

**Multiple Defekte der Hämatopoese und T-Zellentwicklung  
in *Gfi-1*-defizienten Mäusen**

Inaugural-Dissertation

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

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

vorgelegt von  
Holger Karsunky

aus Attendorn

Juni 2000

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

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

3. Gutachter: PD Dr. E. Gulbins

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. Grunz

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2000

## **meiner Familie**

Laß die Moleküle rasen,  
was sie auch zusammenknobeln!  
Laß das Tüfteln, laß das Hobeln,  
heilig halte die Ekstasen!

*C. Morgenstern*

# Inhaltsverzeichnis

Seite

## Abkürzungen

### 1 Einleitung

<b>1.1</b>	<b>Das Immunsystem – Ein Überblick</b>	1
<b>1.2</b>	<b>Hämatopoese im Knochenmark</b>	3
<b>1.3</b>	<b>T-Zellentwicklung im Thymus</b>	
1.3.1	Übersicht	7
1.3.2	TCR-unabhängige Differenzierungsschritte	8
1.3.3	TCR-abhängige Selektionsschritte und $\alpha$ -Selektion	12
1.3.4	Positive und negative Selektion	16
1.3.5	CD4 <i>versus</i> CD8 Liniendeterminierung	21
<b>1.4</b>	<b>Signaltransduktion bei T-Lymphozyten</b>	
1.4.1	TCR-vermittelte Signalwege	22
1.4.2	Zytokinrezeptor-vermittelte Signalwege	24
<b>1.5</b>	<b>Das Zinkfingerprotein Gfi-1</b>	26
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	27

### 2 Ergebnisse

<b>2.1</b>	<b>Herstellung Gfi-1-defizienter (Knock-out) Mäuse</b>	28
2.1.1	Strategie und Rekombinationsvektor	29
2.1.2	Erzeugung von ES-Zellklonen mit einem Gfi-1 Nullallel	30
2.1.3	Herstellung von homozygoten Gfi-1 Nullallel Mäusen	32
2.1.4	Nachweis der Gfi-1-Defizienz	33

2.1.5	Allgemeine Bemerkungen zum Phänotyp	34
<b>2.2</b>	<b>Auswirkungen auf das Knochenmark und die Blutbildung</b>	35
2.2.1	Morphologische Veränderungen des Knochenmarks	35
2.2.2	Durchflußzytometrische Analyse des Knochenmarks	36
2.2.3	Erythropoiese und Blutbild	39
<b>2.3</b>	<b>Veränderungen der T-Zellentwicklung im Thymus</b>	41
2.3.1	Verminderung der Thymozytenzahl in Gfi-1 <sup>-/-</sup> Mäusen	41
2.3.2	Analyse der DN Subpopulation im Thymus	45
2.3.3	Einfluß der Apoptose auf den Phänotyp der Gfi-1 <sup>-/-</sup> Mäuse	49
2.3.4	Nähere Charakterisierung der c-Kit <sup>+</sup> Thymozyten	53
2.3.5	Positive und negative Selektion DP Thymozyten	53
2.3.6	Veränderungen während der embryonalen Thymusentwicklung	55
<b>2.4</b>	<b>Einfluß von Gfi-1 auf die Effektorfunktionen reifer, peripherer T-Zellen</b>	57
2.4.1	Lymphadenopathie der zervikalen Lymphknoten bei Gfi-1 <sup>-/-</sup> Mäusen	57
2.4.2	Veränderte Eigenschaften peripherer Gfi-1 <sup>-/-</sup> T-Zellen	60
2.4.3	Verminderte Proliferation in vitro nach Aktivierung Gfi-1-defizienter T-Zellen	63
2.4.4	Analyse der Aktivierbarkeit	65
2.4.5	Interleukin-2 Produktion	67

### **3 Diskussion**

<b>3.1</b>	<b>Bedeutung der Gfi-defizienten Mäuse</b>	68
<b>3.2</b>	<b>Neue Funktion von Gfi-1 während der Erythropoiese?</b>	70
<b>3.3</b>	<b>Einfluß auf die Entwicklung myeloischer Zellen im Knochenmark</b>	73
<b>3.4</b>	<b>Vielfältige Störung der T-Zellentwicklung</b>	76

<b>3.5</b>	<b>Auswirkungen der Gfi-1-Defizienz auf periphere T-Zellen</b>	81
<b>3.6</b>	<b>Das Problem der Letalität</b>	82
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	85
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	
<b>5.1</b>	<b>Chemikalien, Enzyme und Lösungen</b>	87
5.1.1	Chemikalien und Enzyme	87
5.1.2	Häufig verwendete Lösungen	87
5.1.3	Verwendete Größenmarker	88
5.1.4	Verwendete DNA-Sonden	88
<b>5.2</b>	<b>Bakterien</b>	89
5.2.1	Verwendeter Bakterienstamm	89
5.2.2	Kultivierung von Bakterien	89
5.2.3	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	89
5.2.4	Transformation von Bakterien	90
<b>5.3</b>	<b>DNA-Techniken</b>	90
5.3.1	Präparative Plasmidaufreinigung	90
5.3.2	Präparation genomischer DNA	90
5.3.3	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	91
5.3.4	Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel	91
5.3.5	Enzymatische Modifikation von DNA	92
5.3.6	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	92
5.3.7	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	92
5.3.8	„Southern-Blot“ Analyse	92
<b>5.4</b>	<b>RNA-Techniken</b>	93
5.4.1	Aufreinigung von RNA	93
5.4.2	Auftrennung von RNA	94

5.4.3	„Northern“-Analyse	94
5.4.3.1	Kapillartransfer von RNA	94
5.4.3.2	Hybridisierung von RNA auf Nylonmembranen	95
<b>5.5</b>	<b>Protein-Techniken</b>	95
5.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	95
5.5.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-Page)	95
5.5.3	„Immunoblot“-Analyse	97
5.5.3.1	Protein Transfer	97
5.5.3.2	Immunologischer Nachweis	97
5.5.4	Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten	98
5.5.5	Sandwich-ELISA zur Detektion von Interleukin-2	99
<b>5.6</b>	<b>Zellkultur-Techniken</b>	99
5.6.1	Medien und Lösungen	99
5.6.2	Kultur von ES-Zellen	100
5.6.3	Transfektion und Selektion von ES-Zellen	101
5.6.4	Herstellung von embryonalen Mausfibroblasten (MEF)	102
5.6.5	Passagieren von Zellen	102
5.6.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	102
5.6.7	Isolation von T-Lymphozyten aus Organen	103
5.6.7.1	Herstellen einer Einzelzellsuspension	103
5.6.7.2	Erythrozytenlyse	103
5.6.7.3	Aufreinigung von peripheren T-Lymphozyten	104
5.6.8	Kultivierung von murinen Lymphozyten	104
5.6.9	Mitogene Substanzen	104
5.6.10	Bestimmung der Proliferationsrate durch Thymidineinbau	105
5.6.11	FTOC	105
<b>5.7</b>	<b>Zellbiologische Arbeitsmethoden</b>	106
5.7.1	Metaphaseplatten von ES-Zellen	106
5.7.2	Färbung nach Grünwald-Pappenheim	106

<b>5.8</b>	<b>Durchflußzytometrie</b>	107
5.8.1	Verwendete Antikörper	107
5.8.2	Darstellung von Oberflächenmarkern	108
5.8.3	DNA-Färbung mittels Propidiumiodid	109
5.8.4	DNA-Färbung mittels Hoechst 33382	109
5.8.5	CFSE-Färbung	110
5.8.6	Detektion apoptotischer Zellen über AnnexinV	110
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	111
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	
7.1	Publikationsliste	123
7.2	Lebenslauf	125
7.3	Danksagung	126
7.4	Erklärungen	128

## Abkürzungen

<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
<b>APS</b>	<b>Ammoniumpersulfat</b>
<b>bp</b>	<b>Basenpaar</b>
<b>BSA</b>	<b>Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)</b>
<b>CD</b>	<b>internationale Nomenklatur für Oberflächenmarker (cluster of differentiation)</b>
<b>cDNA</b>	<b>Kopie-DNA (copy-DNA)</b>
<b>CDK</b>	<b>Cyclin abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)</b>
<b>Ci</b>	<b>Curie</b>
<b>cpm</b>	<b>Zerfälle pro Minute (engl. „counts per minute“)</b>
<b>DEPC</b>	<b>Diethylpyrocarbonat</b>
<b>DMEM</b>	<b>"Dulbecco's modified eagles medium"</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<b>DN</b>	<b>doppelt negativ</b>
<b>DP</b>	<b>doppelt positiv</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonukleinsäure ("acid")</b>
<b>dNTP</b>	<b>Desoxyribonukleotidtriphosphat</b>
<b>DTT</b>	<b>Dithiothreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamintetraessigsäure ("acid")</b>
<b>Fa</b>	<b>Firma</b>
<b>FBS</b>	<b>foetales Rinderserum (fetal bovine serum)</b>
<b>FITC</b>	<b>Fluoresceinisothiocyanat</b>
<b>FTOC</b>	<b>foetale Thymus Organkulturen (fetal thymic organ culture)</b>
<b>h</b>	<b>Stunde (hour)</b>
<b>hi</b>	<b>hoch (high)</b>
<b>Ig</b>	<b>Immunglobulin</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukin</b>
<b>int</b>	<b>mittlere (intermediate)</b>
<b>kb</b>	<b>Kilobasen</b>
<b>KO</b>	<b>Knock out</b>
<b>lo</b>	<b>niedrig (low)</b>
<b>MAPK</b>	<b>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</b>
<b>µF</b>	<b>Mikro-Faraday</b>
<b>MHC</b>	<b>Haupthistokompatibilitäts Komplex (major histocompatibility complex)</b>
<b>min</b>	<b>Minute</b>
<b>MOPS</b>	<b>Morpholinopropansulfonsäure</b>
<b>mRNA</b>	<b>Boten-RNA (engl. „messenger RNA“)</b>
<b>NC</b>	<b>Nitrocellulose</b>
<b>NK</b>	<b>natürliche Killerzellen</b>
<b>OD</b>	<b>Optische Dichte</b>

<b>PAA</b>	<b>Polyacrylamid</b>
<b>PAGE</b>	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>
<b>PE</b>	<b>Phycoerythrin</b>
<b>PI</b>	<b>Propidiumiodid</b>
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <b>p</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline)
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction)
<b>RNA</b>	<b>R</b> ibonukleinsäure (“ <b>a</b> cid“)
<b>RT</b>	<b>R</b> aumtemperatur
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat ( <b>s</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfate)
<b>SP</b>	einzel positiv ( <b>s</b> ingle <b>p</b> ositiv)
<b>SCF</b>	<b>s</b> tem <b>c</b> ell <b>f</b> actor (c-Kit Ligand)
<b>SPF</b>	spezifisch <b>p</b> athogenfrei
<b>SSC</b>	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>TAE</b>	<b>T</b> ris- <b>A</b> cetate- <b>E</b> DTA-Puffer
<b>TCR</b>	T-Zell Rezeptor ( <b>T</b> -cell <b>r</b> eceptor)
<b>TE</b>	<b>T</b> ris- <b>E</b> DTA-Puffer
<b>TEMED</b>	<b>N,N,N',N'</b> - <b>T</b> etramethylendiamin
<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
<b>Tween20</b>	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
<b>Upm</b>	Umdrehungen <b>p</b> ro <b>M</b> inute
<b>V</b>	<b>V</b> olt
<b>v/v</b>	<b>V</b> olumen/ <b>V</b> olumen
<b>w/v</b>	<b>G</b> ewicht/ <b>V</b> olumen ( <b>w</b> eight/ <b>v</b> olume)

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem – Ein Überblick

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den eigenen Organismus vor Fremdstoffen zu schützen. Insbesondere pathogene Keime wie Bakterien und Viren gefährden ständig unseren Organismus. Aber auch körpereigene, entartete Zellen können Ziel einer Immunantwort sein. Die Bedeutung eines funktionierenden Immunsystems zeigt sich schon allein in der Tatsache, daß selbst einfachste vielzellige Organismen über immunkompetente Zellen verfügen. Offensichtlich ist das Überleben in unserer feindlichen Umwelt ohne geeignete Abwehrmechanismen nicht möglich. So besitzen selbst manche Schwämme (Prolifera) aber auch bereits alle Azoelomaten spezialisierte Zellen, sog. Immunozyten, die Fremdstoffe hauptsächlich durch Phagozytose beseitigen (Brehélin, 1986). Bei den Wirbeltieren hingegen sind die Mechanismen der Immunabwehr erheblich vielschichtiger. Ihre zellulären Bestandteile bezeichnet man häufig als weiße Blutzellen oder Leukozyten. Statt einer Immunozytenpopulation existieren eine Vielzahl phagozytischer Zellen mit unterschiedlichsten Aufgaben und Eigenschaften. Hinzu kommen die lymphoiden Zellen oder Lymphozyten, die unserem Immunsystem entscheidende neue Eigenschaften verleihen (siehe unten). Außerdem werden eine Vielzahl löslicher Faktoren produziert, die in ihrer Gesamtheit das humorale System bilden.

Die Zellen des Immunsystems verteilen sich über den gesamten Körper und bilden ein diffuses Netzwerk. Dieses konzentriert sich in einigen Bereichen und liegt in größeren Verbänden organisiert als lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten vor. Zudem finden sich an allen Oberflächen, die in Kontakt mit unserer Umwelt stehen, wie Haut- und Darmepithel, Ansammlungen von immunkompetenten Zellen. Sie bilden den ersten Abwehring und verhindern effektiv das Eindringen von Fremdstoffen. Nur ein geringer Anteil unseres Immunsystems patrouilliert in Form von einzelnen Zellen durch den Körper. Allerdings findet über die Blut- und Lymphbahnen ein ständiger Austausch zwischen den unterschiedlichen räumlichen Kompartimenten des Immunsystems statt. Wesentlich für das Verständnis von Immunantworten ist jedoch die funktionelle Einteilung in zwei Gruppen: in eine angeborene,

unspezifische bzw. in eine erworbene, spezifische Immunabwehr. Erstere wird von Zellen der myeloischen Reihe repräsentiert, zu welchen insbesondere Monozyten, Makrophagen und Granulozyten gehören. Sie sind in der Lage, Fremdpartikel durch Phagozytose zu eliminieren, Parasiten über Ausschüttung von Toxinen zu töten und Entzündungsreaktionen auszulösen. Die spezifische Immunabwehr hingegen wird von Zellen der lymphatischen Reihe getragen, den Lymphozyten. Diese Zellpopulation verfügt über eine Art Gedächtnisfunktion und ist für die Ausbildung der Immunität verantwortlich, d.h. der erstmalige Kontakt mit einem Krankheitserreger schützt den Körper anschließend vor einer erneuten Infektion durch das gleiche Pathogen. Die Gruppe der Lymphozyten umfaßt als größte Populationen die T- und B-Lymphozyten. Hinzu kommen natürliche Killerzellen (NK) und lymphoide dendritische Zellen, die jeweils in geringerer Zahl vorkommen.

