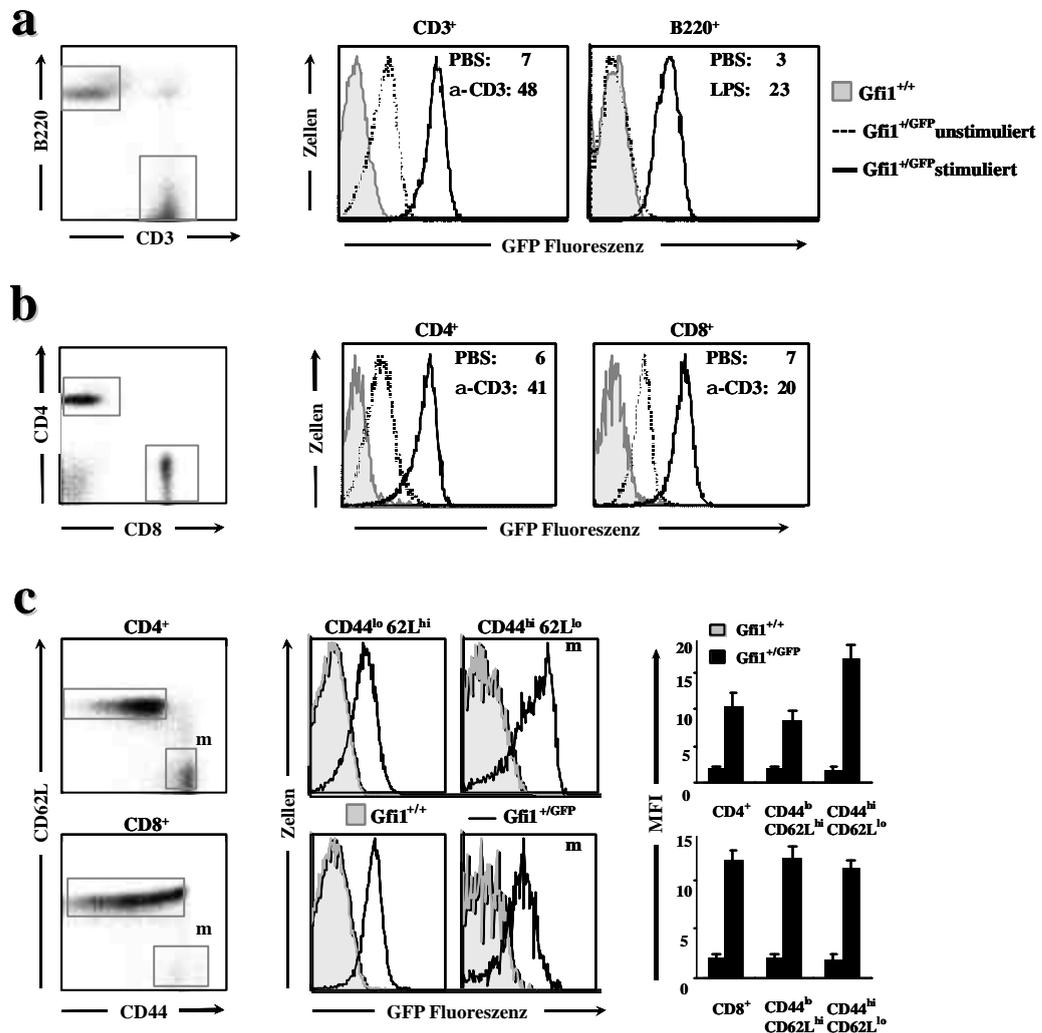


Abbildung 3.7: Gfi1:GFP Expression in den peripheren Lymphozyten

a. Durchflußzytometrische Darstellung der B- und T-Lymphozyten: Milzzellen aus $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{+/GFP}$ wurden mit α -CD45R (B220)-PE und α -C3-APC gefärbt. Repräsentative Histogramme zeigen die GFP Fluoreszenz in unstimulierten (PBS, gestrichelte Linie) und 24 Stunden stimulierten T-Zellen (α -CD3, durchgezogene Linie) sowie B-Zellen (LPS).

b. Untersuchung der GFP Fluoreszenz Intensität in stimulierten Helfer CD4-T-Zellen und in zytotoxischen CD8-T-Zellen.

c. Gfi1:GFP Expression in den Gedächtnis CD4- bzw. CD8-T-Zellen. Milzzellen aus den jeweiligen Mäusen wurden mit CD8- oder CD4-PerCP-Cy5.5 in Kombination mit CD62L-APC und CD44-PE gefärbt. Dargestellt ist die GFP Fluoreszenz in den Naiven ($CD44^{lo}CD62^{hi}$) sowie in den Gedächtnis (m, engl. „memory“, $CD44^{hi}CD62^{lo}$) T-Zellen. Die graphische Zusammenfassung der MFI-Werte verdeutlicht die erhöhte Gfi1:GFP Expression in den CD4 Gedächtnis T-Zellen.

3.1.9 Gfi1 wird während der β -Selektion und der CD4/CD8-Liniendeterminierung hochreguliert

Thymozyten wurden anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8, sowie die DN-Populationen anhand der CD25 und CD44 Expression unter Ausschluss der Zellen mit Linien-Marker (Lin) charakterisiert. Dazu wurden Thymus-Einzelzellsuspensionen aus Gfi1^{+/+} und Gfi1^{+/GFP} mit den entsprechenden fluoreszenzkonjugierten Antikörpern gefärbt, im FACSCalibur gemessen und die Thymozyten-Populationen, wie in Abbildung 3.8 und 3.9 dargestellt, elektronisch ausgewählt. Die Aufteilung bzw. die Unterscheidung der CD4/CD8-Populationen erfolgte gemäss Germain (2002).

In Abbildung 3.8a findet sich ein solches CD4/CD8-Profil. Die GFP Fluoreszenz wurde in den elektronisch ausgewählten T-Zellen gemessen und als FACS-Histogramm dargestellt. In der Zusammenfassung der Gfi1:GFP Fluoreszenz Intensität (MFI) als Kurvendiagramm konnte der Gfi1 Expressionsverlauf in der Abfolge der einzelnen Thymozyten-Differenzierung deutlicher illustriert werden (Abb. 3.8b und 3.9b). Aus diesen und aus den repräsentativen FACS-Histogrammen ging hervor, dass Gfi1 in allen Stadien der Thymozyten-Entwicklung, sowohl in den DP- und SP-, als auch in den DN-Subpopulationen exprimiert wird (Abb. 3.8 und 3.9). Die stärkste GFP Fluoreszenz mit einem MFI von ca. 30 wurde in der DN-Population beobachtet, in den DP-Zellen sank die GFP Fluoreszenz auf einen MFI-Wert von ca. 13.

Auffallend war, dass die GFP Fluoreszenz während der CD4/CD8-Linienentscheidung nach den DP-Zellen in der Zwischenpopulation CD4^{lo}CD8^{lo}, die dem positiv/negativ Selektionsprozess noch unterliegen, erneut zunahm. In Richtung der CD4⁺ SP-Zellen fällt dieser noch einmal drastisch ab, so dass der MFI in den CD4⁺-SP-T-Zellen mit einem Wert von ca. 8 unter dem der DP-Population war. Die Gfi1:GFP Fluoreszenz in der CD8⁺ T-Zelldifferenzierung wurde zunächst im CD4^{lo}CD8⁺ Stadium aufrechterhalten und sank anschließend in den CD8⁺ SP-Zellen auf einen MFI-Wert von ca. 15 (Abb. 3.8b).

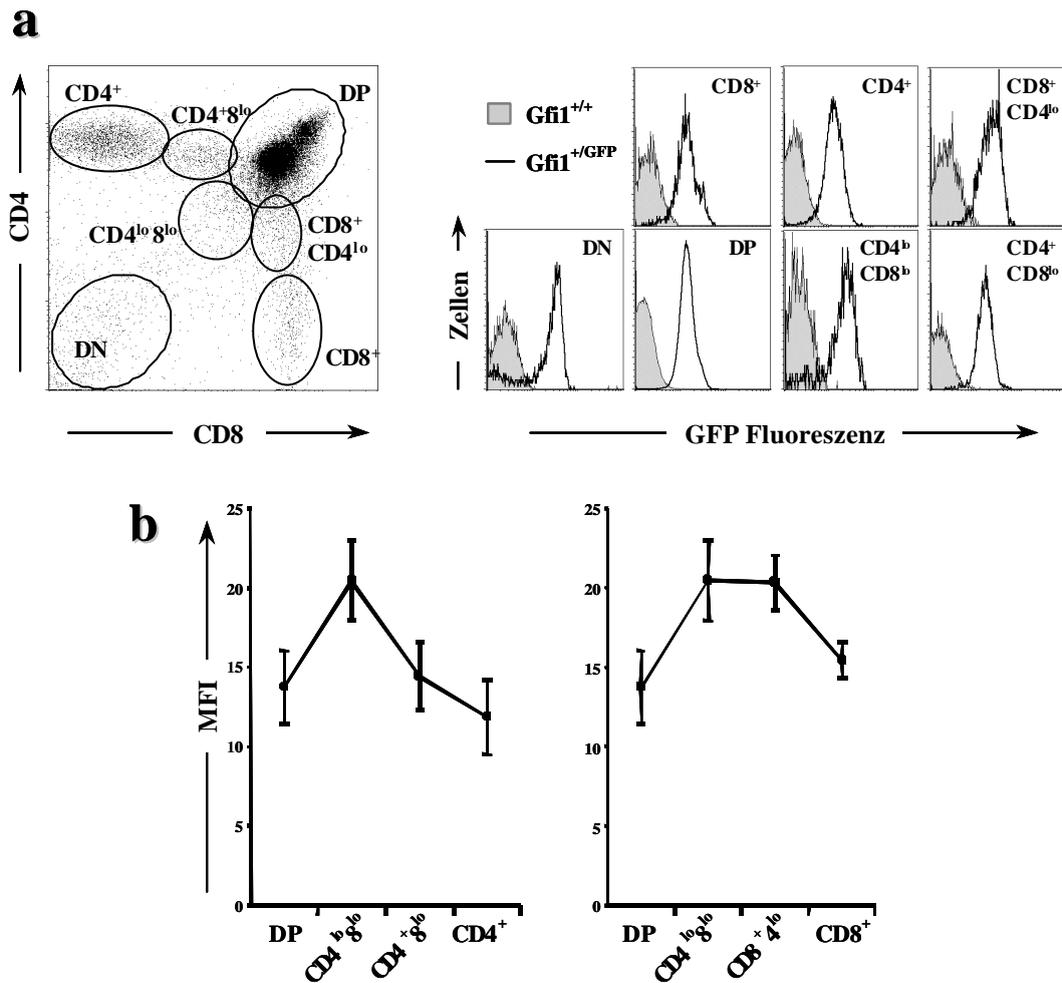


Abbildung 3.8: Gfi1:GFP Expression während der frühen T-Zellentwicklung und CD4/CD8-Liniendeterminierung

a. Durchflußzytometrische Darstellung von Thymozyten aus $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{+/GFP}$ nach Färbung mit α -CD4-PE und α -C8-APC. Die Thymozyten wurden nach Germain et al. (2002) elektronisch in 7 Populationen unterteilt und auf GFP Fluoreszenz hin untersucht. Repräsentative Histogramme zeigen die GFP Fluoreszenz in den jeweiligen Populationen.

b. Die graphische Zusammenfassung der MFI-Werte verdeutlicht die verstärkte Gfi1:GFP Expression in den $CD4^{lo}CD8^{lo}$ T-Zellpopulation, die der positiv/negativ Selektion unterliegen.

Als nächstes wurden die Zellen der DN-Thymozyten näher untersucht. Dazu wurden die Einzelzellsuspensionen aus $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{+/GFP}$ Thymi mit biotinylierten Linien-Antikörpern, die gegen alle Linienmarker (CD3, CD4, CD8, B220, Gr1, Ter119, Mac1) gerichtet waren, inkubiert und mit einem PerCP-Cy5.5 markierten Streptavidin gefärbt sowie mit Antikörpern gegen CD25 und CD44 behandelt. Alle PerCP-Cy5.5 negativen Zellen (Lin^-) wurden elektronisch markiert und deren CD25/CD44 Profil wurde dargestellt. In Abbildung 3.9a findet sich ein solches repräsentatives Profil der DN-Thymozyten. Die Messung der $Gfi1:GFP$ Fluoreszenz-Intensitäten in den jeweiligen DN-Subpopulationen zeigte eine stetige Zunahme der GFP Fluoreszenz während der DN-Entwicklung (Abb 3.9b).

Mit der β -Selektion einher geht ein Proliferationsschritt, der Expansion β -selektierter Zellen dient. Zur Analyse dieses Schrittes wurden DN3-Zellen (Abb. 3.9a) elektronisch markiert und deren Größenverteilung über das Vorwärtsstreulicht in einem Histogramm dargestellt (Abb.3.9b). Entsprechend der Publikation von Hoffman et al., (1996) wurde bei der WT-Probe die Verteilung zwischen E- und L-Zellen auf 85 % zu 15 % gesetzt. Die Analyse zeigte, dass die höchste Intensität der GFP Fluoreszenz während der Thymozyten-Entwicklung in den β -selektionierten L-Zellen innerhalb der DN3-Population bei einem MFI-Wert von ca. 40 liegt. Anschließend fiel dieser in der darauffolgenden DN4-Population, sowie in den DP-Zellen wieder auf einen MFI-Wert von ca. 25.

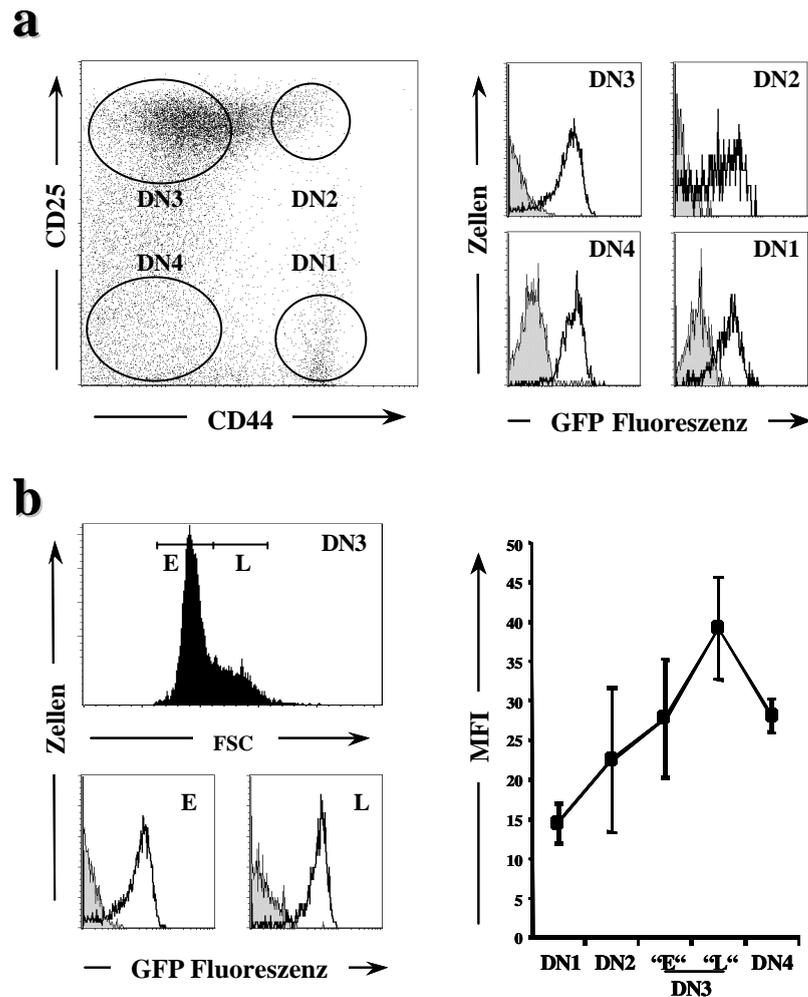


Abbildung 3.9: Gfi1:GFP Expression während der DN-Thymozyten-Differenzierung

a. Durchflußzytometrische Darstellung der DN-Thymozyten: Einzelzellsuspensionen von Thymozyten aus $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{+/GFP}$ Tieren wurden mit α -CD44-APC, α -CD25-PE und mit einem pool aus biotinylierten Linien-Antikörpern gefärbt. Gezeigt ist das CD44/CD25 Expressionsprofil elektronisch markierter Lin^{-} Thymozyten. Über die differentielle Expression von CD25/CD44 erfolgt die Unterteilung der DN Zellen in vier Subpopulationen entsprechend den eingezeichneten Bereichen. Repräsentative Histogramme zeigen die GFP Fluoreszenz in den jeweiligen DN-Populationen.

b. Zusätzliches elektronisches Markieren der $CD25^{+}CD44^{-}$ DN3-Population und Darstellung der jeweiligen Größenverteilung über den FSC. Die unterschiedliche Größe der DN3-Zellen erlaubte eine weitere Unterteilung in E- und L-Zellen. Der Bereich der E- und L-Zellen wurde elektronisch markiert und nach GFP Fluoreszenz gemessen. Die graphische Zusammenfassung der MFI-Werte zeigt, dass Gfi1 die höchste Expression in den β -selektionierten L-Zellen aufweist.

3.2 Untersuchung der Gfi1 Autoregulation mittels Gfi1:GFP knock-in Maus

3.2.1 Gfi1 Autoregulation während der Thymozyten-Entwicklung

Wie bereits erwähnt, zeigten Thymozyten aus homozygoten Gfi1:GFP knock-in Mäusen höhere GFP Fluoreszenz Intensitäts Werte als dieselben Populationen aus heterozygoten Gfi1:GFP knock-in Mäusen (Abb. 3.3). Dieser Befund legte nahe, dass am Gfi1 Locus ein Rückkopplungsmechanismus und eine Autoregulation der Gfi1 Expression existiert. Um diese Frage zu klären, wurden Kreuzungen der Gfi1:GFP knock-in Maus mit einer lck-Gfi1 transgenen Maus (Schmidt et al., 1998) durchgeführt, um somit eine konstitutive Gfi1 Expression in den T-Zellen der Gfi1^{GFP/GFP} knock-in Maus zu gewährleisten.

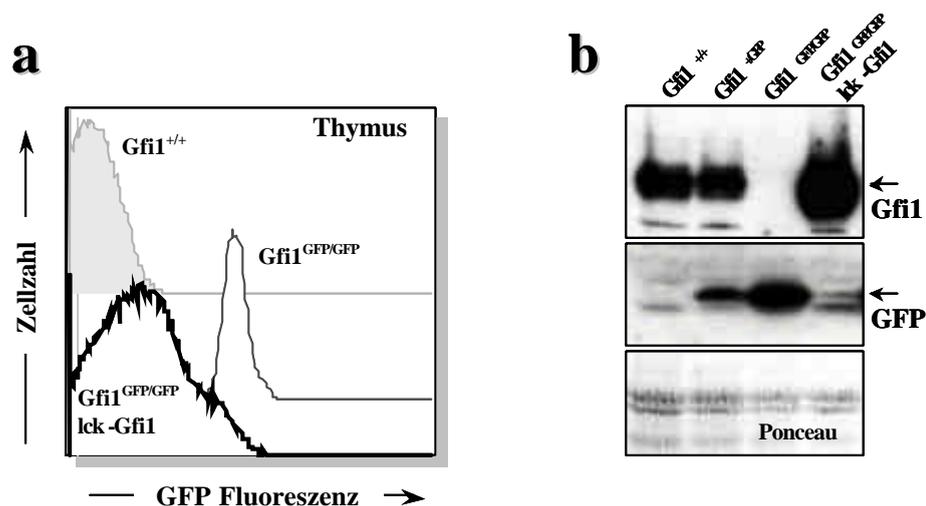


Abbildung 3.10: Gfi1 Autoregulation im Thymus

a. Repräsentatives FACS-Histogramm der GFP Fluoreszenz von gesamt Thymozyten aus Gfi1^{+/+} (gefüllte Kurve), Gfi1^{GFP/GFP} (dünne Linie) und lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} (dicke Linie) Tieren.

b. Nachweis von Gfi1 und GFP Protein. Aus Thymozyten der vier unterschiedlichen Genotypen Gfi1^{+/+}, Gfi1^{+/GFP}, Gfi1^{GFP/GFP} und lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} wurden Proteinextrakte gewonnen, 70 µg über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf NC-Membran transferiert. Der Nachweis von Gfi1 und GFP erfolgte durch Inkubation mit dem polyklonalen α-Gfi1 Serum und α-GFP.

Die Analyse der GFP Fluoreszenz im Thymus von lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Mäusen zeigte eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenz in Richtung niedriger MFI-Werte verglichen mit Gfi1^{GFP/GFP} Tieren (Abb. 3.10a). Die Verringerung der GFP Fluoreszenz deutete auf eine Herabsetzung der Gfi1 Expression in Anwesenheit des lck-Gfi1 Transgens hin. Die FACS-Daten wurden zusätzlich durch die Western-Analyse unterstützt (Abb. 3.10b). Hierzu wurden aus den Thymozyten der vier Genotypen Gfi1^{+/+}, Gfi1^{+GFP}, Gfi1^{GFP/GFP} und lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Proteinextrakte präpariert und auf Gfi1 Protein, sowie auf GFP Protein analysiert. Während in den homozygoten Gfi1^{GFP/GFP} Tieren eine hohe GFP Expression detektiert werden konnte, wurde dieses bei der Überexpression von Gfi1 in den lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Tieren fast vollständig supprimiert (Abb. 3.10b).

Zusätzlich zu GFP wurde die Menge an Gfi1 Protein in den vier Genotypen kontrolliert. Wie erwartet zeigten Wildtyp und Gfi1^{+GFP} heterozygote Mäuse die gleiche Expression an endogenem Gfi1, während in homozygoten Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Tieren kein Protein detektiert werden konnte. Eine deutlich verstärkte Gfi1 Proteinexpression konnte dagegen in Thymozyten von lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Mäusen (Abb. 3.10b) gemessen werden.

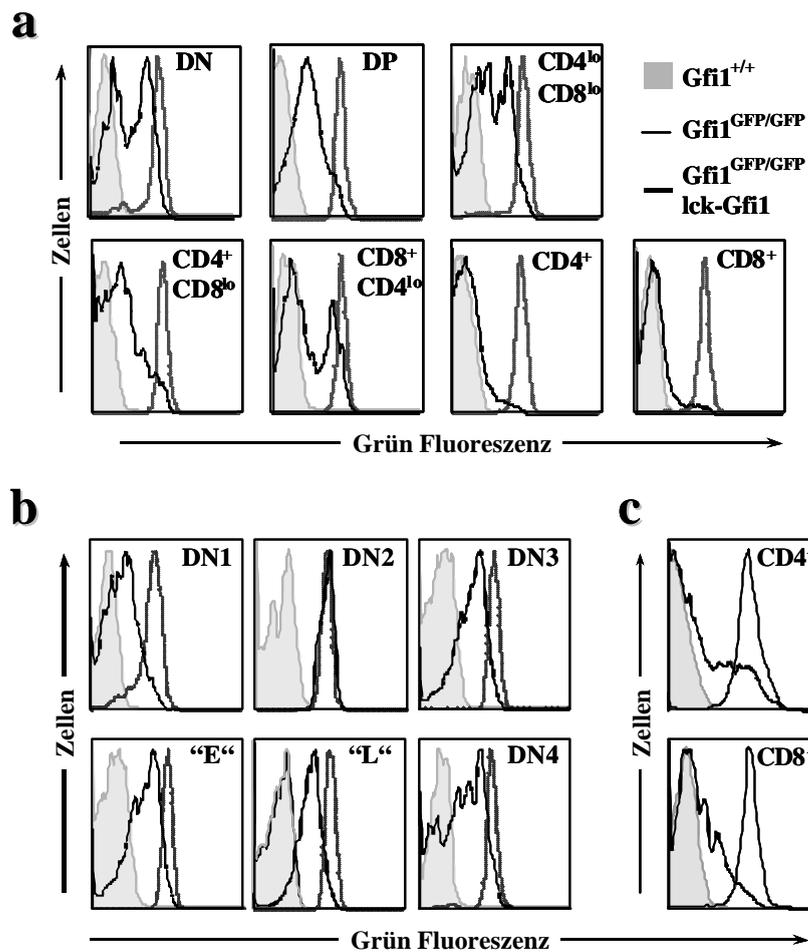


Abbildung 3.11: Gfi1 Autoregulation während der T-Zelldifferenzierung

a. Repräsentative FACS-Histogramme der Gfi1:GFP Fluoreszenz während der CD4/CD8-Thymozyten-Entwicklung: Thymozyten aus $Gfi1^{+/+}$ (gefüllte Kurve), $Gfi1^{GFP/GFP}$ (dünne Linie) und lck-Gfi1/ $Gfi1^{GFP/GFP}$ (dicke Linie) Tieren wurden mit α -CD4-PE und α -CD8-APC gefärbt und wie in Abb. 3.7 in 7 Populationen elektronisch aufgeteilt und nach GFP Fluoreszenz untersucht.

b. FACS-Histogramme der GFP Fluoreszenz während der DN-Entwicklung in den $Gfi1^{+/+}$ (gefüllte Kurve), $Gfi1^{GFP/GFP}$ (dünne Linie) und lck-Gfi1/ $Gfi1^{GFP/GFP}$ (dicke Linie) Mäusen. Die Lin^{-} -Thymozyten wurden über das CD44/CD25 Expressionsprofil wie in Abb. 3.8 elektronisch ausgewählt.

c. Gfi1 Autoregulation in den peripheren $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ -T-Zellen. Milzzellen aus den jeweiligen Mäusen wurden mit α -CD4-APC und α -CD8-PerCP-Cy5 gefärbt.

Um zu prüfen ob diese Autoregulation auf eine spezifische T-Zell-Subpopulation beschränkt ist, wurde untersucht in welchem Ausmaß die Verschiebung der GFP Fluoreszenz sowohl in den Populationen der Thymozyten-Differenzierung als auch in den peripheren T-Lymphozyten durch das transgene Gfi1 in den Gfi1^{GFP/GFP} Tieren beeinflusst wird. Es zeigte sich, dass in den CD4- und CD8-SP-T-Zellen, sowohl im Thymus, als auch in der Peripherie, eine fast komplette Supprimierung des Gfi1 Genlokus stattfindet (Abb. 3.11a, c), während die Reprimierung der GFP Fluoreszenz nur teilweise in den CD4⁺/CD8⁺-DP-Thymozyten vorhanden war bzw. unvollständig in den CD4^{lo}CD8^{lo}, CD4⁺CD8^{lo} und CD8⁺CD4^{lo} Subpopulationen zu sein schien (Abb. 3.11a).

Als nächstes sollte das Ausmaß der Autoregulation während der doppeltnegativen Thymozyten-Entwicklung näher betrachtet werden. Wie schon zuvor beschrieben erfolgt die Charakterisierung dieser Population hauptsächlich über die Expression der Oberflächenproteine CD25 und CD44. Ein repräsentatives Profil der DN-Thymozyten ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Auch die DN-Subpopulationen zeigten untereinander keine einheitliches autoregulatorisches Verhalten (Abb. 3.11b). In DN1- und DN3-Subpopulationen, somit auch in den „E“ und „L“-Zellen, konnte nur eine teilweise Verminderung der GFP Fluoreszenz durch das lck-Gfi1 Transgen beobachtet werden. Während das gleiche Verhalten der unvollständigen Supprimierung des Gfi1 Lokus auch in den DN4-Populationen stattfand, zeigten die DN2-Zellen in den lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Tieren keine Autoregulation (Abb. 3.11b).

3.2.2 Gfi1 bindet direkt an den Gfi1 Promotor in Thymozyten

Um der Frage nachzugehen ob Gfi1 durch direkte Bindung an den Gfi1 Promotor reguliert wird, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) aus den Thymozyten von Gfi1^{+/+} und Gfi1^{-/-} Tieren durchgeführt. Diese Technik ermöglicht Protein:DNA-Interaktionen im Zellkern nachzuweisen.

Der Gfi1 Promotor wurde bereits durch Scheijen et al. (1997) als genomische Region definiert, die stromaufwärts vor dem 5' Ende der Gfi1 cDNA lokalisiert ist. 5'RACE- und Primerextension-Experimente aus Prof. T. Möröys Gruppe führten zur Bestätigung des zuvor publizierten 5'Endes des Gfi1 cDNA.

Die in Abbildung 3.12a dargestellte potentielle Gfi1 Promotor Region wurde mit dem Programm „MatInspector“ (<http://genomax.gsf.de>, Version 2.2, Quandt et al., 1995) nach Gfi1 Bindemotiven („AATC“) abgesucht. Das Programm greift auf eine Datenbank zurück, in der Konsensus-Bindesequenzen (core-Matrix) für bekannte Transkriptionsfaktoren gespeichert sind und gibt die Kernsequenz-Ähnlichkeit in Prozent an. Die Analyse zeigte mehrere potentielle Bindungsorte mit hoher Kernsequenz-Ähnlichkeit für Gfi1. Entsprechend dieser Gfi1 Bindestellen wurden die Primerpaare für die PCR ausgewählt. Die Position der Gfi1 Bindungsorte und die benutzten Primerpaare Gfi1-I, Gfi1-II und Gfi1-III für die PCR, sowie die von Florian Heyd (AG Möröy, Institut für Zellbiologie) ermittelten Ergebnisse aus der Primer Extension und RACE Analyse sind in Abb. 3.12a zusammengefasst. Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität der α -Gfi1 Antikörper wurde eine PCR mit Primer gegen den CTLA4 Promotor durchgeführt (Abb. 3.12b).

Unter Nutzung der spezifischen Antikörper für Gfi1 konnte eine *in vivo* Bindung des Gfi1 an den eigenen Promotor im Thymus der Gfi1^{+/+} Maus nachgewiesen werden (Abb. 3.12b). Im Gegensatz dazu zeigte der parallel aufgearbeitete Thymus-Chromatinansatz der Gfi1-KO Maus nur ein Hintergrund PCR-Signal im Präzipitat, so dass eine vom Antikörper unabhängige Verschleppung genomischer DNA während der Aufarbeitung ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.11b).

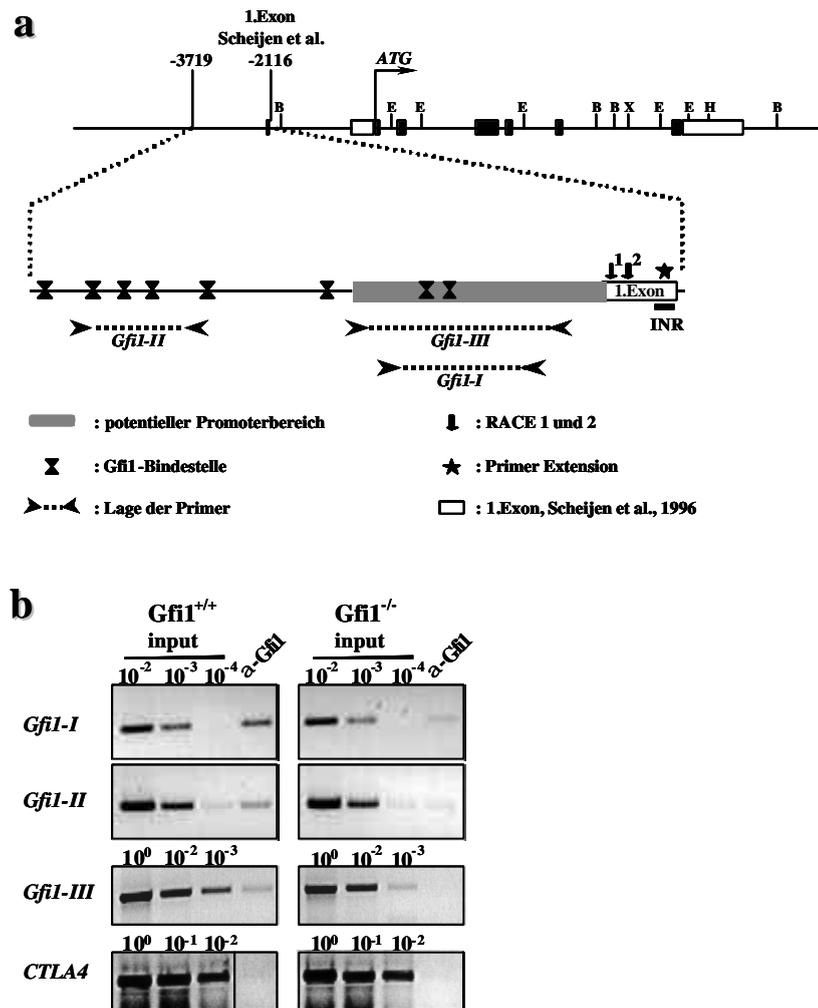


Abbildung 3.12: *in vivo* Nachweis der Gfi1-Bindung an den Gfi1-Promoter

a. Darstellung der putativen Gfi1-Bindungsstellen und des Gfi1 Promotors. Die Pfeile zeigen die Position der Gfi1 Primer, die für die Amplifizierung der Gfi1-Bindungsregionen bei den α -Gfi1 immunopräzipitierten Chromatin-DNA Proben eingesetzt wurden. Die Position der für die Primer Extension eingesetzten Antisense-Oligonukleotidprimer (*) sowie der RACE-Stelle (▼) sind eingezeichnet.

b. PCR Produkte der in a) abgebildeten Bereiche des Gfi1 Gens. Als Ausgang („input“) wurde ein Teil der mit Ultraschall zerkleinerten genomischen DNA vor der Immunopräzipitation aufgearbeitet und für die PCR eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine Probe der Gfi1-KO Maus, die parallel zur Immunopräzipitation aufgearbeitet wurde. Die DNA/Protein-Komplexe wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen Gfi1 immunopräzipitiert und die genomische DNA mit 3 verschiedenen Gfi1 spezifischen Primern amplifiziert. Als Kontrolle für die Spezifität der Gfi1-Bindestelle wurde die präzipitierte DNA mit CTLA4 spezifischen Primern amplifiziert. Die Produkte wurden in einem 2 % -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der Thymozyten-Entwicklung in Gfi1-defizienten Tiere

3.3.1 Gfi1 Verlust wirkt sich negativ auf die CD4-SP-Thymozyten-Entwicklung und beschleunigt die MHC-I restringierte positive Selektion der CD8-SP-T-Zellen

Bereits frühere Arbeiten aus der Gruppe von Prof. T. Möröy haben gezeigt, dass Gfi1^{-/-} Mäuse nur noch ca. 10 % der normalen Thymozytenzahl von ca. 2×10^8 Zellen aufweisen (Holger Karsunky, Doktorarbeit). Das CD4/CD8-Thymozyten Profil von Gfi1^{-/-} Tieren zeigte eine Verschiebung des CD4/CD8 Verhältnisses von 4:1 im Kontrolltier zu 1:1 in Gfi1^{-/-} Maus zu Gunsten der CD8-SP-Thymozyten. Auffällig war auch das Auftreten einer zusätzlichen CD4⁺/CD8^{lo} Population in den Gfi1-defizienten Tieren, welche im WT nicht vorkam. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der früheren Arbeiten aus der AG Möröy (Holger Karsunky, Doktorarbeit).

Dieses CD4/CD8 Bild des Thymus deutet auf eine Beeinflussung der Liniendeterminierung und somit auch auf die positive/negative Selektion durch Gfi1 hin. Der Selektionsprozeß findet innerhalb der DP-Population statt, die über differentiell exprimierte Oberflächenmoleküle erneut dargestellt werden kann.

Barthlott et al. (1997) bediente sich zur näheren Analyse der positiven/negativen Selektion sowie des Übergangs von DP- zu SP-Thymozyten, der Oberflächenmarker CD69, TCR β -Kette, sowie der beiden Korezeptoren CD4 und CD8. Um diese Differenzierungsschritte in den Wildtyp und der publizierten Gfi1^{-/-} Mäusen (Karsunky et al., 2002b) vor und nach der positiv/negativ Selektion zu untersuchen, wurden die isolierten Thymozyten mit α -CD4, α -CD8, α -CD69 und α -TCR β behandelt und anschließend durchflußzytometrisch auf ihre relative Häufigkeit hin analysiert.

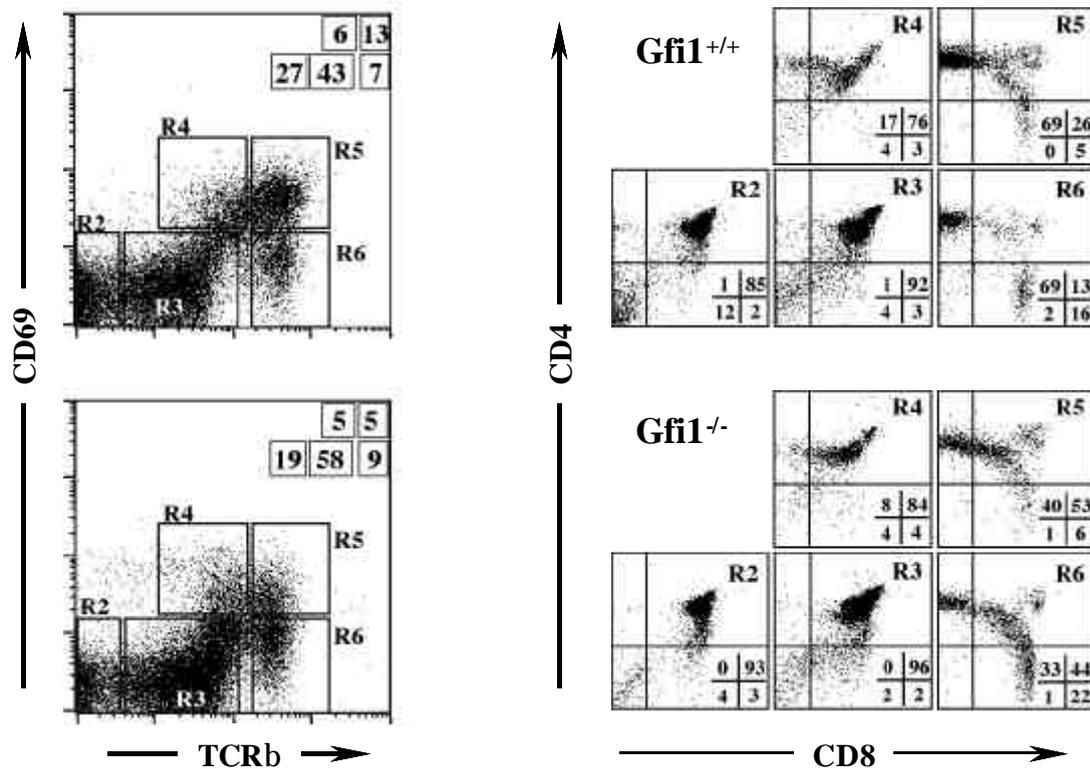


Abbildung 3.13: Darstellung der CD4/CD8 Thymozyten-Differenzierung mittels CD69 und TCR β Expressionsniveau

Die isolierten Thymozyten aus Gfi1^{+/+} und Gfi1^{-/-} Tieren wurden mit Antikörpern gegen CD69 (FITC), TCR β (PE), CD4 (PE) und CD8 (PerCP) gefärbt. Die Wildtyp-Kontrolle (oben) zeigt das für einen Thymus typische Bild einer CD69/TCR β Färbung und den CD4/CD8 Phänotyp der entsprechenden Regionen (R2-R6) nach Barthlott et al. (1997). Die Gfi1-KO Maus zeigte deutliche Unterschiede in der relativen Verteilung der Populationen. Die sequentielle Abfolge der Thymozyten-Differenzierung während der positiv/negativ Selektion vollzieht sich von R2 zu R6.

Über die differentielle Expression des CD69 Markers und der TCR β -Kette wurden somit folgende sequentielle Reifungsschritte definiert: R2: CD69⁻ TCR β ⁻; R3: CD69⁻ TCR β ^{int}; R4: CD69⁺ TCR β ^{int}; R5: CD69⁺ TCR β ^{hi} und R6: CD69⁻ TCR β ^{hi} (Abb. 3.13). Wählt man diese Thymozyten elektronisch aus und stellt die Expression von CD4/CD8 innerhalb dieser Populationen dar, erhält man ein Profil der Zellen, die gerade selektiert werden oder selektiert worden sind. Abbildung 3.13 zeigt eine solche Darstellung.

Die Analyse zeigte eine deutliche Reduktion der $CD69^+ TCR\beta^{hi}$ (R5) Zellen von 13 % im WT zu 5 % in der $Gfi1^{-/-}$ Maus, während der prozentuale Anteil der $CD69^+ TCR\beta^{int}$ (R4) Thymozyten gleich blieb. Es wurde ersichtlich, dass der überwiegende Teil der $CD69^+ TCR\beta^{int}$ (R4) und der $CD69^+ TCR\beta^{hi}$ (R5) Zellen gerade selektiert wird und vor allem der $CD4^{lo}CD8^{lo}$ Population zugehörig ist oder bereits die CD4 SP Richtung vor der CD8-Linie eingeschlagen hat.

Diese Abfolge der Liniendeterminierung fand zwar ebenfalls in der $Gfi1^{-/-}$ Maus statt, allerdings war die relative Häufigkeit der CD4 SP Thymozyten während des Differenzierungsprozesses in R4 bis R6 deutlich vermindert (Abb. 3.13), während die zusätzliche $CD4^+CD8^{lo}$ Population in R5 und R6 wieder verstärkt auffiel. Eine Anhäufung dieser Zellen könnte also auf eine Entwicklungsblockade der letzten Differenzierungsschritte, der positiv/negativ Selektion und der CD4/CD8-Liniendeterminierung, hindeuten. Dies hätte eine veränderte Linienentscheidung zugunsten der CD8 SP-Zellen in den $Gfi1$ -defizienten Tieren zur Folge.

Als nächstes sollte die direkte Auswirkung der $Gfi1$ Deletion auf die positive Selektion DP-Thymozyten durch Kreuzungen der $Gfi1$ -KO Tiere mit HY-TCR transgenen Tieren untersucht werden. Der HY-TCR transgene Mausstamm ist eines der am besten charakterisiertesten Mausmodelle zur Erforschung der positiv/negativ Selektion. Diese transgenen Mäuse exprimieren einen transgenen T-Zellrezeptor (TCR), der ein spezifisches, Y-chromosomal kodiertes Peptid erkennt, welches durch das MHC-I Molekül H-2Db präsentiert wird (Kisielow et al., 1988). DP-Thymozyten der männlichen H-2Db Mäuse, die das HY-Antigen exprimieren und somit dem transgenen TCR präsentieren, werden aufgrund der starken Avidität des HY-TCR-Komplexes negativ selektiert und werden deletiert. Hingegen führt das Fehlen des HY-Antigens bei der weiblichen H-2Db Maus verstärkt zur positiven Selektion der DP-Thymozyten in Richtung $CD8^+$ -SP-T-Zellen. Die Expression des HY-TCR in den HY-TCR Tieren kann durch die Bindung des monoklonalen Antikörpers T3.70 an die $HY\alpha$ -Kette untersucht werden (Teh et al., 1988, 1989).