Um seine Aufgaben erfolgreich zu erfüllen, muß das Immunsystem über eine grundlegende Eigenschaft verfügen, nämlich der Selbst- *versus* Fremderkennung. Entsprechend der Einteilung in myeloische und lymphatische Zellen, haben sich in diesen zwei unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Erstere haben im Laufe der Evolution die Fähigkeit erworben, stetig wiederkehrende Muster auf der Oberfläche von Keimen über spezifische Rezeptoren zu erkennen. Bestes Beispiel hierfür sind bestimmte Zuckerbausteine der Zellwände von Bakterien, die in höheren Organismen nicht vorkommen. Sie werden daher leicht als fremd erkannt und lösen eine Immunantwort aus. Die Lymphozyten beschreiten dagegen einen völlig anderen Weg. Auch sie tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die spezifisch Fremdstoffe, sog. Antigene, erkennen. Diese Rezeptoren werden jedoch in einem Zufallsprozeß generiert und gewährleisten in ihrer Gesamtheit, daß prinzipiell gegen jedes mögliche Antigen im voraus ein Erkennungsmolekül existiert (Lewis, 1994; Willerford *et al.*, 1996). Dabei trägt jeder Lymphozyt nur Rezeptormoleküle einer Spezifität. Nach Schätzungen sind stets mindestens  $10^8$  Rezeptoren mit jeweils unterschiedlicher Spezifität vorhanden. Da unser gesamtes Genom nicht über so viele Gene verfügt, können diese Rezeptoren nicht durch jeweils ein Gen kodiert werden. Vielmehr gibt es eine begrenzte Anzahl von Genomabschnitten, die frei miteinander kombiniert werden. Da das Resultat dieser Rekombinationsereignisse zufällig ist, müssen die entstandenen Antigenrezeptoren in einem nachfolgenden Selektionsprozeß überprüft werden, um autoreaktive Zellen auszusondern. Im Fall der T-Zellen ist für die Antigenerkennung der T-

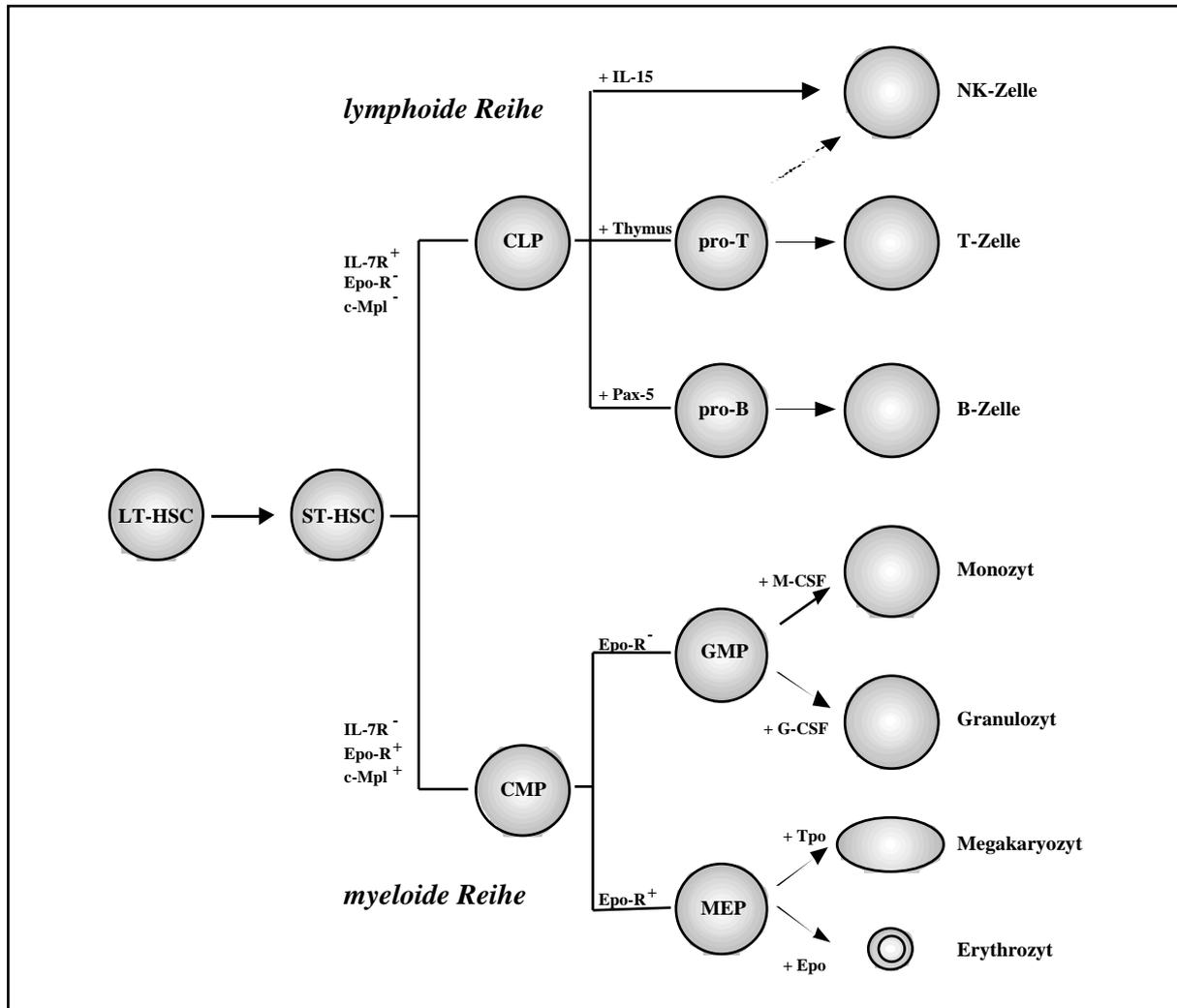
Zellrezeptor (TCR) verantwortlich. Dieser kann nicht einfach frei lösliches Antigen erkennen, sondern muß dieses von antigenpräsentierenden Zellen (APC) über deren Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC, engl. „major histocompatibility complex“) dargeboten bekommen (Germain, 1994). Im Gegensatz dazu binden B-Zellen lösliche Antigene über Immunglobuline (Antikörper), die auf der Oberfläche von B-Zellen als Antigenrezeptor dienen als auch als sezernierte Faktoren Teil des humoralen Systems sind.

Da die vorliegende Arbeit sich im wesentlichen auf Aspekte der T-Zellbiologie beschränkt, soll im folgenden die Entwicklung, beginnend bei pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks bis zur Ausdifferenzierung im Rahmen einer Immunantwort, nachgezeichnet werden. Als Modellsystem wurde die Maus (*Mus musculus*) gewählt, um über genetische Ansätze Aussagen *in vivo* machen zu können. Daher beziehen sich alle Angaben in dieser Arbeit, sofern nicht extra darauf hingewiesen wird, auf das Maussystem.

## **1.2 Hämatopoese im Knochenmark**

Alle Zellen des Immunsystems entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) (Orkin, 1995). Diese finden sich ausschließlich im roten Knochenmark bzw. während der Embryonalentwicklung auch in Blutinseln des Dottersacks sowie der foetalen Leber und Milz. Bei den HSC handelt es sich um pluripotente, sich stetig selbsterneuernde Zellen, die der Regeneration von Geweben dienen (Weissman, 2000). Man unterteilt sie in langlebige (LT-HSC), die praktisch unbegrenzt teilungsfähig sind und kurzlebige (ST-HSC) Stammzellen, die nur ein begrenztes Teilungspotential aufweisen (Bradford *et al.*, 1997). In einer kontinuierlichen Folge von irreversiblen Differenzierungsschritten entstehen aus diesen zunächst Vorläuferzellen, die sich nicht mehr selbst erneuern können und nur begrenzt verschiedene Typen von Blutzellen hervorbringen können, bis schließlich reife Blutzellen gebildet werden. Die einzelnen Populationen lassen sich phänotypisch über die differenzierte Expression von Oberflächenmarkern mittels Durchflußzytometrie darstellen und isolieren. Das Differenzierungspotential solcher aufgereinigter Zellen läßt sich anschließend einfach

experimentell überprüfen, z.B. durch Transplantation in knochenmarkdefiziente Tiere. In Abbildung 1 ist dieser Reifungsprozess der Hämatopoese schematisch abgebildet.



**Abb. 1: Schematisches Modell der wichtigsten hämatopoetischen Reifungsschritte.**

Langlebige, pluripotente, hämatopoetische Stammzellen (LT-HSC) entwickeln sich zu ST-HSC mit geringerem Selbsterneuerungspotential. Nachfolgend findet die Aufteilung in die Reihe der lymphoiden Zellen, repräsentiert durch eine gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (CLP) und in die myeloide Reihe, vertreten durch eine entsprechende gemeinsame Vorläuferzelle aller myeloiden Zellen (CMP), statt. Über eine Zwischenstufe von oligopotenten Zellen entstehen letztlich alle zellulären Bestandteile des Blutes. Ein Teil der bekannten notwendigen Moleküle, von denen Signale für eine bestimmte Entwicklungsrichtung ausgehen, sind ebenfalls angegeben (näheres siehe 1.2).

Wie dieser Prozess genau gesteuert wird, so daß stets alle Populationen in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen, ist derzeit noch unklar. Allerdings konnten mittlerweile eine Vielzahl von Faktoren identifiziert werden, die einzelne Differenzierungsschritte beeinflussen können. Nach einem sehr bildhaften Modell ist das Knochenmark in verschiedene Kompartimente aufgeteilt, in denen unterschiedliche Bedingungen herrschen (Weissman, 1994). Durch die ständige Proliferation der HSC werden kontinuierlich Zellen gezwungen, andere Bereiche zu

besiedeln. In einem veränderten Milieu ist dann eine Aufrechterhaltung als HSC nicht mehr möglich und es findet eine Festlegung auf eine bestimmte Differenzierungsrichtung statt, je nachdem welche Bedingungen vorgefunden werden. Entscheidend für die Differenzierung sind offensichtlich interzelluläre Kontakte und eine Reihe von löslichen Botenstoffen, insbesondere Zytokine. Die Stimulierung entsprechender Rezeptoren führt letztlich über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einem veränderten Expressionsmuster und somit zu einem neuen Phänotyp. Ein Teil der bekannten Zytokine und Transkriptionsfaktoren, die Übergänge zwischen zwei Populationen regulieren können, ist in Abbildung 1 angegeben.

Bei der Blutbildung entstehen zunächst aus den HSCs mindestens zwei Arten von multipotenten Zellen: die der lymphatischen (engl. „common lymphoid progenitor“, CLP; Akashi *et al.*, 2000a) und die der myeloischen Reihe (engl. „common myeloid progenitor“, CMP; Akashi *et al.*, 2000b). Bei der Maus sind die CLPs gekennzeichnet durch das Expressionsprofil  $IL-7R^+Lin^-Sca-1^{lo}c-Kit^{lo}$ . „Lin“ steht dabei für die Gesamtheit von linienspezifischen Markern reifer hämatopoetischer Zellen (CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1, Ter119, CD19 und IgM) und „lo“ kennzeichnet schwache (engl. „low“) Expression. Die Population der CLPs ist ausschließlich befähigt pro-T, pro-B und NK-Zellen auszubilden. Entscheidende Signale für die Bildung von lymphoiden Zellen gehen dabei von Interleukin-7 (IL-7) aus. IL-7 oder IL-7 Rezeptor (IL-7R) gendefiziente Mäuse besitzen eine stark reduzierte Anzahl an T- oder B-Zellen (Peschon *et al.*, 1994; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995). Der Verlust der gemeinsamen Rezeptorkette ( $\gamma$ ) der Zytokine IL-2, 4, 7, 9 und 15 führt außerdem zu einem Verlust von NK Zellen (Ohbo *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß für die fehlende Ausbildung von NK Zellen der Verlust an IL-15 vermittelten Signalen entscheidend ist (Lodolce *et al.*, 1998). Die Festlegung, ob aus einer CLP eine pro-T oder pro-B Zelle wird, ist bislang weniger definierbar. *In vivo* induziert wahrscheinlich einfach die Thymusumgebung die Entwicklung von CLP zu pro-T Zellen (siehe 1.3). Demhingegen entwickeln sich pro-B-Zellen größtenteils im Knochenmark und nur zu einem geringen Anteil im Thymus (Akashi *et al.*, 2000c). Möglicherweise ist die Abwesenheit von IL-7 vermittelten Signalen notwendig für die effiziente Entwicklung von B-Zellen. Ein weiterer Faktor, der für die Bildung und Aufrechterhaltung von pro-B-Zellen essentiell ist, ist Pax-5. Defizienz dieses Transkriptionsfaktors führt zu einem vollständigen Verlust von B-Zellen (Nutt *et al.*, 2000).

Die Entwicklung der NK-Zellen verläuft hingegen weniger restriktiv, da offenbar mindestens zwei verschiedene Populationen existieren. Zum einen NK-Zellen, die direkt aus CLPs entstehen und zum anderen die sog. NK T-Zellen, die sich erst aus den pro-T Zellen im Thymus entwickeln (Akashi *et al.*, 2000a; Carlyle *et al.*, 1997).

Der Beginn der myeloischen Reihe wird repräsentiert durch die Bildung von CMPs, die phänotypisch bei der Maus als IL-7R<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Fc R<sup>lo</sup> CD34<sup>+</sup> charakterisiert wurden (Akashi *et al.*, 2000b). Die Entwicklung der myeloischen Zellen wird begünstigt durch Signale der Zytokine Erythropoietin (Epo) und Thrombopoietin (Tpo). Nach einem derzeit aktuellen Modell entstehen hieraus zwei oligopotente Populationen. Die eine Population bildet Vorläuferzellen für Monozyten und Granulozyten (engl. „granulocyte/macrophage progenitor“, GMP), die sich durch Hochregulation des Fc Rezeptors auszeichnen. Unter dem Einfluß von Granulozytenkolonien stimulierenden Faktor (G-CSF) bilden sich hieraus Granulozyten bzw. unter Monozytenkolonien stimulierenden Faktor (M-CSF) die Population der Monozyten. Letztere bilden die Grundlage für alle Gewebsmakrophagen wie Osteoklasten, Alveolarmakrophagen, etc. Demhingegen markiert die Reduktion der CD34 Expression auf den CMPs eine Festlegung hin zur Entwicklung von Megakaryozyten und Erythrozyten (engl. „megakaryocyte/erythrocyte progenitor“, MEP). Die weitere Differenzierung in Erythrozyten wird maßgeblich von Epo getragen (Tilbrook und Klinken, 1999), während die Bildung von Megakaryozyten und schließlich von Thrombozyten Tpo (Alexander, 1999) abhängig ist.