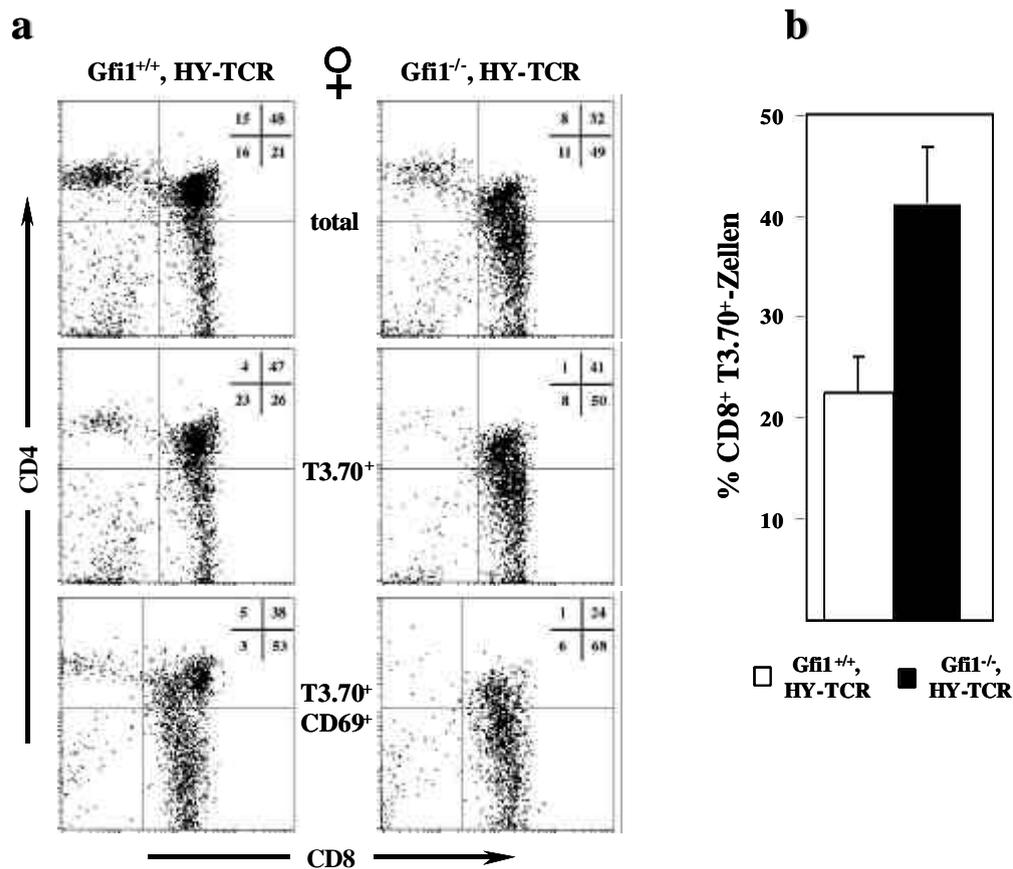


Abbildung 3.14: FACS-Analyse der positiven Selektion bei den HY-TCR Mäusen

a. Repräsentative Dot Plot Darstellung der CD4/CD8-Thymozyten-Entwicklung bei weiblichen Mäusen: Die isolierten Thymozyten aus Gfi1^{+/+}, HY-TCR und Gfi1^{-/-}, HY-TCR Tieren wurden mit α -CD4-PE, α -CD8-TC, α -CD69-FITC sowie einem biotinyliertem α -HY α (T3.70) und einem SA-FITC markiert. Die HY-TCR transgene Kontrolle (links) zeigt das für einen Thymus typische Bild einer CD4/CD8 Färbung und deren prozentuale Verteilung der Populationen in den entsprechenden Quadranten.

b. Zusammenfassende statistische Auswertung der prozentualen Anteile der CD8⁺/T3.70⁺ Thymozyten aus je 4 Gfi1^{+/+}, HY-TCR und Gfi1^{-/-}, HY-TCR Tieren.

Auch hier, genau wie bei der Gfi1-KO Maus, spiegelte sich die stark reduzierte Thymozytenzahl der Gfi1-defizienten HY-TCR Mäuse wider im Vergleich zum transgenen Kontrolltier (Daten nicht gezeigt). Basierend auf der differentiellen Expression von CD4, CD8 und CD69 wurden die Thymozyten der Gfi1^{+/+}, HY-TCR und Gfi1^{-/-}, HY-TCR transgenen Tiere untersucht. Zusätzlich wurde zur Identifizierung der positiv selektionierten MHC-I restringierten Thymozyten der Antikörper (T3.70) gegen das HY α benutzt. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, zeigten die transgenen HY-TCR Mäuse, sowohl das Kontrolltier, als auch die Gfi1^{-/-} transgenen Tiere, bevorzugte Thymozyten-Differenzierung in Richtung CD8⁺-SP-T-Zellen. Dieser Effekt der MHC-I Restriktion wird allerdings durch den Verlust von Gfi1 in den HY-TCR Mäusen deutlich verstärkt.

In weiblichen $Gfi1^{-/-}$, HY-TCR Mäusen stieg der prozentuale Anteil der $CD8^{+}$ -SP-T-Zellen von 21 % auf 49 % bezogen auf die Gesamtzahl an Thymozyten und von 26 % auf 50 % der elektronisch ausgewählten $T3.70^{+}$ Thymozyten (Abb. 3.14a und b). Diese Tatsache der Überrepräsentierung von $CD8^{+}$ T-Zellen in den $Gfi1$ -defizienten HY-TCR transgenen Mäusen blieb auch bei der positiv selektionierten $T3.70^{+} CD69^{+}$ Population erhalten (Abb. 3.14a). Die statistische Auswertung der $CD8^{+} T3.70^{+}$ Thymozyten von je 4 Tieren der entsprechenden Genotypen und die graphische Darstellung in der Abbildung 3.14b zeigte eine Verdoppelung der $CD8^{+}$ -SP-T-Zellen in den $Gfi1$ -KO Tieren.

Die Überprüfung der HY-TCR $V\beta 8$ und $V\alpha 3$ Expression auf den Thymozyten der $Gfi1^{-/-}$ -HY-TCR transgenen Mäusen, sowohl auf gesamten Thymozyten, als auch auf $CD8^{+}$ SP Zellen, lieferte den gleichen $V\beta 8 / V\alpha 3$ Expressionlevel verglichen mit den Kontrolltieren, so dass eine gestörte HY-TCR Expression in den $Gfi1$ -defizienten Mäusen ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Auffallend war, dass in den $Gfi1$ -defizienten HY-TCR Mäusen der prozentuale Anteil der $V\beta 8^{+}$ und $V\alpha 3^{+}$ Zellen innerhalb der $CD8^{+}$ oder der gesamten Thymozyten bei nahezu 100 % lag, der signifikant höher war als der der Kontrolltiere (Daten nicht gezeigt).

Um weitere Einblicke in den Mechanismus der durch den $Gfi1$ Verlust beeinträchtigte positive Selektion während der Thymozyten-Differenzierung zu erhalten, wurde die Proliferationsrate der unterschiedlichen $CD4/CD8$ Subpopulationen untersucht. Während der Proliferationsrate von Zellen erfolgt eine Verdoppelung der DNA innerhalb der Synthesephase. Der Einbau von 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) während dieser S-Phase in die neusynthetisierte DNA ermöglicht daher die Bestimmung der Proliferationsrate über die FACS-Messung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen das Brom. Hierzu wurde das BrdU am Tag 0 zunächst intraperitoneal in $Gfi1^{+/+}$ sowie $Gfi1^{-/-}$ Mäuse injiziert und anschließend in einem Zeitraum von 3 Tagen über das Trinkwasser zugeführt. Für die statistische Auswertung wurden für jeden Zeitpunkt je 3 Tiere der jeweiligen Genotypen untersucht. Die Thymozyten wurden mit $CD4$ und $CD8$ Antikörpern inkubiert, fixiert, permeabilisiert und anschließend mit FITC konjugiertem α -BrdU behandelt. $CD4/CD8$ -Populationen wurden nach Germain (2002) ausgewählt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.15 als graphische Darstellung wiedergegeben.

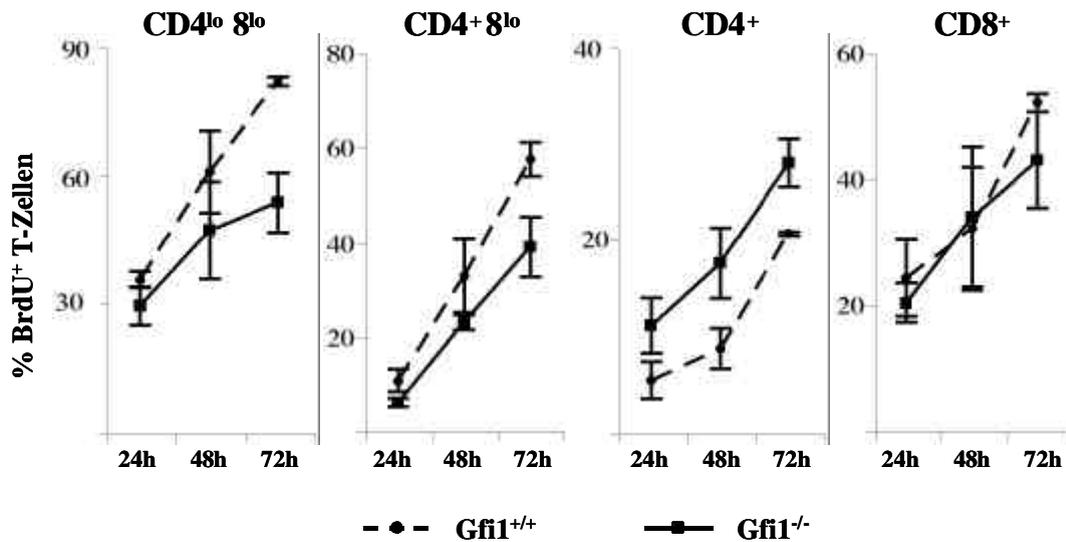


Abbildung 3.15: Bestimmung der Proliferationsrate durch BrdU-Einbau

BrdU (1,8 mg) wurde mit 200 μ l PBS am Tag 0 intraperitoneal injiziert und kontinuierlich über einen Zeitraum von drei Tagen zu 1mg/ml mit dem Trinkwasser zugeführt. Die isolierten Thymozyten aus Gfi1^{+/+} (gestrichelte Linie mit Kreis) und Gfi1^{-/-} (durchgezogene Linie mit Quadrat) Tiere wurden mit Antikörpern CD4 (PE), CD8 (PerCP) gefärbt, fixiert, permeabilisiert und darauf folgend mit α -BrdU (FITC) gefärbt. Die elektronische Auswahl der CD4/CD8-Populationen erfolgte nach Germain (2002). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an BrdU positiver Zellen der aufgeführten CD4/CD8-Thymozyten, aufgetragen gegen die Zeit auf der X-Achse. Angegeben sind immer die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardfehlerabweichung.

DN, DP und CD4^{lo}CD8⁺ und CD8⁺ SP Thymozyten von WT und Gfi1-KO Mäusen zeigten in ihrem Proliferationsverhalten keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht gezeigt und Abb. 3.15). Während ein niedrig proliferatives Potential in CD4^{lo}CD8^{lo} und CD4⁺CD8^{lo} Populationen der Gfi1-KO Tiere festgestellt wurde (Abb. 3.15). Somit konnte die nahe gelegene Erklärung ausgeschlossen werden, dass der hohe relative Anteil an CD8⁺-SP-T-Zellen bei den Gfi1-Mangelmutanten die Folge einer erhöhten Proliferationsrate sei.

3.3.2 Mangel an Gfi1 führt zur Apoptose bei proliferierenden DN/c-Kit⁺ Thymozyten

Eine der charakteristischen Folgen der Gfi1 Defizienz ist die makroskopisch deutliche Reduktion der Thymozytenzahl (Daten nicht gezeigt). Expansion oder Verlust von bestimmten Thymozyten Subpopulationen sind meistens Auswirkungen einer Regulationsstörung der Zellproliferation und des programmierten Zelltodes (Apoptose).

Die Veränderung der Morphologie apoptotischer Zellen lässt sich in der Durchflußzytometrie durch das Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Profil darstellen. Sie sind gekennzeichnet durch eine geringere Größe und zum Teil auch durch eine verstärkte Granularität. Ein weiteres, häufig verwendetes Apoptose-Testverfahren, für das ebenfalls die Durchflußzytometrie genutzt wird, ist der AnnexinV-Test. In früheren Apoptosestadien findet eine Translokation von Phosphatidylserin (PS), das normalerweise nur auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Membran statt. AnnexinV ist ein Phospholipid bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS. Daher kann Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes AnnexinV als empfindliches Nachweismolekül für die Exposition von PS, und somit auch für apoptotischer Zellen, verwendet werden.

Befunde aus vorangegangenen Arbeiten der AG Möröy zeigten, dass der Thymus der Gfi1^{-/-} Mäuse sich durch eine sehr heterogene Region von FSC/SSC-Signalen mit geringerer Intensität im Vergleich zu Gfi1^{+/+} Thymus auszeichnet. Diese breite Wolke erstreckt sich mit hohem prozentualem Anteil im Bereich der kleineren Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Werten, die vermutlich tote Zellen und Zelldebris darstellen. Weitere Apoptose-Untersuchung der Thymozyten von Gfi1^{+/+} und Gfi1^{-/-} Mäusen über die Propidiumiodid- und AnnexinV-Färbung legten nahe, dass die Thymozyten durch den Gfi1 Verlust apoptotisch bzw auch nekrotisch werden und sich akkumulieren (Holger Karsunky, Doktorarbeit).

Auch hier wurde die oben beschriebene Morphologie sowie die erhöhte AnnexinV⁺ Zellen innerhalb Gfi1^{-/-} Thymozyten beobachtet werden. Die Abbildung 3.16 zeigt exemplarisch das Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Profil zusammen mit AnnexinV-FITC von Thymozyten in einem 3D-FACSPlot.

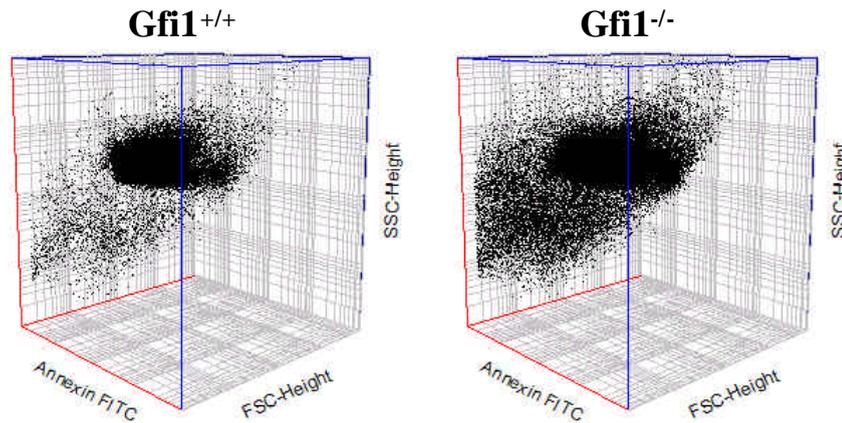


Abbildung 3.16: 3D-Darstellung apoptotischer Thymozyten

Thymozyten von $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{-/-}$ Mäusen wurden mit AnnexinV-FITC markiert, durchflußzytometrisch gemessen und anschließend zusammen mit den Parametern der Morphologie über das Vorwärts- (FSC-Height) und Seitwärtsstreulicht (SSC-Height) in einer 3D-Graphik analysiert.

Als nächstes sollte der AnnexinV-Test bei den CD4/CD8-Subpopulationen durchgeführt werden. Dazu wurden die Thymozyten zusammen mit CD4-PE und CD8-PerCP zusätzlich mit AnnexinV-FITC Konjugaten inkubiert.

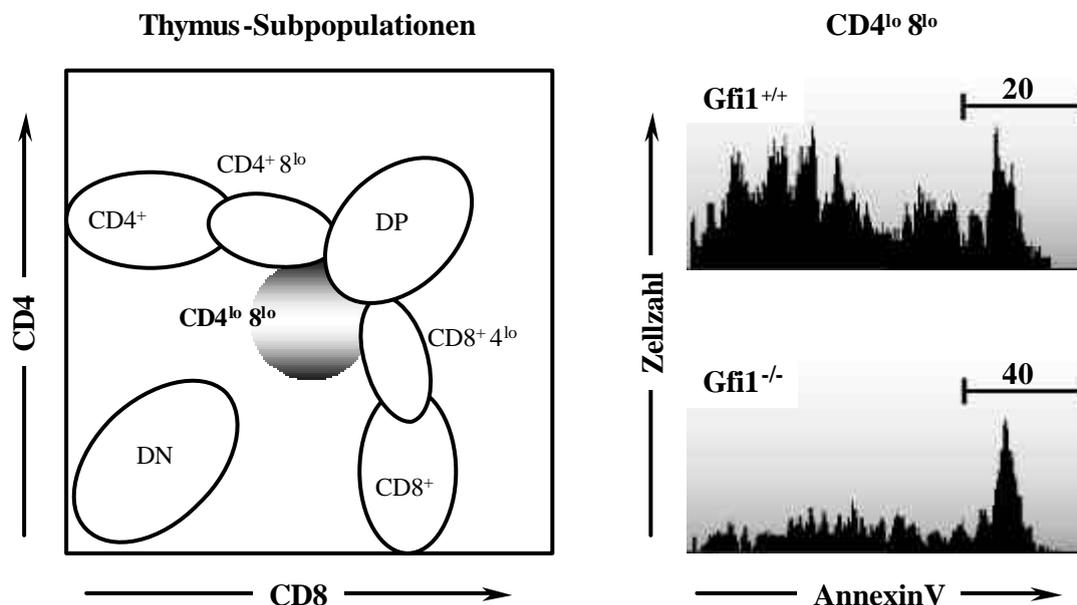


Abbildung 3.17: Analyse von Thymozyten auf Apoptose

Thymozyten von $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{-/-}$ Mäusen wurden mit CD4-PE, CD8-PerCP und AnnexinV-FITC inkubiert, anschließend durchflußzytometrisch gemessen. Elektronisches Markieren der CD4/CD8 der intakten T-Zellen erfolgte nach Germain (2002). Die über den Histogrammen aufgeführten Zahlen sind prozentuale Anteile der AnnexinV⁺ Zellen. Die Analyse verdeutlichte die Zunahme der AnnexinV⁺ Zellen innerhalb der CD4^{lo}CD8^{lo} Population in der $Gfi1$ -KO Maus.

Die Analyse zeigte, dass die $CD4^{lo}CD8^{lo}$ Population in der Gfi1-defizienten Mäusen einen deutlich erhöhten Anteil an AnnexinV⁺ Zellen und somit einen signifikanten Unterschied gegenüber der WT-Population aufwies (Abb. 3.17). Die Fraktion der AnnexinV⁺ Zellen innerhalb der Population bei der Gfi1-KO Maus machte 40 % aus im Vergleich zu 20 % bei der WT Maus (Abb.3.17).

Da wichtige Überlebenssignale bei proliferierenden Thymozyten von IL-7R und c-Kit ausgehen, wurde das apoptotische Verhalten der c-Kit positiven Thymozyten näher betrachtet:

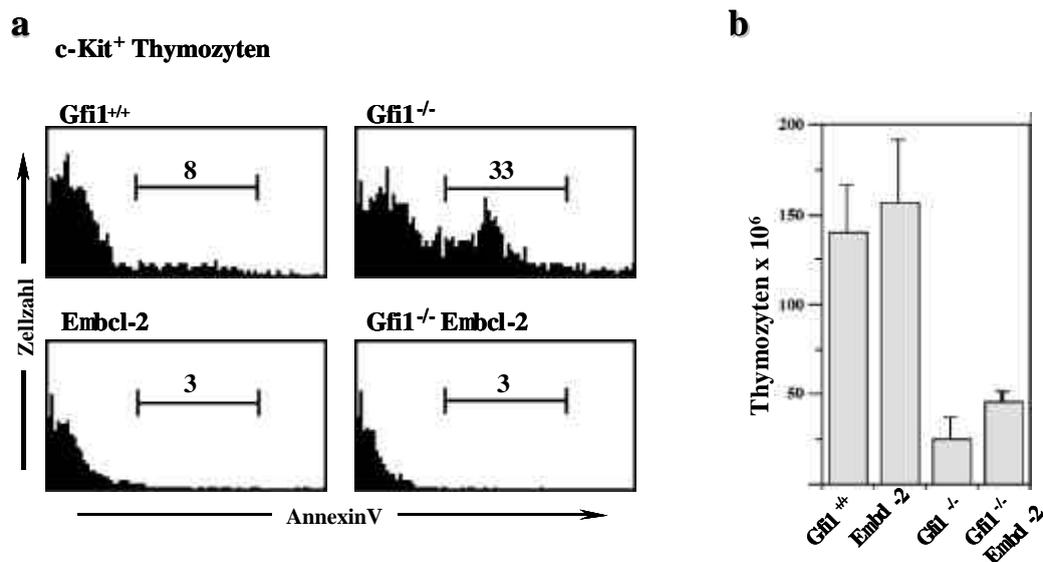


Abbildung 3.18: Apoptose-Untersuchung bei den c-Kit positiven Thymozyten

a. Färbung der Thymocyten mit α -c-Kit-PE und AnnexinV-FITC: Elektronisches Markieren der c-Kit exprimierenden Zellen und anschließende Analyse AnnexinV positiver Zellen zeigte die starke Zunahme an apoptotischen Zellen innerhalb der c-Kit⁺ Population in Gfi1^{-/-}. Deutlich wird auch der Rückgang der c-Kit⁺ apoptotischer Zellen durch bcl-2 Koexpression.

b. Die Darstellung der absoluten Thymozytenzahlen von 46 Wochen alten Tieren der Genotypen Gfi1^{+/+}, Eµbcl-2, Gfi1^{-/-} und Gfi1^{-/-}Eµbcl-2.

Die Befunde von Holger Karsunky (Doktorarbeit) ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen der WT und Gfi1^{-/-} Maus in der AnnexinV-Färbung innerhalb der c-Kit⁺ Population. Dabei konnte eine drastische Zunahme der AnnexinV⁺ Zellen in der Gfi1^{-/-} Maus im Vergleich zur WT-Kontrolle gezeigt werden, die hier ebenfalls analysiert wurde (Abb. 3.18a).

Zur weiteren Klärung der Frage, ob Apoptose im Gfi1^{-/-} Mausmodell eine Rolle spielt, wurde ein transgenes Mausmodell, welches das anti-apoptotische Protein Bcl-2 unter dem Eµ-Promotor in T-Zellen überexprimiert (Eµbcl-2, Strasser et al., 1991) eingesetzt. Das

Produkt des Protoonkogens Bcl-2 schützt Zellen gegen eine Reihe von physiologisch oder experimentell angelegten Apoptose-Stimulantien (Strasser et al., 1991). Um somit die mögliche Funktion von Gfi1 bei apoptotischen Mechanismen zu untersuchen, wurden Kreuzungen der Gfi1^{-/-} Tiere mit Eµbcl-2 transgenen Tieren vorgenommen.