Eine sehr viel heterogenere Zellpopulation, die sich nicht eindeutig in die lymphatische oder myeloische Reihe einordnen läßt, stellen die dendritischen Zellen (DC) dar. Auch sie sind wesentlicher Bestandteil unseres Immunsystems und dienen vor allem als APCs. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, daß es sowohl lymphoide DC gibt, die sich im Thymus aus pro-T Zellen entwickeln, als auch myeloische, die ihren Ursprung im Knochenmark unter dem Einfluß von GM-CSF haben (Bell *et al.*, 1999).

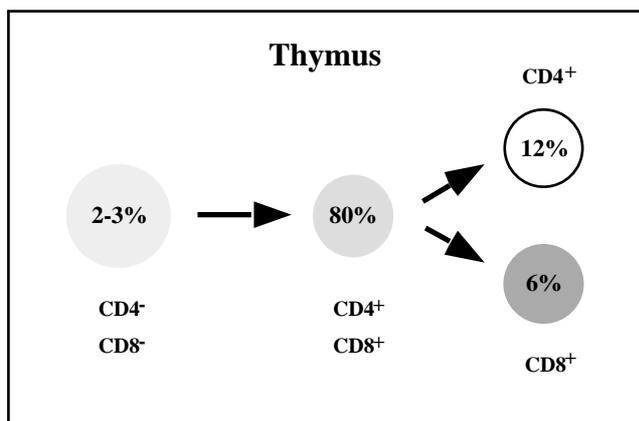
## 1.3 T-Zellentwicklung im Thymus

### 1.3.1 Übersicht

Der Thymus ist das wichtigste Organ der T-Zellentwicklung. Kontinuierlich wandern Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ein, durchlaufen eine Vielzahl von Differenzierungs- und Proliferationsschritten und verlassen den Thymus schließlich als reife T-Zellen. Histologisch läßt sich der Thymus in zwei Bereiche grob unterteilen: einer kerndichten, kortikalen Region, dem Thymuskortex, und einem hellen, zentralen Bereich, dem Thymusmark (van Ewijk, 1991). Die unreifen T-Zellen, auch Thymozyten genannt, sind dabei in ein loses Maschenwerk aus Zellen eingebettet, das man als Stroma bezeichnet. Dies besteht hauptsächlich aus nichtlymphoiden epithelialen Zellen und Makrophagen sowie dendritischen Zellen. Umgeben ist das gesamte Organ von einer Kapsel aus kollagenem Bindegewebe, das sich in Septen fortsetzt und den Thymus in einzelne Lappen unterteilt (Junqueira und Carneiro, 1991). Es wird allgemein angenommen, daß Vorläuferzellen über subkapsuläre Gefäße die äußerste Kortexregion besiedeln und während der Reifung in immer zentralere Bereiche des Thymus wandern. Dabei treten sie in engen Kontakt mit dem umgebenen Stroma, dessen enorme Bedeutung für die Entwicklung von T-Zellen u.a. Mausmutanten gezeigt haben. So fehlen Nacktmäusen, die für die nude-Mutation homozygot sind (*nu/nu*), fast jegliche T-Zellen (Pantelouris 1971; Blackburn *et al.*, 1996). Das für diesen Phänotyp entscheidende Gen *whn*, ein Transkriptionsfaktor aus der Winged-Helix Familie, ist dabei nicht essentiell für die Ausbildung des Stromas sondern vielmehr für die interzellulären Kontakte zwischen Thymozyten und Epithelzellen (Nehls *et al.*, 1996).

Neben der histologischen Einteilung kann erneut über die differentielle Expression von Oberflächenmarkern eine sequentielle Abfolge der Thymozytenentwicklung aufgezeigt werden. Besonders die Expression der beiden Korezeptoren CD4 und CD8 erlaubt eine hilfreiche Klassifizierung (Ellmeier *et al.*, 1999; Kisielow und von Boehmer, 1995; Fehling und von Boehmer, 1997). So sind Thymozyten während ihrer frühesten Entwicklungsstadien negativ für beide Oberflächenproteine ( $CD4^-CD8^-$ , DN), mit der Ausnahme, daß sehr frühe pro-T-Zellen eine schwache CD4 Expression aufweisen. Die Population der DN Thymozyten macht

nur etwa 2-3% des gesamten Thymus aus. In ihr finden aber wesentliche Differenzierungs- und Expansionsschritte statt, die unter 1.3.2 und 1.3.3 näher erläutert werden. Die nachfolgenden Thymozyten bilden mit 75-80% die zahlenmäßig größte Population, die durch Expression beider Korezeptoren ( $CD4^+CD8^+$ , DP) charakterisiert wird. In diesem Stadium sterben die meisten Thymozyten (ca. 95%) durch Apoptose, da sie bestimmte Selektionskriterien nicht erfüllen (siehe 1.3.4) und werden von Makrophagen eliminiert. Der Verlust der Expression einer der beiden Korezeptoren schließt den Reifungsprozeß im Thymus ab. Es entstehen reife  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  einzelpositive T-Zellen (SP), die über das Mark in die Peripherie auswandern, um dort ihrer Funktion als Helfer- bzw. zytotoxischer T-Zellen nachzukommen. Somit ergibt sich eine grobe Einteilung der Thymozyten in vier Populationen, die in Abbildung 2 schematisch zusammengefaßt ist.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Subpopulationen im Thymus.**

Aufteilung der Thymozyten in Subpopulationen entsprechend der differentiellen Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 nach den vier möglichen Kombinationen:  $CD4^-CD8^-$  doppelt-negativ,  $CD4^+CD8^+$  doppelt-positiv und die beiden einzelpositiven Populationen  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$ . Die jeweiligen prozentualen Anteile der Subpopulationen an der Gesamthymozytenzahl sind angegeben.

### 1.3.2 TCR-unabhängige Differenzierungsschritte

Die frühe Phase der T-Zellentwicklung ist gekennzeichnet durch drei einschneidende Ereignisse: der Determinierung von CLP zur Reihe der T-Zellen, Expansion durch Proliferation und Selektion eines prä-TCR Komplexes (Fehling und von Boehmer, 1997). Alle drei Prozesse finden vollständig in der Population der DN Thymozyten statt. Bezieht man zusätzlich die Abwesenheit des TCR mit ein, so spricht man auch von tripel-negativen Thymozyten (TN). Diese bilden keine homogene Einheit, sondern können wiederum anhand der Expression von Oberflächenproteinen unterteilt werden. Als Marker haben sich besonders CD25 (Interleukin-2R -Kette), CD44 (Phagozyten-Glykoprotein PGP-1) und CD117 (c-Kit, Rezeptortyrosinkinase für *steel factor* oder SCF) als nützlich erwiesen (Godfrey *et al.*, 1993).

Abbildung 3 zeigt die phänotypisch unterscheidbaren Populationen und ordnet sie einer zeitlichen Abfolge zu. Die früheste Subpopulation innerhalb der DN Thymozyten sind  $CD44^+CD25^-$  (DN1). Allerdings enthält diese Population auch Zellen die NK, B- und lymphoide-dendritische Zellen ausbilden können. Es ist daher wahrscheinlich, daß direkt CLPs aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern und durch die dort vorgefundenen Bedingungen erst zu pro-T Zellen weiterdifferenzieren. Interessanterweise scheint die Menge an c-Kit Expression mit einer Festlegung auf die T-Zellreihe zu korrelieren. So werden phänotypisch die frühesten bekannten T-Vorläuferzellen des Thymus als  $CD4^{lo}CD8^-CD25^-CD44^+c-Kit^+$  beschrieben (Wu *et al.*, 1991). Dahingegen weisen  $c-Kit^-$  Zellen der DN1 teilweise B-Zell spezifische Marker auf (wie z.B. CD19), während  $c-Kit^{lo}$  Zellen im größeren Ausmaße Vorläuferzellen von dendritischen bzw. NK T-Zellen sind (Fehling *et al.*, 1999). Erst das Anschalten der CD25 Expression (DN2) scheint den Zeitpunkt für die irreversible Festlegung hin zur T-Zellreihe zu markieren. Diese Population trägt noch hohe c-Kit Expression, während die nachfolgenden Zellen sowohl die Expression von CD44 als auch von c-Kit einstellen. In den resultierenden  $CD25^+CD44^-$  Thymozyten (DN3) findet nun die Umgruppierung der TCR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  Ketten statt. Nur Zellen, denen eine produktive Umgruppierung der TCR  $\alpha$ -Kette gelungen ist und die einen funktionellen prä-TCR Komplex exprimieren, werden als „ $\alpha$ -selektioniert“ bezeichnet. Sie bilden einen Pool an  $CD25^-CD44^-$  (DN4) Thymozyten, die anschließend CD4 und CD8 hochregulieren und damit zur DP Population werden.

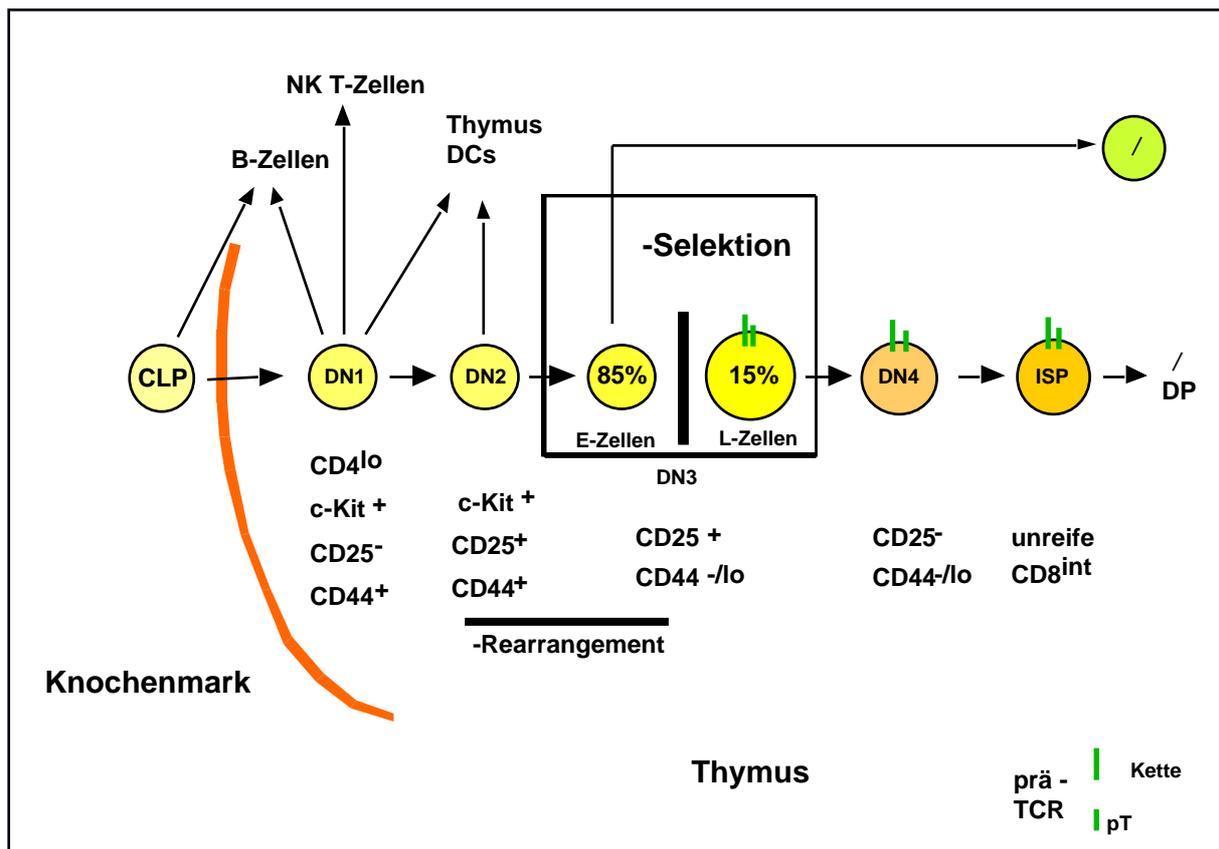


Abb. 3: Differenzierung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DN) Thymozyten.

Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich zu einem Vorläufer für alle lymphoiden Zellen (CLP). Die nachfolgenden Schritte werden durch differentielle Expression der Oberflächenmarker CD25, CD44 und c-Kit charakterisiert. Aus den unreiferen Stadien können zudem NK, B- und dendritische (DC) Zellen entstehen. Besonders hervorgehoben ist der für die T-Zellentwicklung kritische Schritt der  $\beta$ -Selektion, der in den E-Zellen der DN3 Population stattfindet. Diese Subpopulation besitzt noch zusätzlich die Fähigkeit  $\alpha$  /  $\beta$  T-Zellen zu bilden.

Da bis zum Zeitpunkt der  $\beta$ -Selektion kein funktioneller TCR existiert, müssen die vorangehenden Differenzierungsschritte von anderen Faktoren gesteuert werden. Unter diesen sind die bereits erwähnten Zytokine IL-7 und SCF hervorzuheben (Baird *et al.*, 1999). Beide werden von epithelialen Zellen des Thymuskortex sezerniert. c-Kit, der Rezeptor für SCF, wird während der DN Stadien eins und zwei auf den Thymozyten exprimiert. Die  $\beta$ -Kette des heterodimeren IL-7 Rezeptors wird zusätzlich in DN3 und der Mehrzahl der Zellen in DN4 exprimiert während die  $\alpha$ -Kette (c) als integraler Bestandteil einer Zytokinrezeptorfamilie konstitutiv auf allen T-Zellen exprimiert wird (Nakajima *et al.*, 2000). Beide Zytokinrezeptoren sind zudem auf einer kleinen DP Subpopulation vorhanden, wo sie wichtige Signale für die positive/negative Selektion bereitstellen (siehe 1.3.4). Die Bedeutung

von c-Kit bzw. IL-7 vermittelten Signalen für die T-Zellentwicklung läßt sich erneut anhand des Phänotyps gendefizienter Mäuse zeigen. Der Verlust von IL-7 und IL-7R  $\alpha$ -Kette führt zu einer dramatischen Reduktion der Thymozytenzahl sowie von pro-T und pro-B Zellen im Knochenmark (Peschon *et al.*, 1994; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995). Der unvollständige Block der T-Zellentwicklung findet beim Übergang von DN2 zu DN3 statt, wobei der IL-7R  $\alpha$ -Kette Phänotyp etwas ausgeprägter ist. Noch größere Auswirkung hat der Verlust der  $\beta$ -Kette, da nun auch die Populationen der  $\alpha\beta$  T-Zellen und die NK T-Zellen betroffen sind. Doch welche abwärts von IL-7 gelegenen Signale sind für die Beeinträchtigung der T-Zellentwicklung verantwortlich? Zunächst werden über die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen p56<sup>Lck</sup> und p59<sup>Fyn</sup> die MAPK- und PI3K-Signaltransduktionswege angeschaltet (siehe 1.4.1), sowie über die Januskinasen Jak1 und Jak3 der Transkriptionsfaktor STAT5 (1.4.2; Baird *et al.*, 1999). Ein Teil dieser Wege führt offensichtlich über die Aufrechterhaltung der Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> Expression antiapoptotische Stimuli aus. So kann das Einbringen von exogenem Bcl-2 durch Transgene zumindest teilweise den Phänotyp funktionell kompensieren. Allerdings hat Bcl-2 keinen Einfluß auf den Verlust von B-, NK T- und  $\alpha\beta$  T-Zellen bei  $\beta$ -Kette Tieren (Kondo *et al.*, 1997). Desweiteren findet sich eine Reduktion der Proliferation innerhalb der DN Population der drei angesprochenen gendefizienten Mausstämme. Hierfür verantwortlich könnte die fehlende Aktivierung von STAT5 sein. Es konnte gezeigt werden, daß eines der Zielgene von STAT5, die Serin/Threonin-Kinase Pim-1, für die proliferative Expansion der DN3 Zellen mitverantwortlich ist. So kann transgen exprimiertes Pim-1 größtenteils den Verlust von IL-7R  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette ausgleichen (Jacobs *et al.*, 1999).

Das zweite entscheidende Zytokin der frühen T-Zellentwicklung ist der c-Kit Ligand SCF (Baird *et al.*, 1999). SCF oder c-Kit gendefiziente Mäuse zeigen eine Reduktion sämtlicher Leukozyten, was bereits für eine frühe Funktion bei Vorläuferzellen im Knochenmark spricht. Allerdings ist die Thymozytenzahl deutlich stärker betroffen als andere Populationen. Dies ist wahrscheinlich vor allem auf eine mangelhafte Expansion der DN1 Population zurückzuführen. Somit dürfte SCF vornehmlich proliferative Funktionen zukommen, wobei die ausgelösten Signaltransduktionswege denen von IL-7 sehr ähnlich (Linnekin, 1999) sind. Neben der PI3K und dem MAPK-Weg (siehe 1.4.1) werden die Tyrosinkinasen Fyn und Lyn aktiviert.

Hauptunterschied zu IL-7 ist jedoch die Rekrutierung von JAK2 und damit die Aktivierung von STAT1. Allerdings gibt es Hinweise, daß auch STAT5 aktiviert und STAT3 durch Serinphosphorylierung modifiziert wird. Die in Teilen redundante Funktion von IL-7 und SCF zeigt sich auch in c-Kit/ c-Kette doppelt null Mäusen, die einen vollständigen Block im Stadium der DN1 Zellen aufweisen (Rodewald *et al.*, 1997).

### 1.3.3 TCR-abhängige Selektionsschritte und $\beta$ -Selektion

Innerhalb der DN3 Population ( $CD25^+CD44^-$ ) werden die Gene der TCR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Ketten, in einem Prozeß, den man V(D)J Rekombination nennt (Lewis, 1994; Willerford *et al.*, 1996), umgruppiert. Hingegen findet das Rearrangement der TCR  $\delta$  Kette erst später in der Population der DP statt. Diese Rekombinationsereignisse sind strikt abhängig von der Expression der Rekombination-aktivierenden Gene rag-1 und rag-2. Deren Genprodukte katalysieren eine Reaktion in der zuerst D mit J Elementen der TCR Loci verknüpft werden und anschließend ein variables Gensegment V an das entstandene DJ Produkt. Diese zweite Anlagerung ist weniger genau, was den Vorteil hat, daß durch die V(D)J Verknüpfung eine höhere Diversität an TCR Produkten entsteht. Allerdings kommt es auch zu nicht-funktionellen Leserahmen, deren Genprodukte nicht exprimiert werden können. Daher ist es zwingend erforderlich, daß der entstandene TCR auf seine Funktionalität hin überprüft wird. Dies geschieht in einem Prozeß, der als  $\beta$ -Selektion bezeichnet wird, da die überwiegende Mehrheit der T-Zellen der  $\beta$  /  $\delta$  Reihe zugehörig sind (95%) und dieser Selektionsschritt bisher nur für diese Zellen befriedigend beschrieben wurde.

Sobald ein produktives  $\beta$ -Genrearrangement stattgefunden hat, wird die  $\beta$ -Kette zusammen mit einem pT  $\beta$  Molekül und dem CD3 Komplex auf der Oberfläche der Thymozyten exprimiert (siehe Abb. 5; Fehling und von Boehmer, 1997; Godfrey *et al.*, 1994; Petrie *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1994; Mallick *et al.*, 1993). Von einem solchen prä-TCR gehen offensichtlich, wahrscheinlich ohne Bindung eines Liganden (Irving *et al.*, 1998), ein Überlebenssignal aus, als auch ein Proliferationssignal, welches der Expansion dieser Zellen dient. Die verantwortlichen Signalwege sind denen von reifen T-Zellen sehr ähnlich und werden unter 1.4 besprochen (Farrar *et al.*, 1998). Zellen, die ihre  $\beta$ -Ketten Gene nicht produktiv umgruppiert haben,

bekommen eine zweite Chance / Zellen zu werden oder sie werden eliminiert. Dieser Schritt der  $\beta$ -Selektion ist begrenzt auf die DN3 Population, die sich anhand morphologischer Kriterien nochmals in zwei Subpopulationen aufteilen läßt. Zum einen in Zellen, die noch vor der  $\beta$ -Selektion stehen und als E-Zellen (engl. „expected size“; ca. 85%) bezeichnet werden. Die Ausbildung des prä-TCR führt zu großen, blastoiden Zellen, die daher L-Zellen (engl. „large size“; ca. 15%) genannt werden. Diese zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate und im Leserahmen befindliche TCR  $\beta$  Umgruppierungen aus (Hoffmann *et al.*, 1996).

Die über den prä-TCR Komplex ausgelöste Expansionswelle wird gesteuert durch veränderte Expression oder Aktivität Zellzyklus relevanter Proteine. So besitzen L-Zellen größere Mengen an Zyklin A und B sowie eine höhere CDK2 Aktivität im Vergleich zu E-Zellen. Entscheidender ist aber die Verringerung der p27<sup>KIP1</sup> Proteinmenge. Dieser Inhibitor G1-spezifischer Zyklin/CDK Komplexe wird sehr hoch in E-Zellen exprimiert und ist in L-Zellen nahezu abwesend (Hoffmann *et al.*, 1996). Diese Beobachtung zeigt deutlich die Verknüpfung zwischen  $\beta$ -Selektion und Zellzyklusprogression. Dementsprechend weisen p27<sup>KIP1</sup> defiziente Mäuse eine erhöhte Thymozytenzahl auf, verbunden mit einer Zunahme der L-Zellpopulation (eigene Beobachtung).

Die enorme Bedeutung der Rekombination und der nachfolgenden Expression eines prä-TCR zeigt sich anhand Rag-1- und Rag-2-defizienter Mäuse (Mombaerts *et al.*, 1992; Shinkai *et al.*, 1992). Hier findet ein vollständiger Block innerhalb der DN3 Population statt, nämlich bei den E-Zellen. Einen vergleichbaren Phänotyp zeigen Mäuse, denen entscheidende Komponenten des TCRs fehlen, oder bei denen zugehörige Signaltransduktionswege inhibiert sind. Beispiele hierfür sind gendefiziente Mäuse der CD3  $\beta$ -Kette, der Tyrosinkinase p56<sup>Lck</sup>, des Adapterprotein SLP-76 oder auch Transgene mit dominant negativen Mutanten der Kinase MEK-1 oder des Transkriptionsfaktors c-Jun (DeJarnette *et al.*, 1998; Malissen *et al.*, 1999; Levin *et al.*, 1993; Clements *et al.*, 1998; Pivniouk *et al.*, 1998; Crompton *et al.*, 1996; King *et al.*, 1999). Umgekehrt kann der Rag-1<sup>-/-</sup> und Rag-2<sup>-/-</sup> Phänotyp durch transgenes Einbringen einer TCR  $\beta$ -Kette (Shinkai *et al.*, 1993) oder von konstitutiv aktiven c-Raf-1 und Ha-Ras (Swat *et al.*, 1996; Iritani *et al.*, 1999) in der Weise wieder aufgehoben werden, daß sich CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) Thymozyten bilden.

Neben dem Proliferationssignal muß aber vom prä-TCR noch ein weiteres Signal ausgehen: das zur allelischen Exklusion (Robey und Fowlkes, 1994; von Boehmer *et al.*, 1998). Da jede T-Zelle nur einen TCR mit einer Spezifität tragen darf, muß nach erfolgter Umgruppierung und Expression einer funktionellen  $\alpha$ -Kette (oder  $\beta$ -Kette) die Rekombination gestoppt werden, um eine Umgruppierung des zweiten  $\alpha$ -Ketten (bzw.  $\beta$ -Ketten) Alleles zu verhindern. Gleichzeitig findet eine isotypische Exklusion, d.h. einer Unterdrückung des TCR  $\alpha$  (bzw.  $\beta$ ) Locus statt, um die Bildung von  $\alpha\alpha$  / oder  $\beta\beta$  / T-Zellen zu gewährleisten. Ein Mechanismus der allelischen Exklusion ist sicherlich das Abschalten der Rag-1 und Rag-2 Expression und damit Einstellung der Rekombination über prä-TCR vermittelte Signale. Da aber zu einem späteren Zeitpunkt beide Gene wieder aktiviert werden, um die  $\alpha$ -Kette umzugruppieren, muß noch ein zweiter Mechanismus existieren. Dieser beeinflusst offensichtlich die Zugänglichkeit des TCR  $\alpha$ -Locus, durch lokale Veränderung der Chromosomenstruktur im  $\alpha$  Locus. Somit wird verhindert, daß Transkriptionsfaktoren und Rekombinationsenzyme überhaupt dort angreifen können. Entsprechende Signale werden dabei über die Tyrosinkinase p56<sup>Lck</sup> vermittelt (Gärtner *et al.*, 1999; Iritani *et al.*, 1999). Allerdings ist derzeit unklar über welche Wege das Signal in den Kern weitergeleitet wird. Die direkt abwärts von p56<sup>Lck</sup> gelegenen Faktoren Ras und c-Raf-1 leiten lediglich proliferationsfördernde Signale weiter, so daß auf der Ebene von Lck ein zweiter Weg angeschaltet werden muß. Eine derzeit diskutierte Möglichkeit wäre die Aktivierung von Rho durch p56<sup>Lck</sup> (Cleverley *et al.*, 1999).

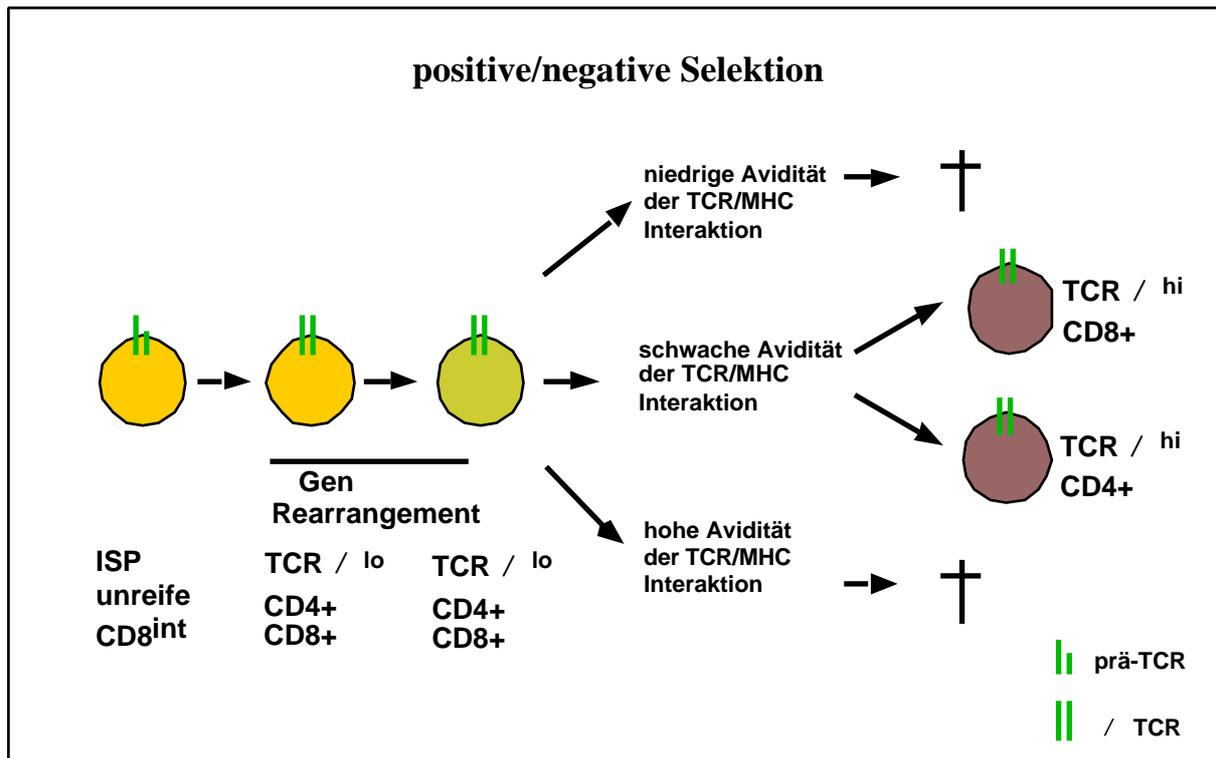
Neben der  $\alpha$ -Selektion findet in der DN3 Population aber auch die Linienentscheidung statt, ob eine T-Zelle eine  $\alpha\alpha$  / oder eine  $\beta\beta$  / Zelle wird (Fehling *et al.*, 1999). Es ist anzunehmen, daß  $\alpha\alpha$  / Zellen analog zur  $\alpha$ -Selektion einen Reifungsprozeß durchlaufen, der sicherstellt, daß nur Zellen mit einem funktionellen TCR überleben. Allerdings konnte bisher kein prä-TCR Komplex auf  $\alpha\alpha$  / Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Dagegen wurde klar gezeigt, daß  $\beta\beta$  / Zellen sich aus der E-Zellpopulation entwickeln, während die  $\alpha$ -selektierten L-Zellen keinen  $\alpha\alpha$  / TCR mehr bilden können. Nach einem gängigen Modell findet die Umgruppierung der TCR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  Ketten gleichzeitig statt. Erfolgreiches Rearrangement eines Locus verhindert durch allelische Exklusion die Rekombination der verbliebenen Loci. Wird z.B. die  $\alpha$ -Kette zuerst produktiv umgruppiert, so werden die  $\beta$  Allele abgeschaltet und die Zelle