Die Ergebnisse, dargestellt in der Abbildung 3.18a, zeigten, dass Bcl-2 Koexpression in der Gfi1-KO Maus die Apoptose der c-Kit⁺ Thymozyten unterdrückt. Die AnnexinV⁺ Zellen innerhalb der c-Kit⁺ Thymozyten werden durch die Einführung des Bcl-2 in die Gfi1^{-/-} Tiere auf einen Wert von 3% stark reduziert (Abb. 3.18a). Allerdings hatte die Bcl-2 Überexpression keinen Effekt auf die Thymusgröße und somit auch keine signifikante Veränderung der Thymozytenzahl zur Folge im Vergleich zu den Gfi1-defizienten Tieren (Abb. 3.18b). Um festzustellen, ob die stark reduzierten CD4⁻CD8⁻ Zellen (DN) innerhalb c-Kit⁺ Population in Gfi1^{-/-} Thymozyten (Holger Karsunky, Doktorarbeit), durch die Koexpression von Bcl-2 in den Gfi1^{-/-} Mäusen ebenfalls wiederhergestellt wird, wurden die c-Kit⁺ Zellen von Gfi1^{-/-} Eµbcl-2 transgenen Mäusen nach ihrem CD4/CD8 Expressionsprofil analysiert.

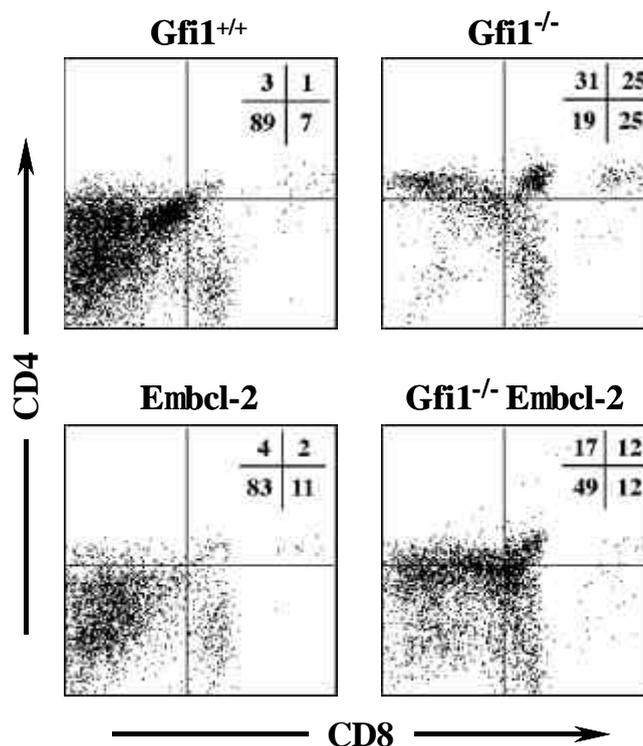


Abbildung 3.19: CD4/CD8 Expressionsprofil innerhalb der c-Kit⁺-Thymozyten

Isolierte Thymozyten der Gfi1^{+/+}, Eµbcl-2, Gfi1^{-/-} und Gfi1^{-/-}Eµbcl-2 Tiere wurden mit CD4-TC, CD8-FITC und c-Kit-PE Antikörper gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Gezeigt ist das CD4/CD8-Profil der elektronisch ausgewählten c-Kit⁺-Zellen. Deutlich wird der Verlust der DN-Population innerhalb der c-Kit⁺-Zellen in der Gfi1-KO Maus zu Gunsten der CD4- und CD8-SP-T-Zellen.

Diese Untersuchung ergab, dass die dezimierte $c\text{-Kit}^+$ DN-Subpopulation in der $Gfi1^{-/-}$ Maus von 19 % auf 49 % durch die Bcl-2 Koexpression in den $Gfi1^{-/-}$ Eubcl-2 transgenen Mäusen erhöht wird (Abb. 3.19).

Wie in der Einleitung erläutert, wird $c\text{-Kit}$ von der Mehrzahl der DN-Thymozyten exprimiert. Um die Apoptose bei den $c\text{-Kit}^+$ DN näher zu betrachten, wurde der Anteil an AnnexinV positiven Zellen innerhalb der $Lin^-c\text{-Kit}^+$ Thymozyten untersucht. Diese lassen sich im FACS durch Inkubation der Thymozyten mit $\alpha\text{-c-Kit}$ und mit einem Antikörper-Mix gegen Linien spezifische Oberflächenmoleküle (CD3, CD4, CD8, Pan-NK, Gr-1, B220, Mac-1 und Ter-119) sowie AnnexinV darstellen.

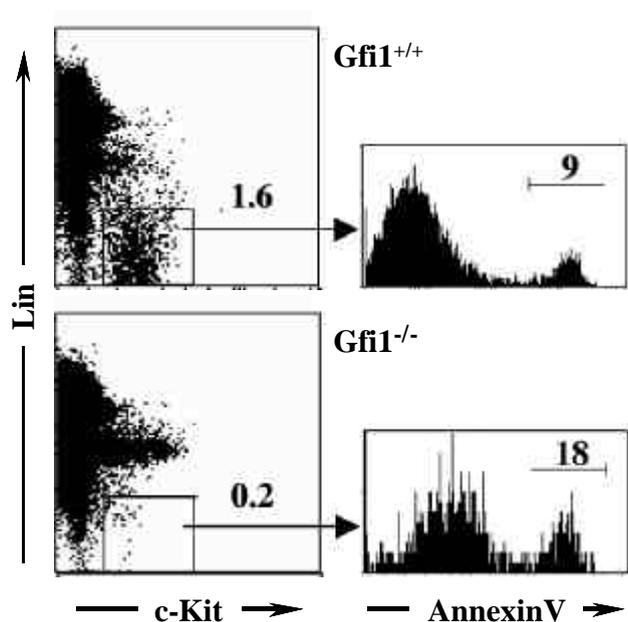


Abbildung 3.20: Untersuchung der $Lin^-c\text{-Kit}^+$ Thymozyten

Isolierte Thymozyten aus $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{-/-}$ Tieren wurden mit $\alpha\text{-c-Kit-PE}$, AnnexinV-FITC und einem Mix aus biotinyliertem Linien-Antikörpern (CD3, CD4, CD8, Pan-NK, Gr-1, B220, Mac-1 und Ter-119) sowie Streptavidin-PerCP-Cy5.5 als Zweitreagenz inkubiert und durchflußzytometrisch analysiert.

Aus der Analyse geht hervor, dass die Subpopulation der $c\text{-Kit}$ exprimierenden Lin^- Zellen in $Gfi1^{-/-}$ Thymozyten als Folge möglicher Apoptose sehr stark reduziert ist. Es zeigte sich, dass sich diese Population im $Gfi1^{-/-}$ deutlich stärker mit AnnexinV färben ließ als in der WT-Kontrolle: von 9 % im WT auf 18 % im $Gfi1\text{-KO}$ (Abb. 3.20).

3.3.3 Gfi1 Verlust führt zu Defekten in der frühen T-Zellentwicklung

Die durch den Gfi1 Mangel hervorgerufene Reduktion der Thymozyten-Populationen legte nahe, dass die Defekte bereits in den frühen Populationen der DN-Thymozyten liegen. Die Analyse der Expression des c-Kit Moleküls, sowohl in der Gesamtpopulation der Thymozyten, als auch in der Lin-negativen Thymozyten (DN) der Gfi1^{-/-} Mäuse deutete bereits durch die Reduktion der c-Kit⁺ Zellen auf eine Wirkung von Gfi1 in die frühen T-Zell Differenzierung. Bereits vorangegangene Experimente zeigten, dass insbesondere die prozentualen Anteile der DN2, DN3 und DN4 in der Gfi1-defizienten Maus deutlich reduziert sind. Eine weitere, dramatische Auffälligkeit in der Gfi1 Mangelmutante war die neue, gut abgrenzbare CD44^{hi} CD25^{int} Subpopulation (Holger Karsunky, Doktorarbeit).

Als nächstes wurde hier eine Vierfarben-FACS-Analyse zur Ermittlung der apoptotischen Zellen innerhalb der DN-Subpopulationen durchgeführt. Wie in der Einleitung beschrieben, kann diese Population der DN-Thymozyten, auch Lin-negativ (Lin⁻) genannt, aufgrund ihrer Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CD44 in weitere vier Subpopulationen unterteilt werden. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus WT und Gfi1^{-/-} Thymi mit biotinylierten Lin-Antikörpern sowie Streptavidin-PerCP als Zweitreagenz gefärbt, in der FACS-Analyse alle PerCP-Cy5.5 negativen Zellen markiert, und deren CD25/CD44 Profil über zwei weitere Fluoreszenzen dargestellt. Anschließend wurden die AnnexinV⁺ Zellen innerhalb der DN-Subpopulationen ermittelt. Für eine genaue statistische Auswertung wurden jeweils neun 4 – 6 Wochen alte Tiere der Genotypen Gfi1^{+/+} und Gfi1^{-/-} benutzt.

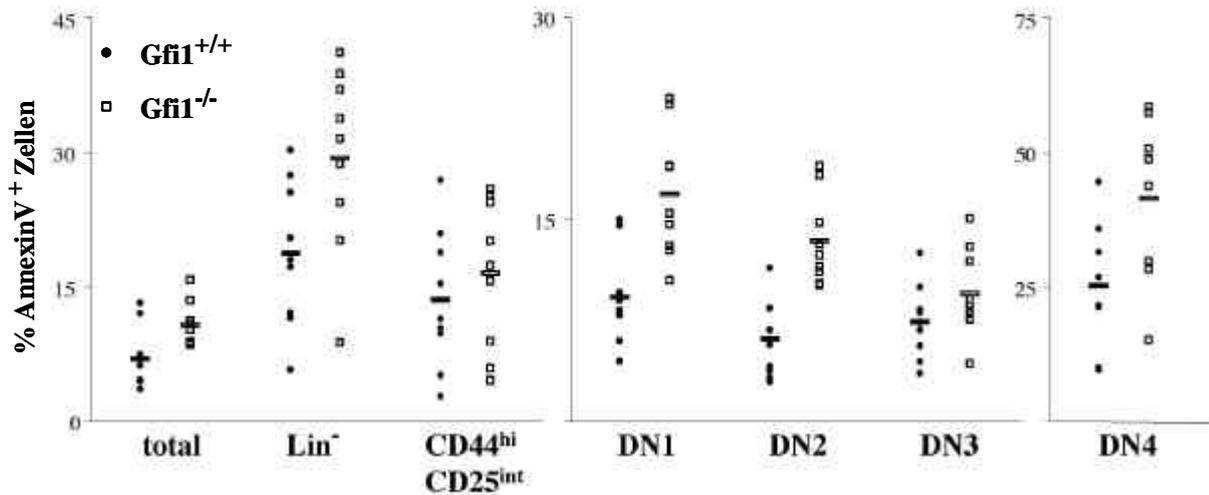


Abbildung 3.21: Analyse der Apoptose bei den Lin⁻ Subpopulationen

Graphische Darstellung der AnnexinV positiven Zellen innerhalb der Lin⁻ Subpopulationen aus individuellen 46 Wochen alten Tieren der Genotypen Gfi1^{+/+} und Gfi1^{-/-}. Isolierte Thymozyten wurden mit α -CD25-PE, α -CD44-APC, AnnexinV-FITC und einem Mix aus biotinyliertem Linien-Antikörpern sowie Streptavidin-PerCP-Cy5.5 als Zweitreagenz inkubiert und durchflußzytometrisch analysiert. Gezeigt sind die relativen Anteile der AnnexinV positiven Zellen aus CD44/CD25-Profil elektronisch markierten Lin⁻-Thymozyten. Der Querbalken markiert den Mittelwert aus 9 einzelnen Individuen des jeweiligen Genotyps.

Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis dieser Analyse und verdeutlicht, dass sich tendenziell relativ mehr Zellen aus dem Gfi1^{-/-} Thymus im Vergleich zum WT mit AnnexinV anfärben ließen. Ein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO war jedoch nur in den DN1- sowie DN2-Populationen zu erkennen. Der durchschnittliche relative Anteil an AnnexinV⁺ Zellen innerhalb der DN1-Thymozyten lag im KO Maus $16,8 \pm 4,8 \%$ und im WT $9,1 \pm 3,5 \%$. Innerhalb der DN2-Population beträgt die Häufigkeit AnnexinV⁺ Zellen im KO $13,3 \pm 3,3 \%$ sowie im WT $6 \pm 2,9 \%$ (Abb. 3.21). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen beiden Genotypen wurde statistisch ermittelt (Student's t-Test). Der Test ergab eine Signifikanz von 0,05 für beide Populationen und ein p-Wert von 0,004 für den Unterschied innerhalb der DN1-Thymozyten und 0,001 innerhalb der DN2-Population. Alle anderen untersuchten Populationen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Färbung mit AnnexinV (Abb. 3.21).

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass besonders die c-Kit exprimierenden Thymozyten vom Verlust an Gfi1 betroffen sind. Da wichtige Proliferationssignale von IL-7R und c-Kit, insbesondere während der frühen T-Zellentwicklung, ausgehen, und sich die Expression der

beiden entsprechenden Rezeptoren größtenteils überschneidet, wurde deren Expression auf den DN-Thymozyten der beiden Genotypen $Gfi1^{+/+}$ und $Gfi1^{-/-}$ im einzelnen durchflußzytometrisch näher untersucht. Um die c-Kit sowie IL-7R Expression bei den einzelnen DN-Subpopulationen festzustellen, wurden die Lin-negativen Thymozyten nach CD44/CD25-Profil dargestellt und anschließend die Expression beider Rezeptoren in den elektronisch markierten CD44/CD25-Populationen analysiert.

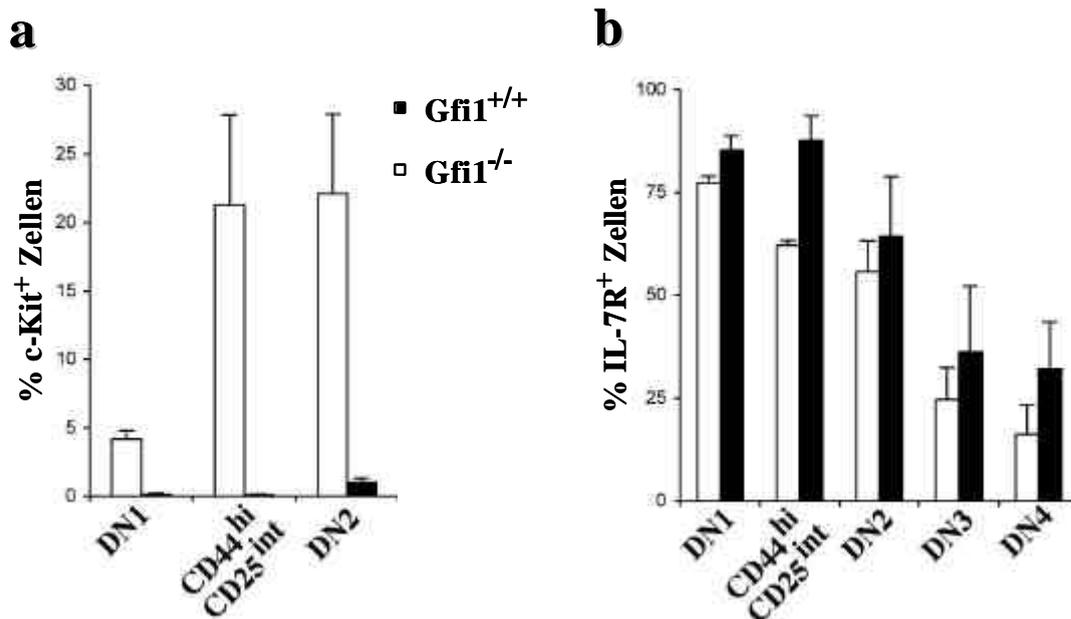


Abbildung 3.22: Analyse der c-Kit und IL-7R Expression auf den DN-Thymozyten

- Isolierte Thymozyten wurden mit α -CD25-APC, α -CD44-FITC, α -c-Kit-PE und einem Mix aus biotinyliertem Linien-Antikörpern sowie Streptavidin-PerCP-Cy5.5 als Zweitreagenz inkubiert und durchflußzytometrisch analysiert.
- Die Färbe-Prozedur der Thymozyten ist dieselbe wie in a), mit dem Unterschied, dass hier α -IL-7R-PE benutzt wurde. Die CD44^{hi}CD25^{int}-Population im $Gfi1$ -KO zeigt eine Zunahme IL-7R positiver Zellen.

Dabei ergab sich ein völlig anderes Bild für die $Gfi1$ -KO Tiere. Die DN1- und DN2-Subpopulationen aus der $Gfi1$ -defizienten Maus exprimierten keinen c-Kit Rezeptor mehr im Vergleich zu den stark exprimierenden WT-DN1 und DN2-Thymozyten (Abb. 3.22a). Auch die in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen aufkommende CD44^{hi}CD25^{int}-Population zeigte einen vollständigen Verlust an c-Kit Expression, während die relative Häufigkeit IL-7R⁺ Zellen innerhalb dieser Population deutlich erhöht war (Abb. 3.22b). Die Anteile an IL-7R⁺ Zellen bei den übrigen DN-Subpopulationen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen.

In einem weiteren Ansatz wurde der Verlust von Gfi1 auf das Proliferationsverhalten der Lin^- -Subpopulationen mittels BrdU-Einbau über einen Zeitraum von 3 Tagen untersucht. Zu jedem Zeitpunkt wurden je 3 individuelle Mäuse der Kontroll und der Gfi1-KO Maus analysiert.

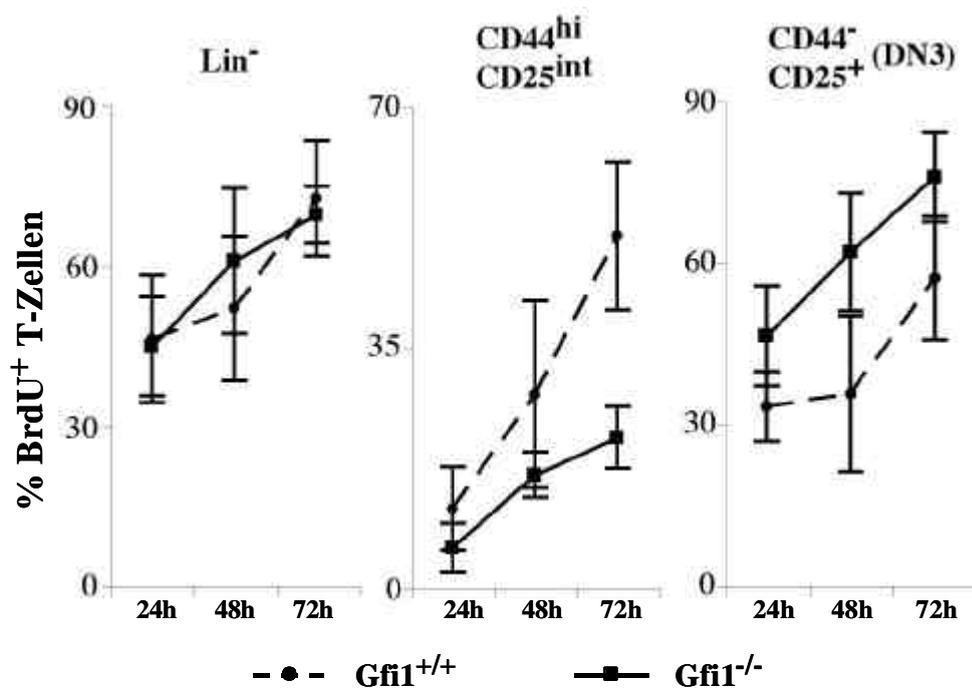


Abbildung 3.23: Untersuchung der Proliferationsrate bei Lin^- -Subpopulationen

Thymozyten aus Gfi1^{+/+} (gestrichelte Linie mit Kreis) und Gfi1^{-/-} (durchgezogene Linie mit Quadrat) Tiere wurden mit α -CD25-PE, α -CD44-APC und einem Mix aus biotinylierten Linien-Antikörpern sowie Streptavidin-PerCP-Cy5.5 als Zweitreagenz inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mit α -BrdU (FITC) gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an BrdU positiven Zellen der aufgeführten DN-Thymozyten, aufgetragen gegen die Zeit. Angegeben sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardfehlerabweichung.

Die Analyse BrdU markierter Zellen zeigte einen deutlich niedrigeren Prozentsatz an proliferierenden Zellen in der CD44^{hi}CD25^{int}-Population der Gfi1-defizienten Tiere auf, während die Proliferationsrate der DN3-Population im Vergleich zu WT erhöht war (Abb. 3.23). Bei den anderen untersuchten DN1-, DN2- und DN4-Subpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in ihrem Proliferationsverhalten zwischen den Genotypen (Daten nicht gezeigt).

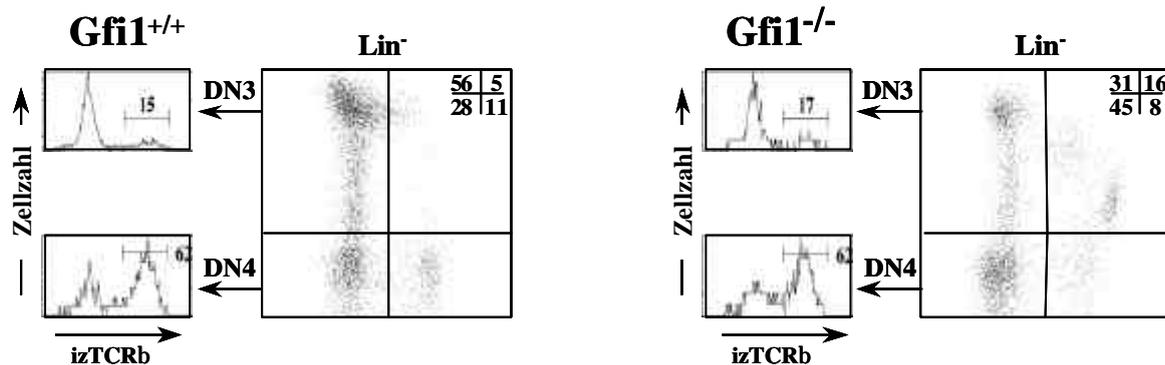


Abbildung 3.24: Analyse der prä-TCR Expression in den DN3-Thymozyten

Intrazelluläre TCR β -Färbung: Die mit den α -CD25-APC, α -CD44-FITC und einem Mix aus biotinylierten Linien-Antikörpern sowie Streptavidin-PerCP-Cy5.5 als Zweitreagenz behandelten Thymozyten wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit α -TCR β -PE inkubiert. Dargestellt sind die intracellulären TCR β -Ketten (izTCR β) Expression in den elektronisch ausgewählten CD44⁺CD25⁺- (DN3) und CD44⁺CD25⁻ (DN4) Subpopulationen. Es konnte kein Unterschied zwischen der WT und der Gfi1-KO Maus festgestellt werden.