durchläuft eine Art  $\alpha$ -Selektion (Passoni *et al.*, 1997). Der Grund, warum beide T-Zellarten nicht im gleichen Verhältnis vorliegen, könnte am Fehlen einer proliferativen Expansion liegen und tatsächlich sind bisher keine  $\alpha$  /  $\beta$ -L-Zellen beschrieben worden. Dieses kompetitive Modell impliziert gleichzeitig, daß vom  $\alpha$  /  $\beta$  TCR ähnliche Signale ausgehen wie vom  $\gamma$  /  $\delta$  TCR, jedoch sind weder die genaue Stöchiometrie noch die ausgelösten Signale des  $\alpha$  /  $\beta$  TCR bekannt. Neben dem Fehlen einer pT  $\beta$  Kette gibt es eine Reihe von qualitativen Unterschieden zwischen den beiden Rezeptortypen. So können  $\alpha$  /  $\beta$  Zellen über Stimulation ihres TCR nicht im gleichen Ausmaße zur Proliferation angetrieben werden, wie das bei  $\gamma$  /  $\delta$  Zellen der Fall ist. Ein zusätzlicher Einfluß könnte von dem Transmembranprotein Notch ausgehen. Dieser Rezeptor ist an fast allen Linienentscheidungen der T-Zellentwicklung (T- oder B-Zelle;  $\alpha$  /  $\beta$  oder  $\gamma$  /  $\delta$  Zelle; CD4 oder CD8 T-Zelle) beteiligt (Deftos und Bevan, 2000). Dabei scheinen Notch-vermittelte Signale die Bildung von  $\alpha$  /  $\beta$  Zellen zu fördern (Washburn *et al.*, 1997). Letztlich ist auch IL-7 an der  $\alpha$  /  $\beta$  versus  $\gamma$  /  $\delta$  Linienentscheidung beteiligt. Im Gegensatz zu Notch fördert IL-7 oder genauer der STAT5 Anteil der IL-7 Signaltransduktionskette die Bildung von  $\alpha$  /  $\beta$  Zellen, indem es die Zugänglichkeit des J Segmentes für die Rekombinationsmaschinerie erhöht (Ye *et al.*, 1999). Dementsprechend führt konstitutiv aktives STAT5 in IL-7R<sup>-/-</sup> Thymozyten zu einer Erhöhung der  $\alpha$  /  $\beta$  Population (Ye *et al.*, 1999). Das weitere Schicksal der  $\alpha$  /  $\beta$  Zellen liegt dagegen noch im Dunkeln. Es wird vermutet, daß sie ähnlich den  $\gamma$  /  $\delta$  Zellen eine Selektion ihres TCR durchführen und anschließend in die Peripherie, insbesondere die Epidermis und das Dünndarmepithel auswandern (Born *et al.*, 1999). Da der Verlust von  $\alpha$  /  $\beta$  Zellen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bestimmten Keimen führt, sind sie trotz ihrer geringen Zahl wesentlicher Bestandteil unseres Immunsystems.

Die  $\alpha$  /  $\beta$  Zellen hingegen regulieren nach erfolgter  $\alpha$ -Selektion und Expansion CD25 herunter und erreichen die Population der DN4 Zellen (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>). Alle Zellen in DN4 weisen einen sich im Leserahmen befindlichen, umgruppierten  $\beta$ -Locus auf und beginnen sehr schnell zuerst den CD8 Korezeptor zu exprimieren, was zu einer kleinen Population mit mittlerer CD8 Expression (ISP) führt. Diese wiederum regulieren die Expression beider Korezeptorgene parallel hoch und bilden schließlich die Hauptpopulation der Thymozyten, die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP.

#### 1.3.4 Positive und negative Selektion

Der zweite wichtige Selektionsprozeß, das Erkennen von fremd und eigen, findet innerhalb der DP Thymozyten statt. Während prä-TCR Selektion und  $\alpha$ -Selektion die Spezifität und eine möglichst große Diversität gewährleisten sollen, müssen nun Zellen eliminiert werden, die körpereigene Strukturen erkennen. Dieser Prozeß wird negative Selektion genannt (Nossal, 1994). Gleichzeitig muß sichergestellt werden, daß MHC/Antigen-Komplexe vom TCR erkannt werden. Solche Thymozyten werden positiv selektioniert und können weiter expandieren sowie differenzieren (von Boehmer, 1994). Als Antigene (Ag) werden dabei körpereigene Peptide über MHC-Dimere präsentiert. Entscheidendes Kriterium für diesen Selektionsprozeß ist die Gesamtavidität des TCR gegenüber MHC/Ag-Komplexen (Sebzda *et al.*, 1999). Bei keiner oder zu schwacher Avidität werden die T-Zelle nicht positiv selektioniert, sondern eliminiert (Abb. 4, oberer Teil). Umgekehrt führt eine zu hohe Avidität gegenüber einem MHC/Ag-Komplex ebenfalls zur negativen Selektion der Zelle (Abb. 4, unterer Teil), so daß schließlich nur Zellen mit einer mittleren Avidität diesen Selektionsschritt überleben können und weiter differenzieren (Abb. 4 mittlerer Teil).



**Abb. 4: Modell der positiven/negativen Selektion.**

DN Thymozyten regulieren nach erfolgreicher  $\alpha$ -Selektion und Expansion die Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 hoch. Nach Umgruppierung der TCR  $\beta$  Allele findet durch Interaktion mit MHC/Peptid-Komplexen ein Austesten der neugebildeten, reifen TCR statt. Nur Zellen mit einem geeigneten TCR werden selektiert und differenzieren zu CD4 bzw. CD8 einzelpositiven (SP) Thymozyten. Entscheidendes Kriterium für die Selektion ist dabei die Gesamtavidität des TCR in Kombination mit den Korezeptoren gegenüber MHC/Peptid-Komplexen.

Bevor dieser Prozeß stattfinden kann, muß die Umbildung des prä-TCR in einen reifen, endgültigen TCR erfolgen. Dazu wird zunächst der TCR  $\beta$  Genlocus umgruppiert, damit ein funktioneller  $\beta$  / TCR exprimiert werden kann. Das Rearrangement der  $\beta$  Allele findet fortlaufend während der positiven/negativen Selektion statt, mit der Konsequenz, daß unterschiedliche  $\beta$  / Heterodimere mit der gleichen spezifischen  $\alpha$ -Kette gleichzeitig auf einer T-Zelle vorkommen können (Borgulya *et al.*, 1992). Daß die Interaktion zwischen TCR und MHC/Peptid-Komplex die entscheidenden Signale vermittelt, ist anhand TCR-transgener Mäuse demonstriert worden. Ein Beispiel hierfür sind Mäuse, die transgen auf allen T-Zellen einen TCR exprimieren, der spezifisch das männliche H-Y Antigen erkennt (Kisielow *et al.*, 1988). Während weibliche Mäuse dieses Antigen nicht besitzen und eine T-Zellpopulation ausbilden werden die T-Zellen in den männlichen Tieren vollständig eliminiert. Auf der anderen Seite fehlen in MHC I bzw. MHC II defizienten Mäusen entsprechend reife CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>

T-Zellen (Zijlstra *et al.*, 1990; Cosgrove *et al.*, 1991). Diese und andere Experimente zeigen, daß nur solche T-Zellen, die spezifisch eigenes MHC in Verbindung mit einem Peptid erkennen, fähig sind, auszudifferenzieren.

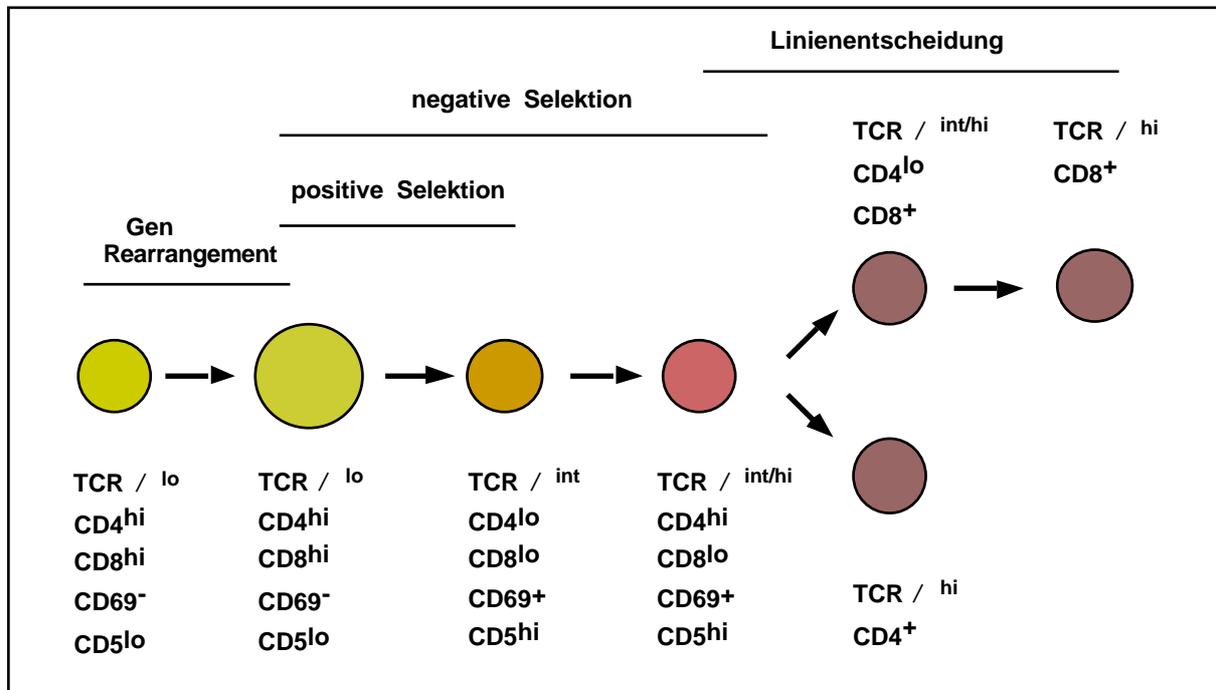


Abb. 5: Schema der DP Subpopulationen im Zusammenhang wichtiger Entwicklungsprozesse.

Sequentielle Abfolge der einzelnen DP Thymozytenpopulationen eingeteilt nach graduellen Unterschieden in der Expression der Oberflächenmarker TCR / , CD4, CD8, CD69 und CD5. Die Balken im oberen Teil der Darstellung ordnen die einzelnen Populationen bestimmten Entwicklungsschritten zu.

Die vorherrschende Population im Thymus wird von den CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP gebildet. Obwohl diese auf den ersten Blick eine recht homogene Population darstellen, können sie anhand gradueller Unterschiede in der Expression von Oberflächenmarkern wie CD4, CD8 oder dem TCR in Subklassen unterteilt werden. Die sequentielle Abfolge der einzelnen Subpopulationen ist in vielen Detailfragen noch ungeklärt und es existieren mehrere widersprüchliche Modelle. Im folgenden Text und in Abbildung 5 wurde daher versucht, möglichst viele der vorhandenen Daten in einem gemeinsamen Modell zusammenzubringen. Die frühesten und unreifsten DP Thymozyten sind große, proliferierende blastoide Zellen, welche zu kleinen, nichtproliferierenden Zellen mit schwacher TCR / Expression weiter differenzieren. Transgene Mausmodelle, die eine MHC oder TCR Defizienz aufweisen, zeigen einen Entwicklungsblock in diesem Stadium (Grusby *et al.*, 1993; Mombaerts *et al.*, 1992). Ursprünglich wurde angenommen, daß diese Zellen nicht befähigt sind weiterzudifferenzieren

(Guidos *et al.*, 1990), allerdings wiesen Transplantationsexperimente darauf hin, daß es sich um einen wesentlichen Schritt in der T-Zellentwicklung handelt und frühe Prozesse der positiven Selektion in diesen Zellen stattfinden (Lundberg und Shortman, 1994; Swat *et al.*, 1994). Die Thymozyten verharren für mehrere Tage in diesem Stadium und gruppieren die TCR Allele um. Expression eines funktionellen reifen TCR / Komplexes erlaubt die positive/negative Selektionierung der kleinen Zellen, welche daraufhin erneut zu größeren, blastoiden DP Zellen werden, die phänotypisch als  $CD4^+CD8^+CD69^-TCR^{int}$  charakterisiert werden („int“ steht für mittlere Expression; engl. „intermediate“). Ob diese erneute Zunahme der Zellgröße mit einer weiteren Expansion verbunden ist, konnte bislang nicht geklärt werden. Auf jeden Fall ist eine Stimulierung des TCR unbedingt notwendig für die weitere Entwicklung, die grundsätzlich der des prä-TCR bei der -Selektion oder bei reifen T-Zellen in der Peripherie ähnlich ist (siehe 1.4; Mariathasan *et al.*, 1999; Sebza *et al.*, 1999). Die molekularen Unterschiede zwischen dem pro Überlebenssignal einer positiv und dem Todessignal einer negativ selektionierten Zelle, vermittelt über den gleichen Rezeptor, sind nicht endgültig geklärt. Für die positive Selektion scheint insbesondere die Aktivierung der MAPK Erk-1/2 entscheidend zu sein. So führt z.B. die Expression einer dominantnegativen Mutante des im Signaltransduktionsweg aufwärts gelegenen Aktivators MKK-1 selektiv zu einer Inhibition der positiven Selektion (Alberola-Ila *et al.*, 1996). Hingegen scheint die Aktivierung der parallelen Signaltransduktionswege MKK-6/p38 und/oder JNK kritisch für die negative Selektion zu sein (Sugawara *et al.*, 1998; Rinçon *et al.*, 1998).