Es wurde zuvor gezeigt, dass das Verhältnis der E- zu L-Zellen während der β -Selektion innerhalb der DN3-Population durch den Gfi1 Verlust eindeutig verändert war. Die L-Population der DN3-Thymozyten stieg von ca. 15 % in wildtyp Tieren auf etwa 23 % in Gfi1-defizienten Mäusen (Holger Karsunky, Doktorarbeit).

Um der Frage nachzugehen, ob der hohe Anteil an L-Zellen in der Gfi1 Mangelmutante durch eine Verstärkung des TCR β Gen-Rearrangements verursacht wird, wurde die Menge an funktionellen intrazellulären (iz) TCR β -Ketten durchflußzytometrisch in den DN3- und DN4-Populationen der Gfi1-KO sowie der WT Mäuse untersucht. Die elektronisch ausgewählten DN3- und DN4-Zellen zeigten keine Unterschiede an der Expression der izTCR β -Ketten zwischen den Genotypen Gfi1^{+/+} und Gfi1^{-/-} (Abb. 3.24b). Somit konnte für Gfi1 gezeigt werden, dass dieses möglicherweise die Morphologie oder die Expansion der L-Zellen beeinflusst und keine Wirkung auf die VDJ-Rekombination sowie auf die TCR β -Expression hat.

3.3.4 Gfi1-KO Thymus Phänotyp ist assoziiert mit modulierter Expression potentieller Gfi1 Zielgene

Gfi1 reguliert als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Genen und beeinflusst so das Verhalten der Zellen. Die gewonnenen Erkenntnisse warfen die Frage auf, welche Wirkung der Verlust von Gfi1 auf die Regulation bzw. Expression von Genen im Thymus hat. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Suche nach veränderten Expressionsprofilen von Gfi1 Zielgenen in Thymozyten der Gfi1-KO im Vergleich zum WT durchgeführt. Hierfür wurden Maus Oligonukleotid-Genchips (Murine 11K Array und U74A Array) der Firma Affymetrix verwendet. Der Vorteil von Genchips gegenüber anderen Methoden ist, dass eine sehr große Anzahl von Genen gleichzeitig bezüglich ihrer Expressionshöhe untersucht werden können. Die hier verwendeten Genchips bestehen aus einem Glassubstrat, auf dem pro Chip Sequenzen von bis zu 12000 Genen bzw. ESTs (engl. „expressed sequence tags“) in Form von Oligonukleotiden präsentiert sind, die mit markierter cRNA hybridisiert werden können. Für die Analysen wurde gesamt-RNA aus Total-Thymozyten und aus FACS-sortierten DP-Thymozyten aus Gfi1^{-/-} oder WT Mäusen isoliert. Die weitere Prozedur wurde von Mitarbeitern der Biochip Labor der IFZ durchgeführt. Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente miteinander verglichen. (Tab. 2).

Tabelle 2: Gene mit veränderten Expressionsprofilen in *Gfi1*^{-/-} Thymozyten

	Gesamt Thymus Maus 11K array		CD4 ⁺ CD8 ⁺ (DP) Maus U74A array	
	Veränderung der Expressionshöhe im Vergleich zu WT			
Induziert in <i>Gfi1</i> ^{-/-} Thymozyten	1.Exp. (HK)	2.Exp.	1.Exp.	2.Exp.
c-maf <i>bZIP transcription factor</i>	10,3	30,6	1,3	1,4
TRAF5 <i>TNF-receptor associated factor 5</i>	6,1	2,4	9,7	8,4
LKLF <i>Lung Krüppel like factor</i>	3,6	2,9	8,3	10,2
Id1 <i>Inhibitor of DNA binding 1</i>	n.d.	n.d.	7,4	6
Id2 <i>Inhibitor of DNA binding 2</i>	1,3	n.d.	4,2	3,5
Id3 <i>Inhibitor of DNA binding 3</i>	n.d.	n.d.	1,3	1,5

Gesamtzelluläre RNA wurde aus totalem Thymus oder aus FACS-sortierten DP-Thymozyten der Genotypen *Gfi1*^{+/+} und *Gfi1*^{-/-} isoliert. Poly-A⁺-RNA wurde in doppelsträngige cDNA transkribiert. In einer *in vitro* Transkription diente die cDNA als Template für die Synthese von biotinylierter, einzelsträngiger cRNA. Die fragmentierte cRNA wurde dann für die Hybridisierung mit den Affymetrix-Genchips Maus 11K und U74A eingesetzt. Eine Expressions-Veränderung von mehr als 2,5 fach im KO gegenüber WT wurde als signifikant betrachtet. HK: Holger Karsunky, n.d.: nicht detektiert.

Vergleichende Gen Expressionsanalyse vom ganzen Thymus und von gereinigten CD4/CD8 DP-Thymozyten aus *Gfi1*^{-/-} Tieren zeigten, dass die Expression einer spezifischen Gruppe von etwa 40 Genen von *Gfi1* reprimiert werden kann. Alle diese Gene sind Kandidaten für direkte *Gfi1* Zielgene oder indirekte Effektorgene. Ein Teil dieser Gene ist in der Tabelle 2 aufgelistet.

Die Ergebnisse der Genchip-Analysen für relevante und interessante Zielgene wurden durch Northernblot und durch RT-PCR-Analysen bestätigt (Abb. 3.25).

Aus den Thymi der $Gfi1^{-/-}$ sowie der Kontrolltiere wurde RNA isoliert und in Northernblot-Analysen die Expression nach Lung Krüppel-like factor (LKLf), TNF-receptor associated factor 5 (TRAF5), Inhibitor of DNA binding 1 (Id1), Inhibitor of DNA binding 2 (Id2) sowie bZIP transcription factor untersucht (c-Maf Daten nicht gezeigt, Abb. 3.25a).

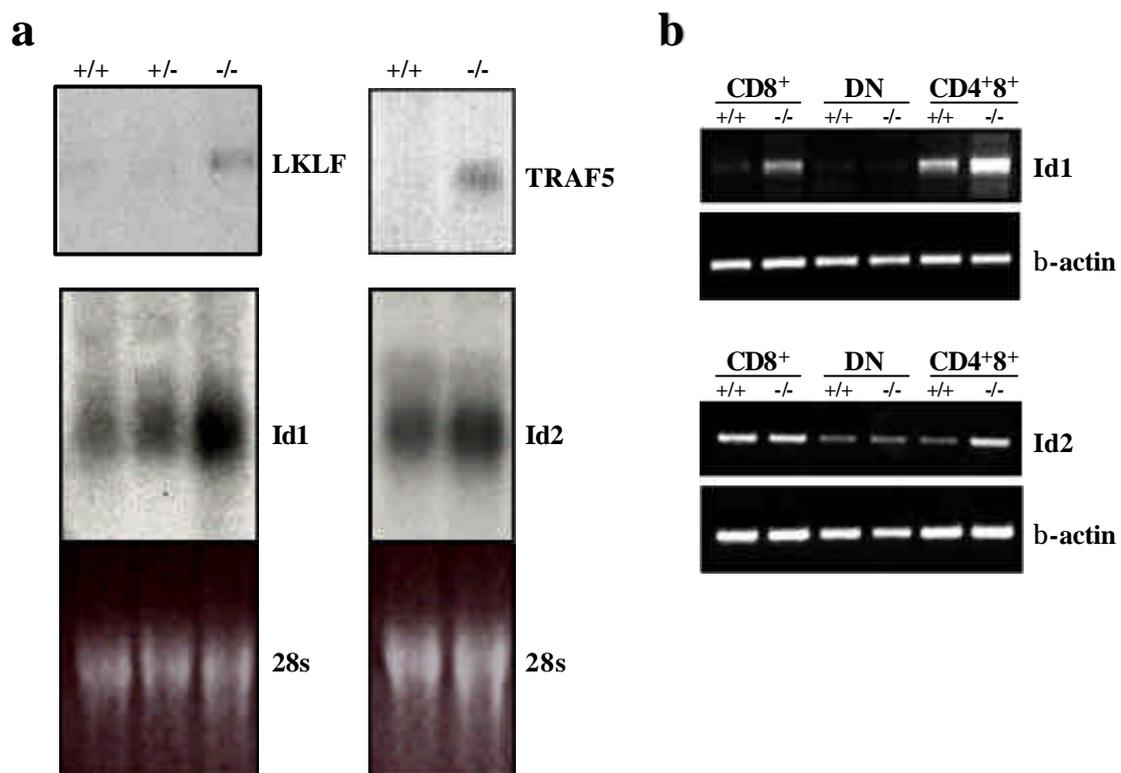


Abbildung 3.25: Expressionsanalyse von potentiellen Gfi1-Zielgenen

a. Northern-Analyse von Gesamt RNA aus Thymi der Genotypen $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{+/-}$ und $Gfi1^{-/-}$ mit verschiedenen DNA Fragmenten aus cDNA EST-Klonen und PCR-Amplifikationen zum Nachweis der Expression der Gene LKLf (EST-Klone), TRAF5 (EST-Klone), Id1 und Id2 (PCR). Quantifizierung der Signale von Id1 und Id2 durch EtBr-Färbung der 28S-rRNA.

b. RT-PCR-Analyse zum Nachweis der Id1- und Id2-Genexpression in sortierten $CD8^{+}$, DN- sowie in $CD4^{+}CD8^{-}$ (DP) Thymozyten der WT und KO Maus. Nach der Präparation der Gesamt-RNA aus den einzelnen Subpopulationen und der Reverser Transkription wurde die entsprechende cDNA mit Maus Id1- bzw Id2 spezifischen Primern amplifiziert und das PCR-Produkt mit einem 1,5 %-igen Agarosegel analysiert. Kontrolle der Reversen Transkription wurde mit β -Actin Primern durchgeführt

Die Hybridisierung von Gesamt-RNA aus Thymi der KO und WT Mäuse mit den entsprechenden radioaktiv markierten LKLF, TRAF5 und c-Maf (Daten nicht gezeigt) cDNA Fragmenten zeigte eine sehr starke Expression der entsprechenden Gene in den Gfi1-defizienten Tieren im Vergleich zu WT Mäusen (Abb.3.25a). Während die Id1- und Id2-Expression in der DNA-Chip Analyse vom gesamten Thymus nicht zu detektieren war, konnte ein gesteigertes Expressionsniveau in sortierten DP-Thymozyten der Gfi1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT-DP Thymozyten, sowohl der Id1 und Id2 Gene als auch der oben erwähnten Gene LKLF und TRAF5, festgestellt werden (Tab. 1). Wobei jedoch die Northernblot-Analyse eine verstärkte Id1 und Id2 Expression im gesamten Thymus der Gfi1^{-/-} Tiere ergab (Abb. 3.25a). Die Id3 Expression scheint durch den Gfi1 Verlust nicht beeinträchtigt zu werden (Tab. 2).

Eine weitaus empfindlichere Methode zur Untersuchung der Zellverteilung der Transkripte des Id1 und Id2 Gens stellt die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) dar. Hierbei wird die mRNA der zu untersuchenden Zellen oder Gewebe mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in den entsprechenden cDNA-Strang umgeschrieben und anschließend für die PCR mit Id1 und Id2 spezifischen Primern eingesetzt. Als RNA-Quelle für die folgenden Untersuchungen wurden CD8⁺-, DN- und DP-Thymozyten-Populationen der Gfi1-defizienten sowie der WT Tiere genutzt. Durch die PCR mit murinen β -Actin Primern wurde die Qualität der Reversen Transkription überprüft (Abb. 3.25b).

Die RT-PCR brachte in den DP-Thymozyten verstärkte Id1 und Id2 Expression in der Gfi1-KO Maus hervor. Desweiteren wurden erhöhte Id1-Transkripte in CD8⁺-SP-Thymozyten der Gfi1-KO Maus nachgewiesen, während in DN-Zellen weder Id1, noch Id2 eine Veränderung gegenüber der WT-Kontrolle zeigte (Abb. 3.25b). Eine modulierte Id2 Expression wurde in den CD8⁺-Thymozyten durch den Gfi1 Verlust ebenfalls nicht beobachtet. Das erhöhte Expressionsniveau der erwähnten Gene in den Thymozyten Gfi1-defizienter Mäuse bestätigt die Gfi1 Funktion als transkriptioneller Repressor.

4. Diskussion

4.1 Gfi1:GFP Knock-in Maus zeigt differentielle Expression und die Autoregulation des Gfi1 Genes während der Lymphozyten Entwicklung

4.1.1 Expressionsanalyse von Gfi1 und GFP in den Lymphozyten der Knock-in Maus

Einen der hilfreichsten Ansätze der modernen Molekularbiologie, um Information über die *in vivo* Regulation und Funktion von Genen und deren Rolle im Immunsystem zu erlangen, stellt die gezielte Mutagenese von Genen in der Keimbahn von Mäusen dar. Die Generierung der Gfi1 „knock-in“ Mauslinie erfolgte mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus. Dabei wurde ein Großteil des kodierenden Bereichs durch Insertion einer GFP cDNA Kasette ersetzt. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass das GFP Gen von den gleichen Kontroll-Elementen wie Gfi1 reguliert wird. Der mögliche Einfluss von regulatorischen Elementen in der 3' Region, wie die 3' Terminierungssignale und der 3' nicht kodierende Bereich sowie das Polyadenylierungssignal des endogenen Gfi1 Gens blieben ebenfalls erhalten, um sicherzustellen, dass die Transkription des Gfi1:GFP knock-in Allels und des Gfi1-WT Allels weitgehend gleich verläuft. Durch Analyse von GFP und Gfi1 auf RNA- und Proteinebene sollte die Regulation beider Allele in den heterozygoten KI-Mäusen untersucht werden. Zusätzlich wurde der Verlust von Gfi1 und die GFP-Insertion zellbiologisch mittels FACS- und LSM-Analyse gezeigt.

Quantitative Real-time PCR Analysen an Thymozyten-Subpopulationen sowie an naiven und aktivierten peripheren T-Zellen zeigten, dass die transkriptionelle Regulation des Gfi1:GFP Allels einschließlich der Halbwertszeit des GFP Transkripts, stark der des WT-Allels ähnelt. Dass die Gfi1:GFP knock-in Maus ein repräsentatives Modell zur Beobachtung der Gfi1 Expression in unterschiedlichen Zellpopulationen und Organen der Maus darstellt, bestätigten auch ähnliche Gfi1 und GFP Proteinmengen in den T-Zellen während der CD4/CD8-Thymozyten-Differenzierung.

Auch in den peripheren T-Zellen folgte die GFP Expression der bekannten Gfi1 Expression. So wurde in frühen T-Zellen der Thymozyten-Populationen eine viel stärkere GFP Fluoreszenz als in den peripheren T-Zellen gefunden. Die Beobachtungen, dass Gfi1 Expression durch Aktivierung der peripheren T-Zellen gesteigert wird, und die höchste Expression in den T-Zellen des Thymus hat, wurden bereits mit anderen Methoden herausgefunden (Schmidt et al., 1998; Karsunky et al., 2002). Die Übereinstimmung mit den hier präsentierten GFP-Daten weist daraufhin, dass das Gfi1:GFP Mausmodell das Gfi1 Expressionsmuster widerspiegelt und für *in vivo* Untersuchung der Gfi1 Expression durch die GFP Fluoreszenz genutzt werden kann.

Vergleicht man die RNA- und Proteinexpression so zeigte sich, dass diese nicht zeitlich überlappen, sondern, dass das Protein zeitlich verzögert exprimiert wird. So zeigen die DP-Thymozyten der heterozygoten KI-Tiere ein höheres Gfi1 und GFP RNA-Expressionsniveau als die DN-Population, während die entsprechenden Proteinmengen in der DP-Subpopulation eindeutig niedriger sind als die der DN-Thymozyten. Folglich spiegelt die GFP Fluoreszenz, zumindest in den Thymozyten, der Gfi1^{+GFP} Mäusen die Gfi1 Proteinexpression und nicht die Gfi1 mRNA Expression wider. Allerdings hat das knock-in Modell auch klare Einschränkungen, die durch die Detektion der zwei Isoformen des Gfi1 Proteins in sortierten Thymozyten ersichtlich wurden. Die Expressionsniveaus beider Isoformen, der 55 kDa und 47 kDa Form, sind am höchsten in den DN-Zellen und fallen deutlich in den DP-, CD4⁺- sowie in den CD8⁺-Thymozyten ab. Allerdings zeigt die kleinere Isoform eine andere Kinetik als die größere Isoform. Diese Komplexität kann durch die GFP Fluoreszenz in den Gfi1:GFP knock-in Mäusen nicht repräsentiert werden und bedarf weiterer Untersuchungen mit anderen Methoden.

In allen analysierten Thymus Subpopulationen konnte so gut wie keine Heterogenität beobachtet werden und alle Zellen exprimierten GFP. DN1- und DN2-Subpopulationen machten die einzige Ausnahme, da diese eine kleine Gruppe an GFP negativen Zellen aufwiesen. DN1- und DN2-Zellen sind nicht determiniert, benötigen zur Proliferation Zytokine wie SCF und IL-7 (Murray et al., 1998 und Baird et al., 1999), haben nicht rekombinierte TCR Allele und besitzen noch das Potential sich in andere Zelllinien, wie dendritische Zellen, NK- oder B-Zellen, zu entwickeln. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass sich der Verlust von Gfi1 Expression innerhalb der DN1/DN2-Populationen negativ auf die T-Zell Liniendeterminierung auswirken könnte.

Im Hinblick auf die prä-T-Zellentwicklung ist die kontinuierliche Zunahme der GFP Expression, somit auch der Gfi1 Expression, während der DN Differenzierung zu beobachten. Sie erreicht den Höhepunkt in den β -selektierten L-Zellen innerhalb der DN3-Population, in der prä-TCR Selektion stattfindet. Diese Zellen haben bereits ihre TCR β Gene produktiv umgruppiert und können somit als stark proliferierende Zellen Nachschub für die darauffolgenden Differenzierungsschritte liefern (Dudley et al., 1994 und Hoffman et al., 1996). Verglichen mit den anderen frühen und späten T-Zell Subpopulationen, scheint die Gfi1 Expression während der prä-TCR Selektion und in β -selektierten Zellen am höchsten zu sein als in allen anderen T-Zellen, selbst solche, die mit Antigen stimuliert wurden. Diese hohe transkriptionelle Aktivität des Gfi1 Locus in β -selektierten Zellen unterstützt die zuvor publizierte essentielle Rolle von Gfi1 in diesem Prozess (Schmidt et al., 1998). So haben Gfi1-defiziente Mäuse eine geringere Anzahl an DN3-Zellen, eine gesteigerte Proliferationsrate und weisen einen erhöhten Anteil an L-Zellen auf (Holger Karsunky, Doktorarbeit). Dagegen bewirkt die Überexpression von Gfi1 in den lck-Gfi1 transgenen Tiere eine Erhöhung der relativen Zellzahlen der DN3-Thymozyten und eine fast vollständige Inhibition der mit der β -Selektion assoziierten Proliferation. Die DN3-Population setzte sich fast ausschließlich aus E-Zellen zusammen und enthält nur sehr wenige L-Zellen (Schmidt et al., 1998). Die bisher beobachteten Effekte bzw. Daten über die prä-TCR Selektion in den Gfi1 Mausmutanten deuten auf eine Rolle von Gfi1 in diesem Prozess hin.

In diesem Zusammenhang ist die steigende Gfi1 Expression in frühen prä-B-Zellen im Knochenmark, die prä-BCR tragend sind und äquivalent zu den DN3-Thymozyten gesetzt werden können, interessant (Hardy und Hayakawa, 2001, Ceredig und Rolink, 2002). Hier könnte also eine ähnliche oder identische transkriptionelle Regulation von Gfi1 über die prä-TCR bzw. -BCR vermittelten Signale erfolgen und auf eine vorsichtige Rolle von Gfi1 während der frühen T- sowie B-Zell Selektionsschritte hindeuten. In den peripheren B- und T-Lymphozyten wird Gfi1 Expression durch Antigenstimulierung induziert, welches durch die erhöhte GFP Fluoreszenz belegt wird. Diese Beobachtungen können als weiteres Indiz dafür aufgefasst werden, dass die transkriptionelle Regulation von Gfi1 das Resultat der TCR bzw. BCR Signalweiterleitung ist.

Eine transiente Erhöhung der Gfi1 Expression wurde ebenfalls in einer zellulären Untergruppe innerhalb des reifen DP-Thymozyten Kompartiments, das noch im Selektionsprozeß ist, beobachtet. Diese $CD4^{lo}CD8^{lo}$ -Zellen, sind in der CD4/CD8-Liniendeterminierung nicht festgelegt und bilden den Hauptanteil der noch unter positiv/negativ Selektion befindlichen Zellen und weisen eine hohe Gfi1 Expression innerhalb der DP-Thymozyten auf. Die Tatsache, dass die Expression von Gfi1 am höchsten in den Zellen ist, in denen die prä-TCR Signalweiterleitung stattfindet, und in aktivierten peripheren T-Zellen infolge der Antigenstimulierung ist, lässt vermuten, dass im allgemeinen die Gfi1 Expression durch TCR-Signale induziert wird und dass in den $CD4^{lo}CD8^{lo}$ -Subpopulation als Folge der MHC/TCR-Interaktion die Gfi1 Expression hochreguliert wird.

Eine weitere Beobachtung ist, dass mit der verstärkten Hochregulation von CD4 in den $CD4^{+}CD8^{lo}$ Zellen die Gfi1 Expression deutlich vermindert wird. Umgekehrt, durch die CD8 Hochregulation und Reduktion der CD4 Expression, bleibt die Gfi1 Expression zunächst in der Zwischenpopulation $CD8^{+}CD4^{lo}$ aufrechterhalten bevor sie in den CD8 SP-Zellen reduziert wird. Dies deutet darauf hin, dass die differentiell regulierte Transkription des Gfi1 Genes während der CD4/CD8-Liniendeterminierung bzw. der positiven Selektion abhängig vom Korezeptor ist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass das unterschiedliche Niveau der Gfi1 Expression die Qualität der Signalweiterleitung, hervorgerufen durch TCR/MHC Bindung, widerspiegelt. Es kann angenommen werden, dass die Signalstärke nach Wechselwirkung von TCR mit MHC I oder II Molekülen von unterschiedlicher Intensität ist und dass ein schwaches TCR/MHC I Signal die Zelle in Richtung $CD8^{+}$ -SP-Thymozyten treibt, während ein starkes TCR/MHC II Signal der Auslöser für die Bildung der $CD4^{+}$ -SP-T-Zellen ist (Hogquist, 2001). Bei einem alternativen Modell hingegen ist die CD4/CD8-Linienentscheidung und positive Selektion abhängig von der Signaldauer und nicht von der Stärke. Laut dieser Hypothese sind $CD4$ -SP-T-Zellen aus dem DP-Thymozyten Pool das Resultat der andauernden TCR/MHC Signalweiterleitung und $CD8$ -SP-T-Zellen entwickeln sich von den $CD4^{+}CD8^{lo}$ -Zwischenpopulation nachdem, durch die Umkehr des Korezeptor sowie CD8 wieder exprimiert wird, das TCR-Signal abklingt (Bosselut et al., 2001; Barthlott et al., 1997).

Inwieweit die Modelle die physiologische Situation genau reflektieren bleibt offen. Jedoch können hier ermittelte und zuvor publizierte Daten als Beweis angesehen werden, dass Gfi1 ein Ziel der durch Bindung eines MHC an den TCR-Komplex initiierten Signals darstellt, und dass dieser möglicherweise bei der Regulation der CD4/CD8-Liniendeterminierung sowie bei der positiv/negativ Selektion eine Rolle spielt.

Die beobachteten differentiellen Gfi1 Expressionsniveaus in den CD4- und CD8-SP-Thymozyten wurden in ruhenden peripheren CD4⁺-Helfer-T-Zellen sowie in zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen der Milz bzw. der Lymphknoten nicht aufrechterhalten. Nach GFP MFI-Werten ist die Gfi1 Expression in diesen Zellen am niedrigsten verglichen mit den übrigen T-Zell Populationen und wird erst nach der Behandlung mit α -CD3 Antikörpern erhöht, allerdings zu unterschiedlichen Anteilen in naiven CD4 oder CD8 sowie in den entsprechenden Gedächtniszellen. Die molekularen Mechanismen, die dieser unterschiedlichen Regulation der Gfi1 Expression in den Gedächtniszellen zugrunde liegt, bleiben ungeklärt. Die Divergenz der Gfi1 transkriptionellen Aktivität zwischen CD4 und CD8 Gedächtniszellen weist auf eine neue potentielle Funktion von Gfi1 während der Bildung der immunologischen Gedächtnisses hin.

4.1.2 Analyse der GFP Expression in den Gfi1^{GFP/GFP} und lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Mäusen deutet auf eine Gfi1 Autoregulation hin

Die beobachtete GFP Fluoreszenz in den Gfi1^{GFP/GFP} Thymozyten und im Vergleich mit der in den Gfi1^{+/GFP} Zellen gemessenen, deuteten auf eine Autoregulation der Gfi1 Expression durch einen Rückkopplungsmechanismus hin. Um der Klärung dieser Frage näher zu kommen, wurde das Gfi1 in T-Zellen unter dem lck-Promotor konstitutiv überexprimiert. Durch Einkreuzen des lck-Gfi1 Transgens in Gfi1^{GFP/GFP} Mäuse und Analyse der GFP Expression in den T-Zellen der kombinatorischen Mutanten wurden die Annahme der Gfi1 Autoregulation in den T-Zellen bestätigt. Allerdings ist die Reprimierung des Gfi1 Allels durch das lck-Gfi1 Transgen in den verschiedenen T-Zell Subpopulationen sehr variabel, es findet sowohl eine vollständige, eine teilweise oder keine Repression statt. Dies kann ein Indiz für eine Zell spezifische Autoregulation sein oder, was wahrscheinlicher ist, es reflektiert eine differentielle Expression des lck-Gfi1 Transgens in unterschiedlichen T-Zell Populationen. Diese Erklärung stützt sich auf Reportergen-Analysen, die deutlich die Dosis-abhängige

Reprimierung des Gfi1 Promotors durch Gfi1 demonstriert, sowie auf kürzlich publizierten Befunde aus den lck-GFP transgenen Mäuse (Shimizu et al., 2001). In diesen Tieren konnte die höchste Aktivität des proximalen lck-Promotors in den CD4/CD8-SP-Thymozyten, eine geringere in den DP-Zellen und die niedrigste in den DN-Populationen festgestellt werden. Diese Daten bestätigen die Beobachtungen der reduzierten GFP Fluoreszenz in den jeweiligen Thymus-Subpopulationen der lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} Mäuse. Zusätzliche unterstützende Indizien für die hier erhobenen Daten über das Gfi1 Expressionsprofil werden durch kürzlich publizierte Befunde aus T-Zelllinie und transgenen Mäusen, die Gfi1 konstitutiv exprimieren, geliefert (Doan et al., 2004). Diese Daten zeigen ebenfalls die verzögerte RNA und Proteinexpression von Gfi1 in den Thymozyten Subpopulationen. Zu den Ergebnissen aus den lck-Gfi1/Gfi1^{GFP/GFP} transgenen Tieren kommen auch Daten aus Chromatin Immunopräzipitationsexperimenten mit einem polyklonalen Gfi1 Antikörper, die die Bindung von Gfi1 an den potentiellen Gfi1 Promoter auch *in vivo* belegen.

Die hier dargelegten Ergebnisse der Gfi1:GFP knock-in Mäuse zeigen die Bedeutung dieses knock-in Modells für zukünftige *in vivo* Untersuchung der Expression bzw. Regulation des Transkriptionsfaktors Gfi1, der eine wichtige Rolle in der adaptativen und der angeborenen Immunität spielt. Mögliche Anwendungen der knock-in Maus wären die Beobachtung der Gfi1 Expression als Antwort auf bestimmte Signalwege, als Reaktion auf die Immunisierung oder während der Differenzierung der Th1/Th2-Zellen. Weiterhin wird von Interesse sein, wie sich Gfi1 *in vivo* in der B-Zell Aktivierung sowie in der Plasmazell-Differenzierung verhält. Wie bereits bekannt ist, führt der Gfi1 Verlust zur massiven Neutropenie und zur verstärkten Immunreaktion gegen pathogen-assoziierte Moleküle (Karsunky et al., 2002; Hock et al., 2003). In diesem Zusammenhang wäre das knock-in Modell bei der *in vivo* Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von Gfi1 während der Granulozyten/Monozyten Differenzierung, der Makrophagen Aktivierung und allgemeiner Entzündungsprozesse von Bedeutung. Ein weiterer Befund, der mit Hilfe der Gfi1:GFP Knock-in Mutanten erhoben werden könnte, ist der Nachweis der Expression von Gfi1 in den hämatopoetischen Stammzellen (Hui Zeng, AG Möröy, Institut für Zellbiologie). Damit konnte festgestellt werden, dass Gfi1 eine weitere zentrale Rolle in der Hämatopoese zukommt, die sich nicht nur auf die Aktivierung und Differenzierung von Effektorzellen wie T- bzw. B-Lymphozyten oder Granulozyten beschränkt.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der Thymozyten-Entwicklung anhand der Gfi1-defizienten Tiere

Im ersten Teil dieser Arbeit und durch frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Tarik Möröy wurde gezeigt, dass die stärkste Expression an Gfi1 im Thymus ist, und das Gfi1 differentiell exprimiert in allen Thymozyten-Populationen, vor allem verstärkt in DN-Populationen, vorkommt (Schmidt et al., 1998). Zusammenfassend suggerieren diese Daten eine Rolle von Gfi1 während der frühen T-Zellentwicklung. Somit lag der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Analyse der Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus mittels der von Karsunky et al. (2002) erzeugten Gfi1-defizienten Mäuse.

Die herausragende und als erstes entdeckte Eigenschaft der Gfi1-KO Tieren war die ausgeprägte Verkleinerung des Thymus sowie, die Verminderung der Thymozytenzahl, die im statistischen Mittel fast auf ein Zehntel im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert war (Holger Karsunky, Doktorarbeit). Eine weitere Auffälligkeit stellte sich bei der Analyse des CD4/CD8 Expressionsprofils heraus. Es zeigte eine signifikant erhöhte CD8-SP-Population, was ein Hinweis auf eine begünstigte CD8-Liniendeterminierung sein kann. Bereits diese beiden Auswirkungen des Gfi1 Verlustes demonstrieren, dass Gfi1 im Allgemeinen für eine normale Produktion von Vorläufer T-Zellen und ihrer Differenzierung benötigt wird (Holger Karsunky, Doktorarbeit).

Die Resultate aus der AnnexinV-Testverfahren der frühen unreifen DN-Thymozyten-Populationen deuten darauf hin, dass die Thymozytenzahlfreuduktion in den Gfi1-defizienten Mäusen die Konsequenz eines apoptotischen Prozesses der c-Kit⁺-Zellen, insbesondere der DN1- sowie DN2-Subpopulationen, darstellen. Dieses korrelierte nicht nur mit der allgemeinen Reduktion der DN-Zellzahl, sondern auch mit dem Verlust der c-Kit⁺-Zellen innerhalb der DN (Lin⁻)-Population. Daher kann man prognostizieren, dass Gfi1 für das Überleben und die Proliferation der c-Kit⁺-Zellen in den DN1- sowie DN2-Populationen essentiell ist.

Weiterhin weisen die gezeigten Daten auch auf eine Störung des Entwicklungsschrittes von DN1-Zellen zu DN2-Zellen hin. Der Gfi1 Verlust verursacht möglicherweise einen Block der Differenzierungsschritte von DN1- zu DN2-Subpopulationen und führt zu einer Reduktion der DN2- sowie der nachfolgenden Thymozyten-Subgruppen. Dieser partielle Entwick-

lungsblock wird durch das Auftreten einer zusätzlichen und deutlich ausgeprägten Population in den Gfi1-defizienten Mäusen, die das Expressionsprofil $\text{Lin}^- \text{CD44}^{\text{hi}} \text{CD25}^{\text{int}}$ aufweist (Holger Karsunky, Doktorarbeit). Herkunft und Identität dieser Zellen bleibt jedoch unklar. Es ist allerdings denkbar, dass diese Zellen aus den sehr unreifen DN1-Thymozyten hervorgegangen sind, und während ihrer Transition zu der DN2-Population blockiert wurden. Desweiteren zeigen diese Zellen keine c-Kit Expression, sind aber positiv für den frühen T-Zellmarker Thy1.2 und erscheinen ebenfalls in fötalen Thymi der Gfi1-KO Mäuse (Daten nicht gezeigt; Holger Karsunky, Doktorarbeit). Deshalb wird ausgeschlossen, dass diese Blockzellen andere, reife B- oder T-Zellen aus der Peripherie sein könnten. In wildtyp Tieren ist die DN2-Population durch Proliferation gekennzeichnet und wichtig für die Thymusgröße sowie Thymozytenzahl. Ihre Abwesenheit aufgrund der Apoptose verursacht durch den Gfi1 Verlust könnte die verminderte Thymusgröße und die Thymuszellularität in den Gfi1-defizienten Tieren erklären. Zu diesem ist die neue entstandene $\text{CD25}^{\text{int}} \text{CD44}^{\text{hi}}$ „Blockpopulation“ schwach proliferierend. Vorausgesetzt, dass diese Population die transitorische Untergruppe ist, könnte das eine weitere Erklärung für die verzögerte Entwicklung der DN2-Zellen aus der DN1-Population sein. Diese Daten deuten daraufhin, dass Gfi1 eine Funktion während der sehr frühen Entwicklung unreifer und nicht-festgelegter DN T-Vorläuferzellen (DN1 und DN2), die besonders von den Zytokinen SCF und IL-7 abhängig sind, besitzt. Sowohl SCF als auch IL7 sind in der Gfi1-KO Maus exprimiert (Holger Karsunky, Doktorarbeit), somit kann ausgeschlossen werden, dass evtl. ein Verlust von SCF oder IL-7 die Ursache für die beobachteten Defekte in den DN/c-Kit⁺-Populationen sein könnte.

Der Gfi1-KO Phänotyp ist in einigen auffallenden Aspekten dem in der Literatur beschriebenen Phänotypen der c-Kit-defizienten (Rodewald et al., 1997) oder IL-7R α -defizienten Mäusen ähnlich (Peschon et al., 1994; von Freedden-Jeffry et al., 1995 und 1997). Wie bei der Gfi1^{-/-} Maus weisen c-Kit Mangelmutanten und IL-7R- bzw. IL-7-defiziente Tiere sehr starke Defekte in der frühen T-Zellentwicklung auf, die sich in einem kompletten Block des frühesten Stadiums ($\text{CD44}^+ \text{CD25}^-$ -DN-Zellen) und somit ebenfalls in der Reduktion der Zellzahl der frühesten DN-Subpopulationen ausdrücken (Peschon et al., 1994; von Freedden-Jeffry et al., 1995 und 1997; Rodewald et al., 1995 und 1997). Der deutlich reduzierte Anteil proliferierender c-Kit⁺-Zellen oder die dezimierte c-Kit Expression innerhalb der DN1- und DN2-Populationen der Gfi1-defizienten Mäuse deutet aber auch darauf hin, dass der Gfi1-KO Thymusphänotyp die Folge einer verminderten c-Kit Expression sein könnte.

Es ist allerdings unklar, ob der Gfi1 Verlust die c-Kit oder IL-7R Signalwege beeinflusst. Wahrscheinlich ist, dass Gfi1 das Endglied der c-Kit Signaltransduktion ist und für die Umsetzung der physiologischen c-Kit Funktion, nämlich Proliferation und Überleben von T-Vorläuferzellen, essentiell ist. Eine alternative Erklärung wäre die Beeinträchtigung produktiver c-Kit Expression durch den Gfi1 Verlust. Kreuzung der Gfi1-KO Tiere mit Bcl-2 transgenen Mäusen, zeigte eine partielle Wiederherstellung der c-Kit⁺ Zellen, bewirkte aber nicht die Rekonstitution einer normalen Thymuszellularität in den Gfi1 Mangelmutanten. Entsprechend lässt sich eine Rolle von Gfi1 für das Überleben von c-Kit⁺ Zellen postulieren, die von Bcl-2 abhängig ist.

Der Befund, dass das TRAF5 Adaptormolekül im Gfi1-defizienten Thymus stark hochreguliert ist weist auf die alternative Möglichkeit hin, dass kostimulatorische Signale, ausgelöst durch TNF-Familienmitglieder, durch den Gfi1-Verlust beeinträchtigt werden. In der Literatur findet sich die Einbindung von TRAF5 in die CD27, CD30, CD40, Lymphotoxin- β Rezeptor sowie OX40-Signaltransduktion und Hinweise dass eine TRAF5 Überexpression allein für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und Jun-Kinase ausreicht (Nakano et al., 1996; Arch et al., 1998; Akiba et al., 1998). Die Bedeutung dieser beiden Signalwege in der frühen prä-T-Zellentwicklung, aber auch in der späten T-Zellentwicklung ist noch wenig verstanden, allerdings existieren zunehmend Indizien für die Funktion von TNF-Rezeptoren in der Regulation von Apoptose und Proliferation in DN-Thymozyten und während der negativen Selektion (Baseta et al., 2000; Li et al., 2001). Wie wichtig apoptotische Signale während der DN-T-Zell Differenzierung sind, haben FADD Transgene Mäuse gezeigt, die FADD in dominant-negativer Form im Thymus überexprimieren (Newton et al., 2000).

Mit Gfi1 transgenen Mäusen, die Gfi1 konstitutiv in prä-T-Zellen überexprimieren, wurde bereits gezeigt, dass Gfi1 auch eine entscheidende Rolle in DN3-Thymozyten spielt. Diese Tiere wiesen eine Akkumulation der DN3-Population, einen Block der Transition von E zu L-Zellen sowie eine verminderte Proliferation nach erfolgter β -Selektion und damit auch weniger L-Zellen bzw. proliferierende Zellen in der DN3-Population auf (Schmidt et al., 1998). In den Gfi1-KO Mäusen konnte der reziproke Phänotyp beobachtet werden, d.h. proportional mehr L-Zellen als in der WT-Kontrolle (Holger Karsunky, Doktorarbeit). Inwieweit Gfi1 die Signalwege oder regulatorische Mechanismen, die den DN3 zu DN4 oder den E- zu L-Zellübergang kontrollieren, beeinflusst, ist noch unklar. Allerdings zeigen beide

Mausmutanten, sowohl der *lck-Gfi1* transgene als auch die *Gfi1*-KO Maus, ein vollständiges T-Zell-Rezeptor Repertoire und in beiden Mutanten konnte eine Auswirkung auf die Rekombination der TCR β -Kettengene ausgeschlossen werden. Vor allem hat der *Gfi1* Verlust keinen Effekt auf die Produktion von zytoplasmatischen oder membrangebundenen TCR β -Ketten, was daraufhin deuten, dass *Gfi1* vielmehr mit dem Prozess der Regulation von Zellgrößenverteilung zwischen E- und L-Zellen oder der Expansion von L-Zellen assoziiert ist, als mit dem Ereignis der V(D)J Rekombination.

Ein weiterer bereits zu Anfang erwähnter Defekt in *Gfi1* defizienten Mäusen ist der erhöhte relative Anteil an CD8-SP-Thymozyten (Holger Karsunky, Doktorarbeit). Es konnte ausgeschlossen werden, dass die hohe prozentuale Häufigkeit der CD8⁺ Zellen in *Gfi1*-KO Mäusen auf die Überrepräsentierung von unreifen CD8 ISP Zellen (Daten nicht gezeigt) zurückzuführen ist oder das Ergebnis einer gesteigerten Proliferation von reifen CD8⁺-T-Zellen. Es ist mit größter Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass *Gfi1* eine Rolle während der Entscheidung, ob DP-Zellen sich zu CD4- oder CD8-Zellen entwickeln hat, und damit auch eine Funktion im Prozess der positiven Selektion von DP-Thymozyten ausübt. Diese Hypothese konnte durch verschiedene Befunde untermauert werden: Zum einen, durch den allgemein hohen Prozentsatz von CD8⁺ Zellen und den relativ geringen Anteil an CD4⁺-SP-Thymozyten, zum anderen durch das ähnlich veränderte Verhältnis von CD4- zu CD8-Zellen innerhalb der CD69⁺-bzw. IL7R⁺-Population (Daten nicht gezeigt) und als letztes durch die klar erhöhte positive Selektion von MHC I restringierten HY-TCR tragenden CD8⁺-T-Zellen. In allen Fällen fiel eine deutlich abgrenzbare DP-Population mit leicht erniedrigter CD8 Menge aber erhöhter CD4 Expression, CD4⁺CD8^{lo}, in *Gfi1*^{-/-} Tieren auf. Diese Zellen sind wahrscheinlich bereits selektioniert, befinden sich allerdings noch in der Entscheidung in welche Linie eine Differenzierung stattfinden soll. Die Akkumulation dieser Population deutet auf eine gestörte CD4/CD8-Liniendeterminierung in den *Gfi1*-defizienten Tieren hin und ist ebenfalls ein Indiz für die Bedeutung von *Gfi1* in diesem Prozess.

Gemäß des gegenwärtig favorisierten Modells zur Liniendeterminierung, wird die CD4-Linie durch die effiziente Rekrutierung der Tyrosin-Kinase *Lck* und eines starken *Lck* Signal, als Resultat der TCR/MHC II-Interaktion begünstigt, während ein schwaches *Lck*-Signal, nach der TCR-Bindung mit dem MHC I Molekül, die Thymozyten in Richtung der CD8-Linienentwicklung treibt (Itano et al., 1996; Matechak et al., 1996; Hogquist et al.,

2001; Übersichtartikel Germain et al., 2002). Ein alternatives Modell diskutiert nicht die Stärke des Signals, sondern die „Kinetik des Signals“ (Bosselut et al., 2001). Laut diesem entwickeln sich die $CD4^+$ -Zellen von den DP-Zellen nach anhaltender TCR/MHC Signalübertragung, die $CD8^+$ -Zellen hingegen differenzieren sich aus der Gruppe der $CD4^+CD8^{lo}$ -Zellen nach einem Prozess, der nach Beendigung des TCR-Signals Korezeptor-Inversion genannt wird (Bosselut et al., 2001). Das interessante an diesem „Kinetik-Modell“ ist, dass die Korezeptor-Umkehr und die Entwicklung in Richtung $CD8^+$ -T-Zellen durch den IL-7R Signalweg vermittelt wird. Da die Gfi1-KO Maus eine deutlich erhöhte Anzahl an DP/IL-7R α^+ Zellen hat, könnte dies laut Kinetik-Modell, ein wesentliches Kriterium für die verstärkte positive Selektion der Gfi1-defizienten $CD8^+$ -Zellen sein und somit die Produktion von $CD8^+$ -Thymozyten in Gfi1-defizienten Tieren begünstigen. Weiterhin wurde eine stark erhöhte Zahl an apoptotischen $CD4^{lo}CD8^{lo}$ -Thymozyten in den Gfi1 $^{-/-}$ Mäusen detektiert. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die $CD8$ T-Zellentwicklung in Gfi1-defizienten Mäusen dadurch erleichtert wird, dass die Effizienz der positiv Selektion von $CD8$ -T-Zellen verstärkt wird wenn die Zahl der selektionierbaren Thymozyten vermindert ist.