Während der fortlaufenden Entwicklung führen Signale des TCR zu einer transienten Verringerung der Anzahl der CD4 und CD8 Moleküle, sowie zu einer Expressionserhöhung des frühen Aktivierungsmarkers CD69, resultierend in der Population der  $CD4^{lo}CD8^{lo}CD69^+TCR^{int}$  (Lucas und Germain, 1996). Diese Zellen haben die positive Selektion bereits eindeutig durchlaufen, die Expression von Rag-1 und Rag-2 abgestellt und damit schließlich auch die Möglichkeit zur Rekombination ihrer TCR Gene verloren. Zusätzlich finden sich in diesen Zellen größere Mengen des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Punt *et al.*, 1996), während Thymozyten ohne adäquaten TCR kein Bcl-2 exprimieren und durch Apoptose sterben. Im nachfolgenden Reifungsschritt wird CD4 zuerst wieder höher exprimiert, was zu der kleinen Subpopulation von  $CD4^+CD8^{lo}CD69^+TCR^{int/hi}$  Zellen führt

(Lucas und Germain, 1996; Suzuki *et al.*, 1995). Neuere Daten legen nahe, daß diese Zellen bereits ihre Linienentscheidung getroffen haben, aber in dieser Subpopulation noch CD4 und CD8 determinierte Zellen zusammen vorkommen. Unabhängige Studien konnten zeigen, daß hieraus direkt reife CD4 SP oder CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>TCR<sup>int</sup> Zellen hervorgehen, letztere aber ausschließlich MHC I restringiert sind (Lundberg *et al.*, 1995; Barthlott *et al.*, 1997; Sant'Angelo *et al.*, 1998) und in reife CD8<sup>+</sup> SP T-Zellen differenzieren. Diese Reifungsschritte sind schematisch in Abbildung 5 zusammengefaßt. Eine tiefere Einsicht in den Prozeß der positiven Selektion kommt von phänotypischen Studien der CD5 Expression (Punt *et al.*, 1996; Bhandoola *et al.*, 1999). Danach findet in DP Thymozyten mit geringer CD5 Expression Rekombination der TCR  $\alpha$  Gene statt. Kommt es zur Ausbildung eines funktionellen  $\alpha$  / TCR der entsprechende Signale weiterleitet, so entstehen CD5<sup>hi</sup> DP Zellen, welche sofort die Rag-1/2 Expression abschalten. Anschließende Signale des TCR induzieren die Linienentscheidung und damit das Überleben bzw. die Eliminierung der Zelle. Die resultierenden CD5<sup>hi</sup> Zellen sind bereits auf eine Linie festgelegt und brauchen nur ein zweites pro Überlebenssignal, um schließlich zu reifen, langlebigen SP T-Zellen zu werden. In diesem Zusammenhang ist CD5 nicht einfach nur als Marker interessant, sondern bietet auch einen molekularen Erklärungsansatz, da es ein negativer Regulator von TCR vermittelten Signalen ist (Tarakhovsky *et al.*, 1995).

Ein sehr viel komplexeres Bild der positiven/negativen Selektion ergibt sich aus einer detaillierten zytometrischen Analyse, die die Expression von c-Kit und dem IL-7R auf den DP mit einbezieht (Akashi *et al.*, 1997; Akashi *et al.* 1998). Die publizierten Daten weisen darauf hin, daß aus den DN Thymozyten zunächst die Population CD4<sup>lo</sup>/CD8<sup>lo</sup>TCR<sup>lo</sup> entsteht, aus dieser sich CD4<sup>int</sup>CD8<sup>int</sup>TCR<sup>lo</sup> Thymozyten bilden und schließlich über einen c-Kit abhängigen Weg direkt SP Thymozyten gebildet werden. CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>lo</sup>TCR<sup>lo</sup>c-Kit<sup>+</sup> Zellen, die nicht positiv selektioniert wurden, erhöhen ihre CD4 und CD8 Expression und schalten die c-Kit und IL-7R Expression ab. Die resultierende Population der DP<sup>hi</sup>TCR<sup>lo</sup>c-Kit<sup>-</sup> Zellen bekommen die zweite Chance einer alternativen TCR  $\beta$  Ketten Umgruppierung. Sollte diese erfolgreich sein, differenzieren diese Zellen überwiegend in die CD4 SP Linie während der Großteil der DP<sup>hi</sup> Thymozyten Apoptose untergeht. Diese Ergebnisse würden nicht nur das Vorhandensein von zwei unabhängigen Wegen der positiven Selektion implizieren: einen c-Kit abhängigen und

einen unabhängigen. Vielmehr wäre die zahlenmäßig große Population der kleinen DP Thymozyten keine wichtige Zwischenstufe mehr, sondern lediglich eine Sackgasse der Entwicklung, deren Zellen durch fehlende Überlebenssignale in den programmierten Zelltod getrieben würden.

### 1.3.5 CD4 versus CD8 Liniendeterminierung

Wie bereits gesehen, ist der Vorgang der positiven/negativen Selektion untrennbar mit der Linientscheidung verbunden, die sicherstellt, daß exklusiv CD4 auf MHC Klasse II und CD8 auf MHC Klasse I restringierten T-Zellen exprimiert wird. Traditionell wird diese Determinierung durch zwei Modelle versucht zu erklären: dem stochastisch, selektiven (Guidos, 1996) und dem instruktiven (Robey *et al.*, 1991) Modell. Ersteres sagt aus, daß das Abschalten einer der beiden Korezeptoren zufällig geschieht und anschließend geeignete TCR/Korezeptor-Kombinationen selektioniert werden und überleben (Farrar *et al.*, 1998; Guidos, 1996). Beim instruktiven Modell hingegen generiert ein TCR und Korezeptor ein anderes Signal, wenn sie mit einem richtigen MHC/Peptid-Komplex interagieren. Dieses Signal schaltet den nicht passenden Korezeptor transkriptionell ab und treibt die Zelle in die entsprechende Richtung. Das impliziert gleichzeitig, daß von CD4 bzw. CD8 unterschiedliche Signale ausgehen. Beide Korezeptoren verstärken TCR vermittelte Signale zumindest durch die Rekrutierung der Tyrosinkinase p56<sup>Lck</sup> (Weiss und Littman, 1994). Desweiteren partizipieren sie an der Gesamtavidität des TCR zum MHC/Peptid-Komplex (Marusic-Galesic *et al.*, 1988; Zuniga-Pflücker *et al.*, 1989; Robey *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992) und nehmen somit direkt Einfluß auf die Liniendeterminierung. In zahlreichen transgenen Mausmodellen konnte dieser Zusammenhang demonstriert werden (Robey *et al.*, 1991; Fung-Leung *et al.*, 1991; Rahemtulla *et al.*, 1991). Tatsächlich wird mittlerweile das instruktive Modell stark favorisiert. Zum einen rekrutiert CD4 sehr viel effizienter p56<sup>Lck</sup> als dies bei CD8 der Fall ist (Weiss *et al.*, 1993), zum anderen scheint die Stärke und Dauer des Lck Signals maßgeblich die Linienfestlegung zu beeinflussen (Hernández-Hoyos *et al.*, 2000; Legname *et al.*, 2000). Allein ein konstitutives Lck Signal ist ausreichend um eine T-Zelle, unabhängig von ihrem TCR, in die CD4 Richtung zu leiten, während umgekehrt eine Inhibition der Lck Aktivität verstärkt zur Bildung von CD8 SP Zellen führt. Eine Möglichkeit dies *in vivo* zu verwirklichen ergibt sich über die

Spleißvariante CD8<sup>β</sup>, die nicht mit Lck interagieren kann und somit die Lck Aktivität nach MHC/Peptid Erkennung durch den TCR reduziert (Salmon *et al.*, 1999).

Neben den vom TCR und seinem Korezeptor ausgehenden Signalen beeinflussen erneut Mitglieder der Notch Familie diese Linienentscheidung (Robey, 1999). So führt konstitutive Expression einer aktivierten Form von Notch in Thymozyten dazu, daß Zellen, die eigentlich in die CD4 Linie differenzieren müßten, stattdessen in die CD8 Richtung gedrängt werden (Robey *et al.*, 1996). Diese Unterstützung zugunsten der CD8 Linie findet selbst bei Abwesenheit von MHC I Molekülen statt, was bedeutet, daß Notch wahrscheinlich unterhalb des TCR in die Signalkaskade eingreift. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, ob dies mit einer veränderten Lck Aktivität verbunden ist.

Mit der Bildung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> SP T-Zellen sind die Entwicklungs- und Selektionsprozesse im Thymus abgeschlossen. Die reifen T-Zellen gelangen über die Blut- und Lymphbahnen zu den sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten und Milz. Ihre endgültige Ausdifferenzierung ist allerdings noch nicht erreicht. So können T-Zellen nach erfolgtem Antigenkontakt in verschiedene Effektorsubpopulationen weiter differenzieren, z.B. in Th1 und Th2 Zellen (Abbas *et al.*, 1996), die nur anhand unterschiedlicher Zytokinexpression unterscheidbar sind. Außerdem können Gedächtniszellen gebildet werden, die für die Immunität verantwortlich (Farber, 1998) sind oder autoreaktive T-Zellen über einen Mechanismus, den man als Anergie bezeichnet, immer noch inaktiviert werden (Kay, 1999).

## **1.4 Signaltransduktion bei T-Lymphozyten**

### 1.4.1 TCR-vermittelte Signalwege

Das Auslösen der Effektorfunktionen und die klonale Expansion einer reifen, ruhenden T-Zelle wird durch Bindung eines MHC präsentierten Antigens an den TCR-Komplex initiiert. Dieses Signal ist essentiell aber nicht ausreichend, um eine T-Zelle zu stimulieren. Vielmehr sind Signale zusätzlicher Kofaktoren notwendig, die aber nicht nur fördernde sondern auch

inhibierende Funktionen haben können. Erst die Integration aller Signale entscheidet letztlich über das Schicksal der Zelle. Daher soll zunächst der TCR-Komplex an sich und die über ihn ausgelösten Signaltransduktionswege beschrieben werden, die z.T. auch schon bei den TCR-abhängigen Reifungsprozessen im Thymus eine Rolle gespielt haben.

Der TCR liegt als Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette vor. Bei dem unreifen prä-TCR ist statt der  $\beta$ -Kette ein pT Molekül eingebaut. Für die Weiterleitung des Signals der Antigenerkennung sind mit dem TCR assoziierte multimere Proteinkomplexe verantwortlich (Weiss und Littman, 1994), welche aus dem CD3-Komplex (CD3,  $\zeta$  und  $\eta$ ) sowie  $\epsilon$ -Ketten bestehen. Diese Proteine verfügen in ihrer zytoplasmatischen Domäne über ein gemeinsames, homologes Motiv, das Immunorezeptor-Tyrosin-Aktivator Motiv ITAM (engl. „immunoreceptor tyrosine-based activator motif“). Über diese Motive werden verschiedene Tyrosinkinasen rekrutiert, die die erste Ebene der Signalkaskade bilden. Nach Antigenstimulation werden Tyrosinreste innerhalb der ITAM-Sequenzen über Mitglieder der Src-Familie von Tyrosinkinasen phosphoryliert, insbesondere von p56<sup>Lck</sup> und p59<sup>Fyn</sup>. Diese sind über einen myristylierten Glyzinrest in der Zellmembran verankert und zumindest p56<sup>Lck</sup> interagiert mit dem zytoplasmatischen Anteil der Korezeptoren CD4 und CD8 (Olszowy *et al.*, 1995). Die Tyrosinphosphorylierung der ITAMs ermöglicht die Rekrutierung weiterer zytoplasmatischer Tyrosinkinasen wie ZAP-70 und Syk (Qian und Weiss, 1997). Diese werden wiederum entweder durch Autophosphorylierung oder durch Mitglieder der Src-Familie aktiviert. Unter Zuhilfenahme sog. Adapterproteine wie LAT oder SLP-76, deren Aufgabe es ist, Enzyme und Substrate räumlich zusammenzubringen, werden eine Vielzahl von Signalwegen initiiert. Zu den wichtigsten gehört der Ras/Raf-1/MAPK Weg, der letztlich an der Aktivierung von AP-1 Transkriptionsfaktoren beteiligt ist (Cheng und Chan, 1997). Dieses Signal ist nicht nur wie im Abschnitt 1.3 beschrieben für die Entwicklung von Thymozyten entscheidend, sondern liefert auch eines der wichtigsten Proliferationssignale in der Peripherie. Parallel zum Ras/Raf-1/MAPK Weg findet über das Vav Protein eine Aktivierung des Rac/Rho Weges statt. Dieser spielt bei der Reorganisation des Zytoskelettes nach Antigenkontakt eine große Rolle und führt über den Jun-Kinaseweg und c-Jun auch zum Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 (Katzav *et al.*, 1994; Crespo *et al.*, 1996). Eine weitere Komponente der TCR-vermittelten Signale liefert die Aktivierung der PhospholipaseC- 1

(PLC- 1) (Jackman *et al.*, 1995). Infolge der Freisetzung von Botenstoffen (engl. „second messenger“) kommt es über Kalzium-abhängige Signale zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren aus der NF-AT Familie (engl. „nuclear factor of activated T cells“) (Rudd, 1996) bzw. über die ProteinkinaseC (PKC) zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- B (Gilmore *et al.*, 1996). Die PKC kann zudem noch verstärkend auf den Ras/Raf-1/MAPK Weg einwirken, indem sie direkt Raf-1 aktiviert. Somit führt die Stimulierung einer T-Zelle innerhalb weniger Minuten zur Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und damit zu einem veränderten Expressionsmuster. Das phänotypische Resultat dieser veränderten Genexpression wird aber noch erheblich von Signalen der Kofaktoren modifiziert. Diese greifen z.T. direkt in die TCR-Signalwege ein. Beispiele hierfür sind die Phosphatase CD45, die zusätzlich p56<sup>Lck</sup> aktiviert oder CTLA-4, das über die Phosphatase SHP-2 den Ras/Raf-1/MAPK Weg inhibiert. Es können aber auch wie im Falle des Kofaktors CD28 oder der Zytokinrezeptoren zusätzliche Signaltransduktionswege mit einbezogen werden. Diese beinhalten häufig die PI3K und die JAK/STAT-Wege.

#### 1.4.2 Zytokinrezeptor-vermittelte Signalwege

Lösliche Faktoren, wie Zytokine, modifizieren maßgeblich die Entwicklung und Aktivierung aller immunkompetenten Zellen, einschließlich der T-Lymphozyten. Sie werden von einer Vielzahl lymphatischer und nichtlymphoider Zellen gebildet und wirken nach Sekretion meist nur para- oder autokrin innerhalb einer engen räumlichen Begrenzung. An dieser Stelle soll exemplarisch eine Zytokinfamilie vorgestellt werden. Häufig wiederkehrendes Prinzip der Zytokinrezeptoren ist die Verwendung gemeinsamer Rezeptorbestandteile innerhalb einer Zytokinfamilie. So teilen sich die bereits erwähnten Zytokine Interleukin-2, -4, -7, -9 und -15 die konstante  $\gamma$ -Kette (Nakajima *et al.*, 2000). Die Spezifität gegenüber einem bestimmten Zytokin resultiert aus der Einbeziehung mindestens einer zusätzlichen zytokinspezifischen Kette, die die Affinität für das jeweilige Zytokin erhöht. Die Signaltransduktionswege hingegen werden überwiegend von dem konstanten Rezeptoranteil initiiert, was die Redundanz vieler Zytokine erklärt. Der IL-2 Rezeptor zum Beispiel ist ein trimere Komplex, der neben der  $\gamma$ -Kette (CD132) noch die IL-2R  $\alpha$ - (CD25) und  $\beta$ -Kette (CD122) beinhaltet. Während  $\gamma$  konstitutiv auf allen und IL-2R  $\alpha$  in geringer Menge auf fast allen T-Zellen exprimiert wird,

erfolgt die Expression von IL-2R nur in einzelnen Populationen während der Entwicklung (DN2 und 3) sowie in peripheren T-Zellen ausschließlich nach deren Aktivierung durch Antigenkontakt (Nelson und Willerford, 1998). Das Einbeziehen der  $\beta$ -Kette erhöht die Affinität gegenüber IL-2 um den Faktor 1000, führt somit zu einem erheblich stärkerem Signal (Tekeshita *et al.*, 1992) und ist für die Spezifität verantwortlich. Gleichzeitig besitzt die  $\beta$ -Kette nur einen kleinen zytoplasmatischen Anteil und kann daher nicht an der Signaltransduktion teilnehmen. Die  $\beta$ -Kette wird zusätzlich von IL-15 benutzt (Bamford *et al.*, 1994). Die Signale des IL-2R sind partiell denen des TCR ähnlich. Da der TCR nach Antigenkontakt internalisiert wird und somit keine weiteren Signale mehr bereitstellen kann, ist anzunehmen, daß besonders Proliferations- und Überlebenssignale von dem induzierten IL-2 Rezeptor substituiert werden. Dementsprechend findet über die  $\beta$ -Kette analog zum TCR eine Rekrutierung und Aktivierung der Src-Tyrosinkinasen p56<sup>Lck</sup>, p59<sup>Fyn</sup> und p53/56<sup>Lyn</sup>, Weiterleitung zu ZAP-70 und Syk Kinase und Aktivierung des Ras/Raf-1/MAPK Weges statt. Weitere Signalwege, die angeschaltet werden, beinhalten die PI3K, die Tyrosinphosphatase Shp-2 und die Insulinrezeptorsubstrate IRS-1 und 2. Herausragende Bedeutung kommt dem JAK/STAT Weg zu. Jak1 liegt konstitutiv gebunden an der  $\beta$ -Kette und Jak3 an der  $\gamma$ -Kette vor. Nach IL-2 Stimulation werden die Kinasen durch Kreuzphosphorylierung aktiviert (Darnell, 1997). Anschließend kommt es zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STATs (engl. „signal transducers and activators of transcription“), die daraufhin Homodimere bilden, in den Kern translozieren und dort Zielgene transaktivieren können. Dabei scheint ausschließlich JAK3 die Aktivierung von STAT5a/b und STAT3 zu vermitteln und sowohl proliferative wie auch antiapoptotische Signale zu liefern. Da Jak3 an die  $\gamma$ -Kette bindet, würde dies auch die enorme Bedeutung dieser Kette erklären. Die verantwortlichen Zielgene der STAT-Faktoren sind nicht befriedigend ermittelt. Ein bekanntes STAT5 Zielgen ist die Serin/Threonin-Kinase Pim-1, über die zumindest teilweise die proliferationsfördernde Wirkung von IL-2 laufen könnte. Desweiteren ist STAT5 in vielen Zellen verantwortlich für die Inhibition der Apoptose durch Regulation von Bcl-x<sub>L</sub>. STAT3 hingegen könnte an einem positiven Rückkopplungsmechanismus beteiligt sein, da es die Expression der IL-2R  $\beta$ -Kette verstärkt (Akaishi *et al.*, 1998).

## 1.5 Das Zinkfingerprotein Gfi-1

Das Zinkfingerprotein Gfi-1 wurde unabhängig voneinander in zwei verschiedenen Ansätzen Anfang der 90er Jahre entdeckt. In beiden Fällen fand die Methode der Insertionsmutagenese mit dem Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV) ihre Anwendung. In einem Fall wurden IL-2 abhängige Leukämiezellen der Ratte mit dem Virus infiziert und anschließend auf IL-2 unabhängige Zellen selektioniert (Gilks *et al.*, 1993). Aus einem der resultierenden Klone wurde der Integrationsort isoliert und als *gfi-1* bezeichnet (engl. „growth factor independence-1“). Die nähere Charakterisierung des Locus führte zur Identifikation der entsprechenden cDNA. Es stellte sich heraus, daß das entsprechende Gen durch die Integration des Virus überexprimiert wurde. In der Arbeitsgruppe von Prof. T. Möröy wurde *gfi-1* in einem sehr ähnlichen Ansatz gefunden (Zörnig *et al.*, 1996). Hier wurden Pim-1/L-Myc doppeltransgene Mäuse mit MoMLV infiziert. Da die Virusinfektion die Latenzzeit der Tumorentstehung bei den Mäusen verkürzte, war davon auszugehen, daß durch die Insertion zusätzliche, kooperative Ereignisse ausgelöst wurden. Die Analyse der klonalen Tumore und der Integrationsstellen führte erneut zur Isolierung von *gfi-1*. Eine anschließende Untersuchung aller Tumore ergab, daß in über 60% der Fälle der *gfi-1* Locus betroffen war und dadurch Gfi-1 überexprimiert wurde. Somit mußte *gfi-1* als potentiell Onkogen angesehen werden. Die Generierung lck-gfi-1 transgener Tiere bestätigte diese Vermutung und zeigte, daß *gfi-1* in der T-Zell Lymphomagenese ein dominantes Onkogen mit eher schwachem Potential ist, allerdings sehr stark mit den Onkoproteinen der Myc Familie oder Pim-1 in der Tumorgenese kooperiert (Schmidt *et al.*, 1998a).

Sequenzanalysen der *gfi-1* cDNA zeigte, daß sie für ein Zinkfingerprotein vom Typ C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> kodiert. Strukturell lassen sich drei Domänen 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 von Gfi-1 (Zörnig *et al.*, 1996; Grimes *et al.*, 1996a). Biochemische Analysen bestätigten die sequenzspezifische Bindung an DNA über die Zinkfinger und die Wirkung als positionsunabhängiger transkriptioneller Repressor (Zweidler-McKay *et al.*, 1996; Grimes *et al.*, 1996a). Eines der diskutierten Zielgene von Gfi-1 ist das

proapoptotische Gen *bax* (Grimes *et al.*, 1996b). Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe (Schmidt *et al.*, 1999) sowie die vorliegende Arbeit konnten dies jedoch nicht bestätigen.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Zur Analyse der physiologischen Funktion des Zinkfingerproteins Gfi-1 wurde in der vorliegenden Arbeit das Mausmodell gewählt. Dieses erlaubt über genetische Manipulationen Funktionsanalysen *in vivo* machen zu können. Dazu können prinzipiell zwei Strategien verfolgt werden, die beide das Einbringen transgener Fremd-DNA in die Keimbahn der Mäuse beinhalten. Die erstere hat zum Ziel die Proteinfunktion auszuschalten (engl. „knock-out“), um nach anschließender phänotypischer Analyse der Mäuse Rückschlüsse auf die physiologische Funktion ziehen zu können. Wie bereits an vielen Stellen der Einleitung beschrieben, ist die Untersuchung solcher gendefizienter Tiere von enormen Nutzen, um Zeitpunkt und Ort der Expression sowie die Funktion eines Proteins zu bestimmen. Im zweiten Ansatz wird versucht, durch Einbringen eines Transgens und Überexpression des entsprechenden Proteins, ein Mehr an Funktion zu erzielen. In Verbindung mit einem gewebespezifischen Promotor wird das eingebrachte Gen nur in bestimmten Zellen verstärkt exprimiert.

Erstere Strategie sollte im Rahmen dieser Arbeit verwirklicht werden. Vorangiges Ziel war daher die Generierung *gfi-1* gendefizienter Mäuse. Vorarbeiten hatten gezeigt, daß Gfi-1 im Thymus und in aktivierten, nicht aber in ruhenden, naiven T-Zellen exprimiert wird (Karsunky, 1996). Desweiteren ließen frühere transgene Mäuse, die *gfi-1* unter Kontrolle des Ick Promotors exprimierten, eine Funktion von Gfi-1 während der -Selektion der T-Zellentwicklung vermuten (Schmidt *et al.*, 1998b). Die Analyse der Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere sollte sich daher vor allem auf die Funktion von Gfi-1 während der T-Zellentwicklung im Thymus konzentrieren. Ein zweiter Themenkomplex sollte der Frage nachgehen, welche Rolle Gfi-1 bei der Aktivierung von T-Zellen in der Peripherie spielt.

## 2 Ergebnisse

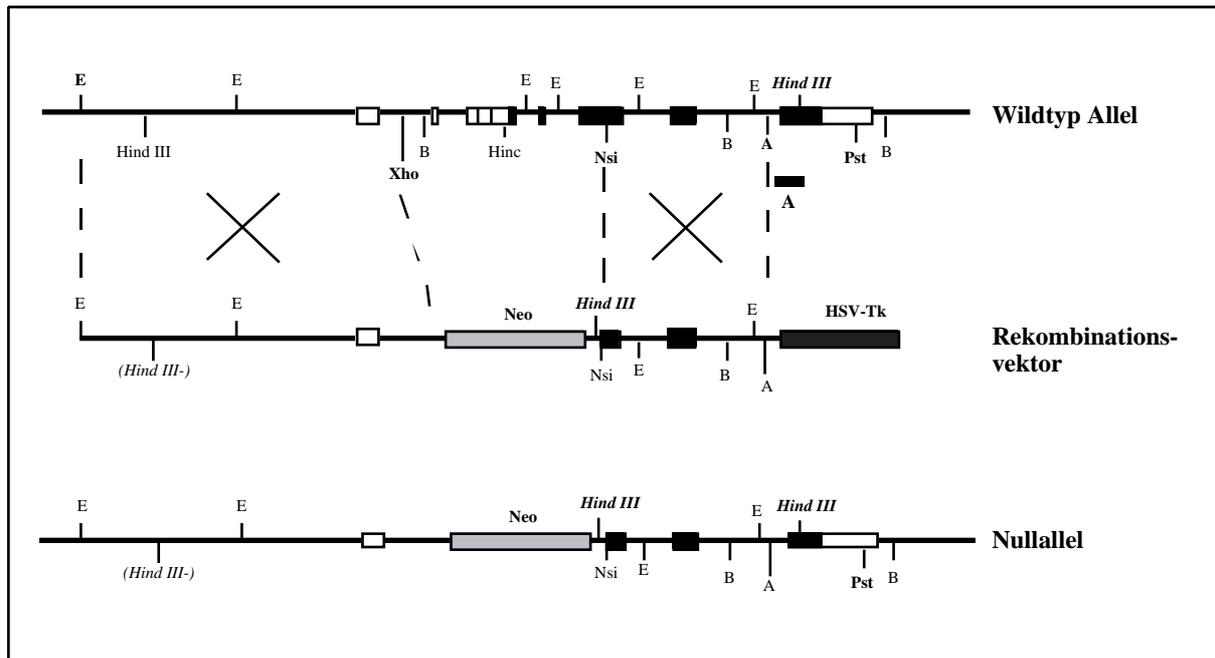
### 2.1 Herstellung Gfi-1-defizienter (Knock-out) Mäuse

Eines der aussagekräftigsten Modelle, um die Funktion eines Genproduktes *in vivo* untersuchen zu können, stellen Null-Mutanten dar, die ein entsprechendes Gen nicht mehr exprimieren können. Solche Mutanten, allgemein „Knock-outs“ genannt, können gezielt durch homologe Rekombination hergestellt werden (Übersicht siehe Joyner, 1993). Dazu werden kontinuierlich wachsende, pluripotente, embryonale Stammzellen (ES-Zellen) *in vitro* mit einem Rekombinations- oder Austauschvektor (engl. „targeting vector“) transfiziert. Dieser Vektor beinhaltet Gensegmente, die homolog zu Bereichen des auszuschaltenden Gens sind. Da die homologe Rekombination, im Gegensatz z.B. zu Hefen, in Säugerzellen ein seltenes Ereignis ist, müssen über geeignete Selektionsverfahren positive Klone angereichert und isoliert werden. Solche Klone werden dann in Spenderblastozysten injiziert und in den Uterus scheinchwangerer Ammentiere transplantiert. Nehmen die ES-Zellen an der Entwicklung des Embryos teil, so entstehen chimäre Mäuse, die anhand ihrer Fellfarbe identifiziert werden können. Ziel ist es, Chimäre zu erzeugen, bei denen eine Keimbahntransmission des mutierten Allels vorliegt. Durch Kreuzung solcher Tiere mit Wildtyp-Mäusen (wt) erhält man für die eingefügte Mutation heterozygote Nachkommen, die schließlich, untereinander verpaart, homozygote Tiere hervorbringen. Damit kann im gesamten Organismus kein funktionelles Genprodukt mehr produziert werden. Da der einzige Unterschied zwischen Knock-out und Wildtyp-Tieren in dem Verlust eines Gens liegt, können phänotypische Veränderungen, die im Vergleich zum Wildtyp auftreten, allein auf den Verlust dieses Gens zurückgeführt werden und erlauben letztlich Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des von diesem Gen kodierten Proteins.