Gemäß diesen Modellen, könnte Gfi1 für die Aufrechterhaltung von starken oder andauernden TCR/MHC vermittelten Signalen wichtig sein. Ebenso kann angenommen werden, dass die verstärkte positiv Selektion und somit die erhöhte $CD8$ Thymozytenzahl in den Gfi1-defizienten Tieren die Konsequenz eines schwachen/kurzen Lck-Signals oder eines frühzeitig beendeten Lck-Signals ist. Während der Selektion von DP-Thymozyten war der relative Anteil von $CD69^+TCR\beta^{hi}$ -Zellen in den Gfi1-KO Mäusen verringert im Vergleich zu den WT Mäusen, obgleich die vorangegangene $CD69^+TCR\beta^{lo}$ -Population nicht verringert war. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für den Defekt der Signalübertragung durch den Gfi1 Verlust, da während der Selektion die Hochregulation der TCR β -Kette abhängig ist von der Wirksamkeit der TCR/MHC-Signaltransduktion (Wolfer et al., 2001).

Weiterhin zeigen $CD4^{lo}CD8^{lo}$ - und $CD4^+CD8^{lo}$ -Populationen in der Gfi1 Mangelmutante ein geringeres Proliferationspotential als die entsprechenden WT-Zellen. Bei diesen Populationen handelt es sich um Zellen, die sich noch im Prozess der positiv/negativ Selektion und der Linienentscheidung befinden. Ihre reduzierte Proliferation durch den Gfi1 Mangel könnte ebenfalls die schwache Signalübertragung während des Selektionsprozess widerspiegeln, die zur Begünstigung der $CD8^+$ -Thymozyten-Entwicklung führt.

Auch die erhöhte LKLF Expression in den Gfi1-defizienten DP-Thymozyten spricht für einen gestörten TCR-Signalübertragungsweg. LKLF-Expression wird in WT-Thymozyten nach einer TCR/MHC-Interaktion herabreguliert. Im Gegensatz dazu steigt die LKLF-Expression in postselektionierten Einzelpositiven Zellen nachdem die TCR/MHC Signalweiterleitung abgeschaltet ist (Kuo et al., 1997). Hier erscheint durch den Gfi1 Verlust frühzeitig LKLF in den DP-Thymozyten, was mit einer geringen bzw. fehlenden TCR-Signalvermittlung übereinstimmen könnte. Inwieweit Gfi1 die Stärke oder die Dauer der TCR/MHC-Signalübertragung beeinflusst, bleibt aber noch im unklaren. Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. T. Möröy haben gezeigt, dass Gfi1 ein Ziel der Vermittlung des TCR-Signals ist, da es nach einer kurzen TCR-Stimulation durch α -CD3 Antikörper in peripheren T-Zellen hochreguliert wird (Karsunky et al., 2002a). Die Tatsache der Hochregulation von LKLF in den Gfi1-defizienten DP-Thymozyten führt zu der Hypothese, dass Gfi1 abhängige Ereignisse bedeutsam für die Aufrechterhaltung der Signale zur Regulation von Selektionsprozessen sein könnten. Ein konstitutives hohes LKLF Expressionsniveau in Gfi1^{-/-} Mäusen würde somit der TCR-Signalübertragung entgegenwirken und sich negativ auf den Selektionsprozess sowie der Linienentscheidung auswirken.

Ebenfalls von Bedeutung könnte die Tatsache sein, dass die Expression der Helix-Loop-Helix Transkriptionfaktoren Id1 und Id2 in Gfi1-defizienten DP-Thymozyten hochreguliert ist. Beide Proteine sind Repressoren der sogenannten E-Box Proteine E2A, E47 und HEB (Bain et al., 1999). Die Bedeutung dieser Faktoren wird vor allem in E2A- sowie E47-defizienten Mäuse deutlich, in denen die positive Selektion beschleunigt und somit der Anteil der CD8⁺-SP-Thymozyten erhöht ist (Bain et al., 1999). Diese Eigenschaften, die auch in der Gfi1-KO Mäusen beobachtet wurden, deuten stark daraufhin, dass Gfi1 eine Funktion als Negativ-Regulator auf die Expression der Id1 und Id2 Gene ausübt und folglich auch die Dosierung der E-Proteine regulieren könnte. Aus all diesen Daten wird ersichtlich, dass es durch Gfi1 Verlust Repression der beiden Id Proteine unterbleibt, was dazu führt, dass E-Box Proteine blockiert und in ihrer Funktion unterdrückt werden. Gfi1 kann somit in eine Signalkette oberhalb der E-Proteine eingruppiert werden.

5. Zusammenfassung

Gfi1 ist ein nukleäres Zink-Finger Protein, das als transkriptioneller Repressor agiert und wichtige Funktion in der T-Zellentwicklung, in der Granulopoese und in der angeborenen Immunantwort besitzt. Um die *in vivo* Regulation und Expression von Gfi1 eingehend untersuchen zu können, wurde das Gfi1 Gen in der Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen so verändert, dass fast die komplette kodierende Region durch das Reporter-gen GFP ersetzt wurde. Gleichzeitig wurde ein Teil des Gfi1 Gens so deletiert, dass sowohl der gesamte Promoterbereich, als auch das letzte Exon, das das Polyadenylierungssignal enthält, intakt blieben. Rekombination beider Gfi1 Allele führte zu einer Deletion des Gfi1 Gens. Diese Tiere zeigen denselben Phänotyp wie die publizierte Gfi1-KO Mausmutante (Karsunky et al., 2002), in der das Gfi1 Gen durch die Insertion des Neomycin Gens inaktiviert wurde.

Die höchste Gfi1 Expression während der B-Zell Differenzierung im Knochenmark wurde in den frühen B-Zell-Subpopulationen gefunden. Während der T-Zellentwicklung ist die Gfi1 Expression auf ihrem höchsten Niveau in den Stadien der prä-TCR und der TCR abhängiger Differenzierungsschritte. In reifen B-Zellen findet keine Gfi1 Expression statt, allerdings ist diese nach Stimulation hochreguliert. Im Gegensatz dazu zeigen die peripheren T-Zellen eine geringe, basale Gfi1 Expression, die nach Aktivierung über den TCR stark zunimmt, um anschließend in den Gedächtniszellen wieder abzuklingen. Die konstitutive Expression von Gfi1 unter dem Ick-Promoter in den Gfi1^{GFP/GFP}-Mäusen führte zur transkriptionellen Repression des Gfi1:GFP Allels in den T-Zellen. *In vivo* sowie *in vitro* Experimente bestätigten die Hypothese, dass Gfi1 durch direkte Bindung an den eigenen Promotor, die eigene transkriptionelle Aktivität über Rückkopplungsmechanismen selbst reguliert.

Mit Hilfe der publizierten Gfi1-defizienten Maus wurde die essentielle Rolle von Gfi1 während der Thymozyten-Reifung weiter untersucht. Diese Mäuse zeigen eine drastische Reduktion der Thymozytenzahl, die auf eine erhöhte Apoptoserate, Verlust der Proliferation und einen Differenzierungsblock in den sehr frühen Lin⁻c-Kit⁺ T-Vorläuferzellen zurückzuführen ist. Diese Zellen stellen die ersten zytokinabhängigen T-Vorläuferzellen dar, die noch keine V(D)J-Umgruppierung des T-Zellrezeptor β Locus vorgenommen haben und auch noch keiner Selektion unterworfen wurden. Ein weiterer wichtiger Befund aus den

Gfi1-KO Tieren ist, dass Gfi1 im Prozess der positiv/negativ Selektion von Thymozyten und der damit verbundenen CD4/CD8-Linienentscheidung eine wichtige Funktion zukommt. In den Gfi1-defizienten Thymus konnte eine Beschleunigung der MHC Klasse I restringierten positiv Selektion als auch eine prozentual vermehrte Bildung von CD8⁺-SP-T-Zellen festgestellt werden. Durch vergleichende DNA Mikroarray Analysen von sortierten DP und gesamt Thymozyten aus Gfi1-defizienten Tieren und WT-Kontrollen konnte gezeigt werden, dass die Expression spezifischer Gene von Gfi1 reprimiert wird. Eine deregulierte hohe Expression in den Gfi1-defizienten Zellen konnte für die Gene Id1, Id2, LKLF und TRAF5 gezeigt werden. Diese Befunde deuten auf die Existenz neuer Regulationmechanismen während der prä-T-Zellentwicklung und Selektionsprozessen hin, in denen Gfi1 eine essentielle Rolle spielt.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, A, Lichtmann, AH, Pober, JS (1996)**
Immunologie, *Verlag Haus Huber*
- Ahmadzadeh, M, Hussain, SF, Farber, DL (2001)**
Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells. *J Immunol* 166:926-35
- Akashi, K, Kondo, M, Freedman-Jeffry, U, Murray, R, Weissman, IL (1997)**
Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in Interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 89:1033-1041
- Akashi, K, Reya, T, Dalma-Weiszhausz, D, Weissman IL (2000a)**
Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* 12: 144-150
- Akashi, K, Traver, D, Miyamoto T, Weissman IL (2000b)**
A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Science* 404: 193-197
- Akiba, H, Nakano, H, Nishinaka, S, Shindo, M, Kobata, T et al. (1998)**
CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 273:13353-8
- Arch, RH, Thompson, CB (1998)**
4-1BB and OX40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol* 18:558-65
- Ardavin, C, Wu, L, Li, C-L, Shortman, K (1993)**
Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362: 761-763
- Bain G, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Feeney AJ, et al. (1997)**
Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* 6:145-54
- Bain, G, Engel, I, Robanus Maandag, EC, te Riele, HP, et al. (1997)**
E2A deficiency leads to abnormalities in alpha beta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17:4782-91
- Bain, G, Quong, MW, Soloff, RS, Hedrick, SM, Murre, C (1999)**
Thymocyte maturation is regulated by the activity of the helix-loop-helix protein, E47. *J Exp Med* 190:1605-16
- Baird, AM, Gerstein, RM, Berg, LJ (1999)**
The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 11: 157-166
- Barndt, R, Dai, MF, Zhuang, Y (1999)**
A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J Immunol* 163:3331-43
- Barthlott, T, Kohler, H, Pircher, H, Eichmann, K (1997)**
Differentiation of CD4(high)CD8(low) coreceptor-skewed thymocytes into mature CD8 single-positive cells independent of MHC class I recognition. *Eur J Immunol* 27:2024-2032

- Baseta, JG, Stutman, O (2000)**
TNF regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) subset. *J Immunol* 165:5621-30
- Bell, DW, Taguchi, T, Jenkins, NA, Gilbert, DJ, Copeland, NG, et al. (1995)**
Chromosomal localization of a gene, GF1, encoding a novel zinc finger protein reveals a new syntenic region between man and rodents. *Cytogenet Cell Genet* 70:263-7
- Benezra, R, Davis, RL, Lockshon, D, Turner, DL, Weintraub, H (1990)**
The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61:49-59
- Benezra, R, Rafii, S, Lyden, D (2001)**
The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 20:8334-41
- Bentley, GA, Mariuzza, RA (1996)**
The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 14:563-90
- Berg, EL, Robinson, MK, Warnock, RA, Butcher, EC (1991)**
The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol* 114:343-349
- Blackburn, CC, Augustine, CL, Li, R, Harvey, RP et al. (1996)**
The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5742-5746
- Bosselut, R, Feigenbaum, L, Sharrow, SO, Singer, A (2001)**
Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes. *Immunity* 14:483-94
- Brocker, T (1997)**
Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186:1223-1232
- Brown, MG, Driscoll, J, Monaco, JJ (1991)**
Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353:355-357
- Borgulya, P, Kishi, H, Uematsu, Y, von Boehmer, H (1992)**
Exclusion und inclusion of a α und β T cell receptor alleles. *Cell* 69:529-537
- Cantrell, D (1996)**
T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 14:259-274
- Ceredig, R, Rolink, T (2002)**
A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 11:888-97
- Chelsea, DM, Roberts, T, Cowell, JK 2000**
A new region of synteny between human chromosome 1p22 and mouse chromosome 5. *Int J Mol Med* 5:553-6
- Chen, L, Linsley PS, Hellstrom KE (1993)**
Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 14:483-6
- Christensen, JE, Andreasen, SO, Christensen, JP, Thomsen, AR (2001)**
CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells. *Int Immunol* 13:593-600

- Clements**, JL, Yang, B, Ross-Barta, SE et al. (1998)
Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281:416-419
- Coffman**, RL, Weissman IL (1983)
Immunoglobulin gene rearrangement during pre-B cell differentiation.
J Mol Cell Immunol 1:31-41
- Cumano**, A, Ferraz, JC, Klaine, M, Di Santo, JP, Godin, I (2001)
Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15:477-85
- DeJarnette**, JB, Sommers, CL, Huang, K, et al. (1998)
Specific requirement for CD3epsilon in T cell development.
Proc Natl Acad Sci USA 95:14909-14914
- Di George**, AM, Lischner, HW, Dacou, C, Arey, JB (1967)
Absence of the thymus. *Lancet* 1: 1387
- Doan**, LL, Porter, SD, Duan, Z, Flubacher, MM et al. (2004)
Targeted transcriptional repression of Gfi1 by GFI1 and GFI1B in lymphoid cells.
Nucleic Acids Res 32:2508-19
- Duan**, Z, Horwitz, M (2003)
Gfi-1 oncoproteins in hematopoiesis. *Hematology* 8:339-44
- Dudley** EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday AC (1994)
T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1:83-93
- Dudley**, EC, Girardi, M, Owen, MJ, Hayday, AC (1995)
 $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells can share a late common precursor. *Curr Biol* 5: 659-669
- Dutton**, RW, Bradley, LM, Swain, SL (1998)
T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16:201-23
- Ehlich**, A, Schaal S, Gu H, Kitamura D, Muller W, Rajewsky K (1993)
Abstract Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell* 72:695-704
- Ehlich**, A, Martin V, Müller W, Rajewsky K (1994)
Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells.
Curr Biol 4:573-83
- Fehling**, HJ, Krotkova, A, Saint-Ruf, C, von Boehmer, H (1995)
Crucial role of the pre-T-cell receptor α gene in development of $\alpha\beta$ but not $\gamma\delta$ T cells.
Nature 375:795-798
- Fehling**, HJ, von Boehmer, H (1997)
Early $\alpha\beta$ T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice.
Curr Opin Immunol 9: 263-275
- Förster** I, Vieira P, Rajewsky K (1989)
Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse. *Int Immunol* 1:321-31

- Fuchs**, B, Wagner, T, Rossel, N, Antoine, M, Beug, H, Niessing, J (1997)
Structure and erythroid cell-restricted expression of a chicken cDNA encoding a novel zinc finger protein of the Cys + His class. *Gene* 195:277-84
- Gärtner**, F, Alt FW, Monroe, R, Chu, M, Sleckman, BP, Davidson, L, Swat, W (1999)
Immature thymocytes employ distinct signaling pathways for allelic exclusion versus differentiation and expansion. *Immunity* 10:537-546
- Georgopoulos**, K, Bigby, M, Wang, JH, Molnar, A, Wu, P, Winandy, S, Sharpe, A (1994)
The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79:143-56
- Georgopoulos**, K (1997)
Transcription factors required for lymphoid lineage commitment.
Curr Opin Immunol 9:222-227
- Germain**, RN (1994)
MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299
- Germain**, RN (2002)
T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309-22
- Gilks**, CB, Bear, SE, Grimes, HL, Tschlis, PN (1993)
Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein.
Mol Cell Biol 13:1759-1768
- Glimcher** LH, Singh H (1999)
Transcription factors in lymphocyte development - T and B cells get together. *Cell* 96:13-23
- Glimcher**, LH, Murphy, KM (2000)
Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up.
Genes Dev 14:1693-711
- Godfrey**, DI, Zlotnik, A, Suda, T (1992)
Phenotypic and functional characterization of c-Kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol* 149: 2281-2285
- Godfrey**, DI, Kennedy, J, Suda, T, Zlotnik, A (1993)
A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150: 4244-4252
- Godfrey**, DI, Zlotnik, A (1993)
Control points in early T-cell development. *Immunol Today* 14: 547-553
- Godfrey**, DI, Kennedy, J, Mombaerts, P, Tonegawa, S, Zlotnik, A (1994)
Onset of TCR β gene rearrangement and role of TCR β expression CD3⁺CD4⁺CD8⁻ thymocyte differentiation. *J Immunol* 152: 4783-4792
- Goebel** P, Janney N, Valenzuela JR, Romanow WJ, Murre C, Feeney AJ (2001)
Localized gene-specific induction of accessibility to V(D)J recombination induced by E2A and early B cell factor in nonlymphoid cells. *J Exp Med* 194:645-56

- Grimes, HL, Chan, TO, Zweidler-McKay, PA, Tong, B, Tschlis, PN (1996a)**
The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16:6263-6272
- Grimes, HL, Gilks, CB, Chan, TO, Porter, S, Tschlis, PN (1996b)**
The Gfi-1 proto-oncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14569-14573
- Guidos, CJ (1996)**
Positive selection of CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* 8: 225-232
- Gunn, MD, Tangemann, K, Tam, C, Cyster, JG, Rosen, SD, Williams, LT (1998)**
A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:258-263
- Hardy, RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K (1991)**
Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 173:1213-25
- Hardy, RR, Hayakawa, K (2001)**
B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595-621
- Hardy RR (2003)**
B-cell commitment: deciding on the players. *Curr Opin Immunol* 15:158-65
- Heemskerk, MH, Blom, B, Nolan, G, Stegmann, AP et al. (1997)**
Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J Exp Med* 186:1597-602
- Hock, H, Hamblen, MJ, Rooke, HM, Traver, D, Bronson, RT, Cameron, S, Orkin, SH (2003)**
Abstract Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18:109-20
- Hoffmann, ES, Passoni, L, Crompton, T, Leu, TMU, Schatz, DG et al. (1996)**
Productive T-cell receptor α -chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev* 10: 948-962
- Hogquist, KA (2001)**
Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 13:225-31
- Inoue, H, Nojima, H, Okayama, H. (1990)**
High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96:23-8
- Iritani, B, Alberola-Ila, J, Forbush, K, Perlmutter, R (1999)**
Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors. *Immunity* 10:713-722
- Itano, A, Salmon, P, Kioussis, D, Tolaini, M, Corbella, P, Robey, E (1996)**
The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. *J Exp Med* 183:731-41
- Janeway, CA, Jr (1992)**
The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 10:645-74

- Janeway, CA, Travers, P, Walport, M (2002)**
Immunologie, *Spektrum Akademischer Verlag*
- Karasuyama, H, Kudo A, Melchers F (1990)**
The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* 172:969-72
- Karasuyama, H, Rolink A, Shinkai Y, Young F, Alt FW, Melchers F (1994)**
The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* 77:133-43
- Karsunky, H, Mende, I, Schmidt, T, Möröy T (2002a)**
High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. *Oncogene* 21:1571-9
- Karsunky, H, Zeng, H, Schmidt, T, Zevnik, B, Kluge, R et al. (2002b)**
Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 30:295-300
- Karsunky, H (2000)**
Multiple Defekte der Hämatopoese und T-Zellentwicklung in *Gfi-1*-defizienten Mäusen
Doktorarbeit, Institut für Zellbiologie
- Kim, D, Peng, XC, Sun, XH (1999)**
Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice.
Mol Cell Biol 19:8240-53
- Kirberg, J, Berns, A, von Boehmer, H (1997)**
Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex encoded molecules. *J Exp Med* 186:1269-1275
- Kisielow, P, Boehmer, H (1995)**
Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58: 87-209
- Kondo, M, Weissman, IL, Akashi, K (1997)**
Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.
Cell 91:661-672
- Kondo, M, Wagers, AJ, Manz, MG, Prohaska, SS et al. (2003)**
Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application.
Annu Rev Immunol 2003;21:759-806
- Kuo, CT, Veselits, ML, Leiden, JM (1997)**
LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival.
Science 277:1986-90
- Lenschow, DJ, Walunas, TL, Bluestone, JA (1996)**
CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-58
- Levin, SD, Anderson, SJ, Forbush, KA, Perlmutter, RM (1993)**
A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis.
EMBO J 12:1671-1680

- Lewis, SM** (1994)
The mechanisms of V(D)J joining: lessons from molecular immunological and comparative analyses. *Adv Immunol* 56:27-150
- Li, R, Page, DM** (2001)
Requirement for a complex array of costimulators in the negative selection of autoreactive thymocytes in vivo. *J Immunol* 166:6050-6
- Lucas, B, Germain, RN** (1996)
Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4⁺CD8⁺ thymocyte differentiation. *Immunity* 5:461-477
- Lundberg, K, Heath, W, Kontgen, F, Carbone, FR, Shortman, K** (1995)
Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4⁺8^{int} TCR^{int} thymocytes into CD4⁺8^{hi} TCR^{hi} thymocytes. *J Exp Med* 181:1643-1651
- Malissen, M, Gillet, A, Ardouin, L, Bouvier, G, Trucy, J, Ferrier, P, Vivier, E, Malissen, B** (1995)
Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3 ϵ gene. *EMBO J* 14:4641-4653
- Malissen, B, Malissen, M** (1996)
Functions of TCR and preTCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr Opin Immunol* 8:394-401
- Malissen, B, Ardouin, L, Lin, SY, Gillet, A, Malissen, M** (1999)
Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv Immunol* 72:103-148
- Mak, TW, Penninger, JM, Ohashi, PS** (2001)
Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. *Nat Rev Immunol* 1:11-9
- Maraskovsky, E, O'Reilly, LA, Teepe, M, Corcoran, LM, Peschon, JJ, Strasser, A** (1997)
Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* 89: 1011-1019
- Marrack, P, Kappler, J** (1997)
Positive selection of thymocytes bearing $\alpha\beta$ T cell receptors. *Curr Opin Immunol* 9: 250-255
- Matechak, EO, Killeen, N, Hedrick, SM, Fowlkes, BJ** (1996)
MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity* 4:337-47
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ et al.** (1996)
Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15:5647-58
- Melchers F, Karasuyama H, Haasner, D, Bauer, S, Kudo A, Sakaguchi N, Jameson B, Rolink A** (1993)
The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* 14:60-8
- Melchers F, Haasner, D, Grawunder U, Kalberer C, Karasuyama H, Winkler T, Rolink, AG** (1994)
Roles of IgH and L chains and of surrogate H and L chains in the development of cells of the B lymphocyte lineage. *Annu Rev Immunol* 12:209-25

- Melchers** F, Rolink, A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P, Andersson J (1995)
Positive and negative selection events during B lymphopoiesis.
Curr Opin Immunol 7:214-27
- Mombaerts**, P, Clarke, AR, Rudnicki, MA, Iacomini, J, Itohara, S, Lafaille, JJ et al. (1992a)
Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360:225-231
- Mombaerts**, P, Iacomini, J, Johnson, RS, Herrup, K, Tonegawa, S, Papaioannou VE (1992b)
RAG-1 deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68:869-877
- Moore**, TA, von Freeden-Jeffry, U, Murray, R, Zlotnik, A (1996)
Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 $-/-$ mice. *J Immunol* 157:2366-73
- Morrow**, MA, Mayer, EW, Perez, CA, Adlam, M, Siu, G (1999)
Overexpression of the Helix-Loop-Helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages. *Mol Immunol* 36:491-503
- Möröy**, T, Verbeek, S, Ma, A, Achacoso, P, Berns, A, Alt, F (1991)
 $\text{E}\mu$ N- and L-myc cooperate with $\text{E}\mu$ pim-1 to generate lymphoid tumors at high frequency in double transgenic mice. *Oncogene* 6:1941-1948
- Möröy** T, Karsunky, H (2000)
Regulation of pre-T-cell development. *Cell Mol Life Sci* 57:957-75
- Murphy**, KM, Reiner, SL (2002)
The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-44
- Murray**, R, Suda, T, Wrighton, N, Lee, F, Zlotnik, A (1989)
IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets.
Int Immunol 1:526-31
- Nakano**, H, Oshima, H, Chung, W, Williams-Abbott, L, Ware, CF, Yagita, H, Okumura, K (1996)
TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J Biol Chem* 271:14661-4
- Newton**, K, Harris, AW, Strasser, A (2000)
FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor.
EMBO J 19:931-41
- Nossal**, GJV (1994)
Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229-239
- Nutt** SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M (1999)
Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5.
Nature 401:556-62
- Okamura**, RM, Sigvardsson, M, Galceran, J, Verbeek, S, Clevers, H, Grosschedl, R (1998)
Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* 8:11-20

- Olson MC, Scott EW, Hack AA, Su GH, Tenen DG, Singh H, Simon MC (1995)**
PU. 1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. *Immunity* 3:703-14
- Opstelten, D (1996)**
B lymphocyte development and transcription regulation in vivo. *Adv Immunol* 63: 197-268
- Orkin, SH (1995)**
Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 7:870-7
- Owen, MJ, Venkitaraman, AR (1996)**
Signalling in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 8: 191-198
- Pantelouris, EM (1971)**
Observations on the immunobiology of 'nude' mice. *Immunology* 20: 247-252
- Pearse, M, Wu, L, Egerton, M, Wilson, A, Shortman, K, Scollay, R (1989)**
A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1614-1618
- Person, RE, Li, FQ, Duan, Z, Benson, KF, Wechsler, J et al. (2003)**
Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 34:308-12
- Peschon, JJ, Morrissey, PJ, Grabstein, KH et al. (1994)**
Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor deficient mice. *J Exp Med* 180: 1955-1960
- Petrie, HAT, Livak, F, Burtrum, D, Mazel, S (1995)**
T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue und T-cell production. *J Exp Med* 182: 121-127
- Pivniouk, V, Tsitsikov, E, Swinton, P, Rathbun, G, Alt, FW, Geha, RS (1998)**
Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* 94:229-238
- Quandt, K, Frech, K, Karas, H, Wingender, E, Werner, T (1995)**
MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23:4878-84
- Quong, MW, Romanow, WJ, Murre, C (2002)**
E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol* 20:301-22
- Radtke, F, Wilson, A, Stark, G, Bauer, M, van Meerwijk, J, MacDonald, HR, Aguet, M (1999)**
Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10:547-58
- Radtke, F, Wilson, A, Mancini, SJ, MacDonald, HR (2004)**
Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5:247-53
- Reth, M (1992)**
Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10:97

- Rivera, RR, Johns, CP, Quan, J, Johnson, RS, Murre, C (2000)**
Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3.
Immunity 12:17-26
- Rivera, R, Murre, C (2001)**
The regulation and function of the Id proteins in lymphocyte development.
Oncogene 20:8308-16
- Reya, T, Morrison, SJ, Clarke, MF, Weissman, IL (2001)**
Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111
- Roberts, T, Cowell, JK (1997)**
Cloning of the human Gfi-1 gene and its mapping to chromosome region 1p22.
Oncogene 14:1003-5
- Robey, E, Fowlkes, BJ (1994)**
Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 12:675-705
- Rödel, B, Wagner, T, Zörnig, M, Niessing, J, Möröy, T (1998)**
The human homologue (GFI1B) of chicken GFI gene maps to chromosome 9q34.13-A locus frequently altered in hematopoietic diseases. *Genomics* 54:580-582
- Rödel, B, Tavassoli, K, Karsunky, H, Schmidt, T, Bachmann, M, et al. (2000)**
The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *EMBO J* 19:5845-55
- Rodewald, HR, Kretzschmar, K, Swat, W, Takeda, S (1995)**
Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity* 3:313-319
- Rodewald, HR, Ogawa, M, Haller, C, Waskow, C, DiSanto, JP, (1997)**
Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity* 6:265-272
- Rolink AG, Nutt SL, Melchers F, Busslinger M (1999)**
Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401:603-6
- Romanow WJ, Langerak AW, Goebel P, Wolvers-Tettero IL et al. (2000)**
E2A and EBF act in synergy with the V(D)J recombinase to generate a diverse immunoglobulin repertoire in nonlymphoid cells. *Mol Cell* 5:343-53
- Russell, JH (1995)**
Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses.
Curr Opin Immunol 7:382-8
- Saint-Ruf, C, Ungewiss, K, Groettrup, M, Bruno, L, Fehling, HJ, von Boehmer, H(1994)**
Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266:1208-1212
- Sakai, I, Yamauchi, H, Yasukawa, M, Kohno, H, Fujita, S (2001)**
Expression of the Gfi-1 gene in HTLV-1-transformed T cells. *Int J Hematol* 73:507-16
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989)**
Molecular Cloning. *CSH-Laboratory Press*

- Scheijen**, B, Jonkers, J, Acton, D, Berns, A (1997)
Characterization of pa1-1, a common proviral insertion site in Murine Leukemia Virus-induced lymphomas of c-myc and pim-1 transgenic mice. *J Virology* 71:9-16
- Schluns**, KS, Kieper, WC, Jameson, SC, Lefrancois, L (2000)
Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426-432
- Schmidt**, T, Karsunky, H, Gau, E, Zevnik, B, Elsässer, HP, Möröy T (1998a)
Zinc finger protein Gfi-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 17:2661-2668
- Schmidt**, T, Karsunky, H, Rödel, B, Zevnik, B, Elsässer, HP, Möröy, T (1998b)
Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection. *EMBO J* 17:5349-5359
- Scott B**, Kaye J, Lo D (1994)
T cells and suppression in vitro. *Science* 266:464-5
- Sebzda**, E, Mariathasan, S, Ohteki, T, Jones, RG, Bachmann, MF, Ohashi, PS (1999)
Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17: 829-874
- Shimizu**, C, Kawamoto, H, Yamashita, M et al. (2001)
Progression of T cell lineage restriction in the earliest subpopulation of murine adult thymus visualized by the expression of Ick proximal promoter activity. *Int Immunol* 13:105-117
- Shinkai**, Y, Rathburn, G, Lam, KP, Oltz, EM, Stewart, V et al. (1992)
RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-867
- Shinkai**, Y, Koyasu, S, Nakayama, K et al (1993)
Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259:822-825
- Sprent**, J, Surh, CD (2002)
T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20:551-79
- Spain**, LM, Guerriero, A, Kunjibettu, S, Scott, EW (1999)
T cell development in PU.1-deficient mice. *J Immunol* 163:2681-7
- Sternberg**, N, Hamilton, D (1981)
Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* 150:467-86
- Strasser**, A, Harris, AW, Cory, S (1991)
bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67:889-99
- Swat**, W, Shinkai, Y, Cheng, HL, Davidson, L, Alt, FW (1996)
Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4⁺ 8⁺ thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4683-468
- Takemori** T, Rajewsky K (1981)
Lambda chain expression at different stages of ontogeny in C57BL/6, BALB/c and SJL mice. *Eur J Immunol* 11:618-25

- Tavian M, Robin C, Coulombel L, Peault B (2001)**
The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* 15:487-95
- Teh, HS, Kisielow, P, Scott, B, Kishi, H, Uematsu, Y, Bluthmann, H, von Boehmer, H (1988)**
Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335:229-33
- Teh, HS, Kishi, H, Scott, B, von Boehmer, H (1989)**
Deletion of autospecific T cells in T cell receptor (TCR) transgenic mice spares cells with normal TCR levels and low levels of CD8 molecules. *J Exp Med* 169:795-806
- Ten Boekel E, Melchers F, Rolink A (1995)**
The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int Immunol* 7:1013-9
- Thompson, CB, Allison, JP (1997)**
The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7:445-450
- Ting, CN, Olson, MC, Barton, KP, Leiden, JM 1996**
Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384:474-478
- Tong, B, Grimes, HL, Yang, TY, Bear, SE, Qin, Z, Du, K, El-Deiry, WS, Tsichlis, PN (1998)**
The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Mol Cell Biol* 18:2462-2473
- Tsubata T, Reth M (1990)**
The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 172:973-6
- Van Ewijk, W (1991)**
T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 9: 591-615
- Van Seventer, GA, Shimizu, Y, Shaw, S (1991)**
Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 3:294-303
- Von Boehmer, H (1992)**
Thymic selection: a matter of live and death. *Immunol Today* 13: 454-458
- Von Boehmer, H (1993)**
The developmental biology of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 6: 309-326
- Von Boehmer, H (1994)**
Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76: 219-228
- Von Boehmer, H, Aifantis, I, Azogui, O, Feinberg, J, Saint-Ruf, C et al. (1998)**
Crucial function of the pre-T-cell receptor (TCR) in TCR beta selection, TCR beta allelic exclusion and alpha beta versus gamma delta lineage commitment. *Immunol Rev* 165:111-119
- Von Freeden-Jeffry, U, Vieira, P, Lucian, LA, McNeill, T, Burdach, SE, Murray R (1995)**
Lymphopenia in interleukin (IL-) 7 gene deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181: 1519-1526

- Wang JH**, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, Georgopoulos K (1996)
Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5:537-49
- Weiss, A**, Littman, DR (1994)
Signal transduction by lymphocyte antigen receptor. *Cell* 76:263-274
- Weissman, IL** (2000)
Stem cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* 100: 157-168
- Willerford, DM**, Swat, W, Alt, FW (1996)
Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 6:603-609
- Winandy, S**, Wu, L, Wang, JH, Georgopoulos, K (1999)
Pre-T cell receptor (TCR) and TCR-controlled checkpoints in T cell differentiation are set by Ikaros. *J Exp Med* 190:1039-1048
- Winkler TH**, Rolink A, Melchers F, Karasuyama H (1995)
Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface. *Eur J Immunol* 25:446-50
- Wolfer, A**, Bakker, T, Wilson, A, Nicolas, M, Ioannidis, V et al. (2001)
Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2:235-41
- Wu, L**, Li, CL, Shortman, K (1996)
Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 184:903-911
- Yamagami T**, ten Boekel E, Andersson J, Rolink A, Melchers F (1999a)
Frequencies of multiple IgL chain gene rearrangements in single normal or kappaL chain-deficient B lineage cells. *Immunity* 11:317-27
- Yamagami T**, ten Boekel E, Schaniel C, Andersson J, Rolink A, Melchers F (1999b)
Four of five RAG-expressing Jkappa^{-/-} small pre-BII cells have no L chain gene rearrangements: detection by high-efficiency single cell PCR. *Immunity* 11:309-16
- Zhu, J**, Guo, L, Min, B, Watson, CJ, Hu-Li, J, Young, HA, Tsichlis, PN, Paul, WE 2002
Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16:733-44
- Zlotnik, A**, Moore, TA (1995)
Cytokine production and requirements during T-cell development. *Curr Opin Immunol* 7:206-213
- Zörnig, M**, Schmidt, T, Karsunky, H, Grzeschiczek, A, Möröy, T (1996)
Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2. *Oncogene* 12:1789-1801
- Zweidler-Mckay, PA**, Grimes, HL, Flubacher, MM, Tsichlis PN (1996)
Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor *Mol Cell Biol* 16:4024-4034

7. Anhang

7.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Fachartikeln

Molenaar, D, van der Rest, ME, Drysch, A und **Yücel, R** (2000)

Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*.

J Bacteriol 182:6884-91.

Geisen, C, Karsunky, H, **Yücel, R** und Möröy, T (2003)

Loss of p27(Kip1) cooperates with cyclin E in T-cell lymphomagenesis.

Oncogene 22:1724-9.

Yücel, R, Karsunky, H, Klein-Hitpass, L und Möröy, T (2003)

The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus.

J Exp Med 197:831-44.

Yücel, R, Kosan, C, Heyd, F und Möröy, T (2004)

Gfi1:GFP knock-in mutant reveals differential expression and auto-regulation of the gene *Growth factor independence 1 (Gfi1)* during lymphocyte development

J Biol Chem, in Druck

Hertzano, R, Montcouquiol, M, Rashi-Elkeles, S, Elkon, R, **Yücel, R**, Frankel, WF, Rechavi, G, Möröy T, Friedman, TB, Kelley, MW und Avraham, KW (2004)

Transcription profiling of inner ears from Pou4f3^{ddl/ddl} identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene.

Hum Mo Genet, in Druck

Zeng, H, **Yücel, R**, Karsunky, H, Li, Y und Möröy, T. (2004)

Requirement of the transcription factor and onco-protein Gfi1 for maintenance of pool size and long-term engraftment capacity of hematopoietic stem cells.

In Vorbereitung

Rathinam, C, Behrens, M, Geffers, R, **Yücel, R**, Buer, J, Möröy, T und Klein, C (2004)

Transcriptional profiling reveals a role for Gfi-1 in stat-3-dependent dendritic cell development and –function.

In Vorbereitung

Poster

Molenaar, D., van der Rest, M.E., Frank, C., **Yücel, R.** und Petrovic, S. (1998)
Malate:quinone oxidoreductase. A membrane-associated malate dehydrogenase.
BBA EBEC Reports 10ed.

Molenaar, D., van der Rest, M.E., Frank, C., **Yücel, R.**, Drysch, A. und Petrovic, S. (1998)
Malate:quinone oxidoreductase. A membrane-associated malate dehydrogenase in bacteria.
Proteinsekretion und Protein Design, Forschungszentrum Jülich

Van der Rest, M.E., Frank, C., Drysch, A., **Yücel, R.** und Molenaar, D. (1999)
Regulation of oxaloacetate concentration in *Escherichia coli*
Proteinsekretion und Protein Design, Forschungszentrum Jülich

Yücel, R., van der Rest, M.E. und Molenaar, D. (1999)
Alternative NADH dehydrogenases in *Corynebacterium glutamicum*
Proteinsekretion und Protein Design, Forschungszentrum Jülich

Yücel, R., Karsunky, H. und Möröy, T. (2002)
The zinc finger transcriptional repressor Gfi1 affects development of early c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage commitment.
Gene Expression & Signaling in the Immune System, Cold Spring Harbor.

Fang, N., **Yücel, R.**, Zeng, H. und Möröy, T. (2002)
A role of the Transcriptional Repressor Gfi1 in the Development and Activation of B-Lymphocytes.
3rd International Conference on Signal Transduction, Dubrovnik-Cavtat.

Yücel, R., Hertzano, R., Bachmann, M. und Möröy, T. (2003)
Gfi1:GFP knock-in mice reveal expression pattern and autoregulation of the transcription factor Gfi1.
2.Forschungstag der Medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen.

Zeng H., **Yücel R.**, Karsunky H. und Möröy T. (2003)
Requirement of the Transcription Factor Gfi1 for Maintenance of Pool Size and Long-Term Reconstituting Capacity of Hematopoietic Stem Cells.
2.Forschungstag der Medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen.

Yücel, R., Kosan, C, Heyd, F und Möröy, T (2004)
Gfi1:GFP knock-in mutant reveals differential expression and auto-regulation of the gene *Growth factor independence 1 (Gfi1)* during lymphocyte development
12th International Congress of Immunology, Montreal

Vortrag

Yücel, R., Hertzano, R., Bachmann, M. und Möröy, T. (2003)

Gfi1:GFP knock-in mice reveal expression pattern and autoregulation of the transcription factor Gfi1.

2.Forschungstag der Medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen.

Yücel, R., Kosan, C, Heyd, F und Möröy, T (2004)

Gfi1:GFP knock-in mutant reveals differential expression and auto-regulation of the gene *Growth factor independence 1 (Gfi1)* during lymphocyte development

12th International Congress of Immunology, Montreal

Poster- und Vortragspreis

Yücel, R., Hertzano, R., Bachmann, M. und Möröy, T. (2003)

Gfi1:GFP knock-in mice reveal expression pattern and autoregulation of the transcription factor Gfi1.

2.Forschungstag der Medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen.

7.2 Lebenslauf

Name: Raif Yücel
Geburtsdatum: 10.05.1971
Geburtsort: KIRSEHIR/Türkei

Schulbildung:

1977 - 1981 Tackenberg-Grundschule in Oberhausen
 1981 - 1987 Pestalozzi-Hauptschule in Oberhausen
 1987 - 1992 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Oberhausen

Universitätsausbildung:

WS 92/93 – WS 93/94 Studium der Mathematik an der Universität Duisburg-Essen

WS 93/94 – SS 99 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine Universität
 Düsseldorf mit dem Hauptfach Mikrobiologie

01/99 – 09/99 Diplomarbeit im Zentrallabor für Biotechnologie am
 Mikrobiologischen-Institut der Heinrich-Heine-Universität
 Düsseldorf in der Arbeitsgruppe Dr. Dowe Molenaar

Diplomarbeit: „Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen der NADH-
 Dehydrogenasen bei *Corynebacterium glutamicum*“

09/99 Abschluss des Studiums der Biologie und Erlangung des
 akademischen Grades „Diplom-Biologe“

ab 01/2000 Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie der Universität
 Duisburg-Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tarik Möröy

Doktorarbeit: „Funktionelle Analyse und Regulation des Zinkfingerproteins Gfi1 bei
 Lymphozyten anhand gentechnisch veränderter Mäuse“

Wissenschaftliche Beschäftigung:

10/99 – 12/99 Wiss. Angestellter bei Dr. Dowe Molenaar im Zentrallabor für
 Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

seit 01/2000 Wiss. Angestellter am Institut für Zellbiologie der Universität
 Duisburg-Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tarik Möröy

7.3 Danksagung

An dieser Stelle muss ich mich als erstes für das Verständniss von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe I Molekulare Zellbiologie bei allen meinen Ausbrüchen und Launen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Tarik Möröy möchte ich mich für die Überlassung eines sehr interessanten Themas bedanken. Aufgrund seiner großen Begeisterung, seines Engagements und seiner Unterstützung hat er sehr viel zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen. Stets konnte ich frei und selbständig arbeiten und ausführlich mit ihm diskutieren.

Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß sowie den Mitarbeitern Nadine Pieda und Adriane Parchatka im Biochip-Labor am IFZ sei Dank gesagt für die Anfertigung und Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Array-Analysen.

Klaus Lennartz danke ich für den Einstieg in die FACS-Welt und für die präzise Ausführung von zahlreichen FACS-Analysen.

Für die exzellente Hilfe bei allen Tierarbeiten danke ich besonders Petra Plessow und Thomas Civela, bei denen meine Mäuse in guten Händen waren. Im Zusammenhang mit den Mäusen gilt mein Dank auch und besonders Ralph Waldschütz und Wojtek Wegrzyn, die die transgenen Mäuse generierten und dafür sorgten, dass sie sich nicht allzusehr vermehrten.

Diese Arbeit wäre nicht dieselbe gewesen ohne den Spaß, den ich vor allem mit der dauergestressten und „Nicht-Raucherin“ Denis Pargmann, dem genussüchtigen Malte Bachmann und dem immer kritischen Lothar Vassen innerhalb oder außerhalb des Labors hatte.

Bei meinem Oglum, dem „Sekundär-Türken“ Christian Kosan möchte ich für die angenehmen „Umtrunk-Abende (oder war es Nächte?)“, in denen neue Kooperationen entstanden, sowie für seine konstruktive Kritiken beim zusammenschreiben und natürlich für die „langen FACS-Sortierung am DIVA“ bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die zu dem angenehmen und kollegialen Arbeitsklima beigetragen haben, sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt. Besonders Inge Spratte möchte ich für die Mausanalysen sowie für die vielen Kuchen und Kekse bedanken.

Angelika Warda gilt mein ausdrücklicher Dank für die „großen Gele“ und besonders für den Erkenntnis, dass neben der materiellen Kopfwelt auch eine „Pyramiden-Welt“, heilende Welt, existiert. (Danke für die Heilbehandlungen!)

Ich danke auch allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Hanjo Henemann Christoph Geisen und Beate Frass für die humorvolle Arbeitsatmosphäre, das gemeinschaftliche Miteinander und ihre aufbauenden Worte.

Beate Frass, Madame, schulde ich Dank für die über die wissenschaftliche Arbeit hinausgehende verlässliche Freundschaft und natürlich für das gründliche Korrekturlesen (Sie hat versucht diese Arbeit zu verstehen und hat es auch geschafft! Danke!).

Zuletzt, im höchsten Maße, gilt mein **allergrößter Dank** besonders **Aysegül** und meiner **Tochter Enbiya**, für ihre entgegengebrachte Liebe, Geduld und Nachsicht während meiner Doktorarbeit, obwohl ich sie endlos vernachlässigt habe (Verzeiht mir!).

7.4 Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Funktionelle Analyse und Regulation des Zinkfingerproteins Gfi1 bei Lymphozyten anhand gentechnisch veränderter Mäuse“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Raif Yücel befürworte.

Essen, den 13.07.2004

(Prof. Dr. Tarik Möröy)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 13.07.2004

(Raif Yücel)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 13.07.2004

(Raif Yücel)