### 2.1.1 Strategie und Rekombinationsvektor

Die Herstellung eines Rekombinationsvektors zum Ausschalten der *gfi-1* Genfunktion, verlangt eine genaue Kenntnis des genomischen Locus. Isolierung entsprechender genomischer Bereiche des murinen *gfi-1* Gens und dessen Kartierung fanden durch Dr. Thorsten Schmidt statt. Anhand des Sequenzvergleichs mit der cDNA konnte zudem die Intron/Exon-Struktur aufgeklärt werden. Da die kodierenden Bereiche sich auf über 7 kb genomischer Sequenz verteilen und eine vollständige Deletion somit die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination reduziert hätte, wurde eine Strategie verfolgt, die das Ausschalten lediglich des Promoterbereichs, einschließlich der kompletten ersten zwei kodierenden Exons sowie die Hälfte des dritten kodierenden Exons zur Folge hat (Schema des *gfi-1* Locus siehe Abb. 6). Da zudem in der verbleibenden Sequenz kein ATG Codon mehr als potentielle Translationsstartstelle vorhanden ist, sollte sich auch kein verkürztes Protein mehr bilden können. Es wurden zwei unterschiedliche Vektoren hergestellt, die sich lediglich in der Länge der homologen Sequenz unterschieden. Als homologe Bereiche der 5'-flankierenden Region wurde ein 5,6 kb langes HincII/EcoRI Fragment für den Vektor „KO IV“ verwendet bzw. ein 7,8 kb EcoRI/EcoRI Fragment für den Vektor „KO A“. Beide trugen das gleiche 3,6 kb NsiI/Asp718 Fragment aus der 3'-Region des *gfi-1* Gens. Als Basis für den Rekombinationsvektor mit *gfi-1* Nullallel diente der pPNT Vektor (Tybulewicz *et al.*, 1991). Dieser beinhaltet zwei Selektionsmarker, die beide unter der Kontrolle des ubiquitären und konstitutiven Promotors der Phosphoglyzeratkinase 1 (pGK) stehen. Zur positiven Selektion transfizierter ES-Zellen diente das *Neomycin*-Resistenzgen (*Neo*), welches die zu deletierende endogene Sequenz ersetzen sollte. Nur die Zellen, die das *Neo* Gen in ihr Genom integriert hatten, konnten in Anwesenheit von Geneticin (G418) im Medium überleben. Um nicht homolog rekombinierte Klone auszuschließen, wurde zudem noch eine negative Selektion über das Vorhandensein des *Thymidinkinase* (*TK*) Gens des Herpes Simplex Virus durchgeführt. Eine TK-Expressionskassette befand sich an einem Ende der Rekombinationsvektoren und sollte, da sie keine homologen Sequenzen trägt, bei einer homologen Rekombination nicht mit ins Genom integrieren. Zellen mit TK hingegen würden in Ganciclovir-haltigen Medium sterben, da die Thymidinkinase Ganciclovir phosphoryliert und nur die phosphorylierte Form als Basenanalogen während der S-Phase eingebaut würde, was zur Termination der DNA-

Replikation führt. Desweiteren wurde durch die Insertion des *neo* Gens eine zusätzliche HindIII Restriktionsschnittstelle geschaffen, die später bei der Analyse homolog rekombinanter Klone durch Southern-Blot verwendet werden sollte. Da für die Rekombination eine linearisierte Form des Vektors notwendig ist, wurde darauf geachtet, daß eine singuläre NotI Schnittstelle außerhalb der homologen Bereiche hierfür zur Verfügung stand.



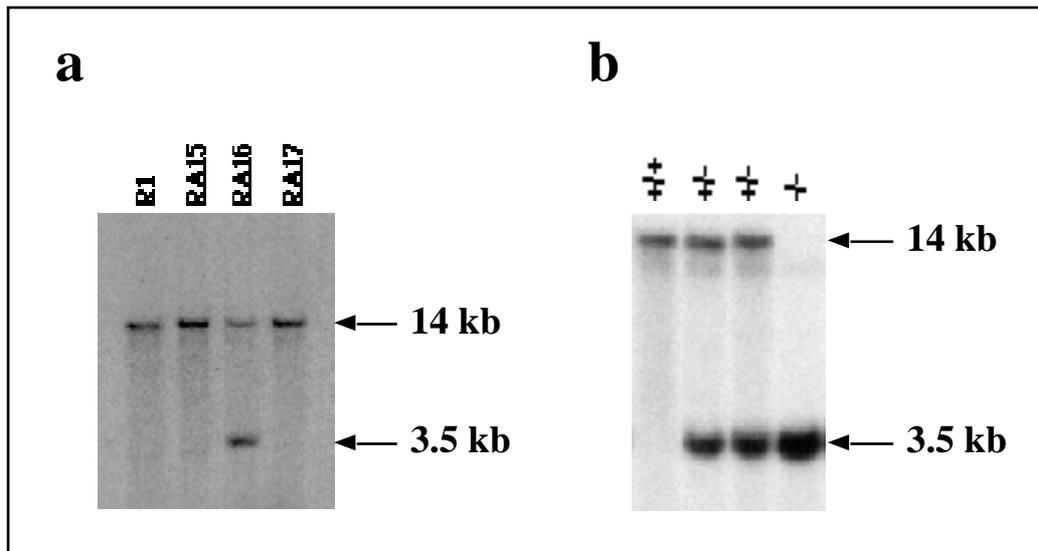
**Abb. 6: Strategie zur Inaktivierung des *gfi-1* Gens durch homologe Rekombination**

Im oberen Teil findet sich die schematische Darstellung des *gfi-1* Wildtyp Genlocus der Maus. Kästchen symbolisieren Exonbereiche, die schwarz ausgefüllten Segmente zeigen die kodierenden Sequenzen an. Die Kreuze kennzeichnen die beiden Rekombinationsereignisse zwischen den homologen Bereichen des Wildtyp Allels und des Rekombinationsvektors (mittlerer Teil). Das resultierende Nullallel ist im unteren Teil abgebildet. Desweiteren sind für die Klonierung oder Detektion homologer Rekombinationsereignisse wichtige Restriktionsschnittstellen mit eingezeichnet (E: EcoRI; B: BamHI; A: Asp718). Die kursiv und in Klammern gesetzte HindIII Schnittstelle wurde durch die Klonierung des Austauschvektors zerstört. Das im oberen Teil mit A bezeichnete Asp718/HindIII Fragment markiert den als Sonde ausgewählten Sequenzbereich.

### 2.1.2 Erzeugung von ES-Zellklonen mit einem Gfi-1 Nullallel

Den oben beschriebenen Rekombinationsvektoren entsprechend wurden R1 ES-Zellen, abgeleitet vom Mausstamm 129/Ola, für die Transfektion 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 (5.6.2). Für den Zeitraum der Selektion wurden G418-resistente MEF aus MTK-*Neo* transgenen Mäusen benutzt. Alle Fibroblasten wurden aus Tag 14 Embryonen gewonnen

und vor Kokultivierung mit ES-Zellen für 3 h mit MitomycinC behandelt, um ein Überwachsen der Kulturen mit Fibroblasten zu verhindern (5.6.4). Die Transfektion der ES-Zellen mit dem NotI-linearisierten Austauschvektor und die Selektionsbedingungen sind unter 5.6.3 beschrieben. Im Rahmen mehrerer Transfektionen mit den Konstrukten „KO IV“ und „KO A“ wurden 246 bzw. 114 R1-Klone isoliert und im Southern-Blot auf homologe Rekombination überprüft (5.3.8). Dazu wurde die genomische DNA aus den Zellen extrahiert (5.3.2) und ein Aliquot (ca. 4-6 µg) mit HindIII verdaut. Sollte das Konstrukt homolog rekombiniert haben, so würde durch die Insertion der *Neo*-Kassette eine zusätzliche HindIII Restriktionsschnittstelle geschaffen (siehe Abb. 6) und es würden aus dem endogenen 14 kb Fragment des wt-Allels zwei ca. 3,5 und 10 kb große Fragmente entstehen. Zur Analyse wurde die verdaute DNA nach Gelelektrophorese auf Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Asp718/HindIII Sonde hybridisiert (Fragment A; Abb. 6). Diese Sonde liegt außerhalb des Konstruktes und hybridisiert mit dem endogenen 14 kb Fragment. Im Falle einer homologen Rekombination würde das 3,5 kb Subfragment detektiert werden können. Letztlich konnten für beide Konstrukte, KO IV und A, jeweils ein Klon, D4 bzw. RA16 genannt, isoliert werden, die beide das zusätzliche 3,5 kb Signal aufwiesen. In Abbildung 7a ist exemplarisch der Southern-Blot des Klons RA16 gezeigt, der mit dem Konstrukt KO A erzielt wurde. Als Kontrolle dient DNA untransfizierter R1 ES-Zellen und solcher Klone, die nur das endogene 14 kb Signal zeigten. Bei Klon RA16, der heterozygot für das mutierte *gfi-1* Gen ist (*gfi-1*<sup>+/-</sup>) ist, weist das Signal des wt-Allels nur eine halb so starke Intensität auf und es erscheint zusätzlich die erwartete 3,5 kb Bande. Da die eingesetzte Sonde außerhalb der für den Rekombinationsvektor verwendeten Sequenzen liegt, wurde nicht einfach die Integration detektiert sondern spezifisch das Ereignis der homologen Rekombination in den *gfi-1* Locus. Zusätzlich wurden die beiden erhaltenen Klone auf karyotypische Veränderung hin überprüft, die spontan in Zellkultur auftreten können. Dazu wurden Metaphaseplatten angefertigt (siehe 5.7.1) und die Chromosomen unter dem Mikroskop ausgezählt. Beide ES-Zellklone zeigten einen Chromosomensatz von 2n = 40, was dem normalen Karyotyp von 129/Ola Mausezellen entspricht (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 7: Nachweis der homologen Rekombination im Southern-Blot Verfahren**

**a:** Autoradiogramm zum Nachweis des korrekten, homologen Rekombinationsereignisses anhand HindIII verdauter genomischer DNA aus R1 ES-Zellen. Analysiert wurde DNA der parentalen Zelllinie sowie von drei nach Selektion isolierten Klonen. Die verdaut DNA wurde mit der Sonde A (vergl. Abb. 6) hybridisiert. Alle Proben zeigen das erwartete Signal des wt Allels auf der Höhe von 14 kb und der Klon RA16 zusätzlich das Signal von 3,5 kb nach erfolgter homologer Rekombination mit dem Austauschvektor. **b:** Autoradiogramm nach Southern-Blot zur Bestimmung des *gfi-1* Genotyps der F1-Generation verpaarter *Gfi-1*<sup>+/-</sup> Mäuse. Genomische DNA der Tiere wurde aus Schwanzbiopsien isoliert, 8 µg HindIII verdaut und durch Southern-Blot mit einer *gfi-1*-spezifischen, externen Sonde (Sonde A) analysiert. Wildtyp Tiere (+/+) zeigen nur das 14 kb Signal, heterozygote Nachkommen (+/-) zusätzlich eine Bande von 3,5 kb, die bei den *Gfi-1*-defizienten Tieren (-/-) ausschließlich detektiert wird.

### 2.1.3 Herstellung von homozygoten *Gfi-1* Nullallel Mäusen

Zellen der beiden ES-Zellklone D4 und RA16 wurden von Fibroblasten befreit, in M2 Medium aufgenommen und von Dr. Branko Zevnik in Blastozysten aus C57Bl/6 Mäusen injiziert (Hogan *et al.*, 1994). Nach der Injektion wurden die Blastozysten für kurze Zeit in M16 Medium expandiert, um anschließend in den Uterus scheinchwangerer Ammenmütter transplantiert zu werden. Nach Austragen der Tiere wurden die chimären Männchen mit C57Bl/6 Weibchen gekreuzt. Sollten die ES-Zellen am Aufbau der Keimbahn des chimären Tieres teilgenommen haben, so entstehen Nachkommen mit agouti-farbigem (Braunton) Fell, da das Gen der ES-Zellen, welches für die Fellfarbe Agouti kodiert dominant gegenüber dem Gen für das Schwarz der C57Bl/6 Tiere ist. Daher wurden nur agouti Nachkommen im Southern-Verfahren auf das mutierte Allel hin überprüft. Für den Klon RA16 wurden mehrere

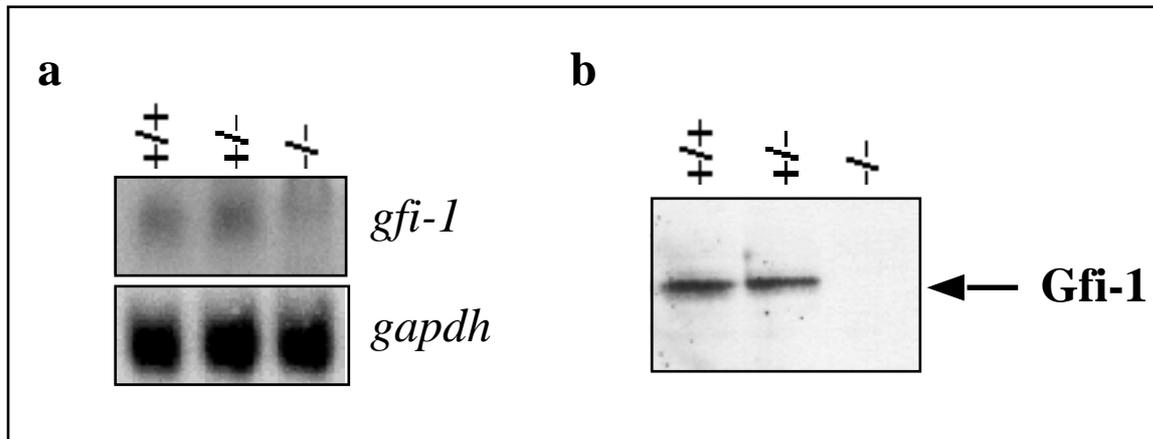
Nachkommen erzielt, die für das Gfi-1 Nullallel heterozygot waren. Der Klon D4 war dahingegen offensichtlich nicht keimbahngängig, da aus einer Vielzahl von Verpaarungen von Chimären, auch über einen längeren Zeitraum, keine agouti-farbigen Nachkommen erzielt wurden. Um Gfi-1-defiziente Mäuse zu erhalten wurden die Gfi-1 Nullallel heterozygoten Tiere des Klons RA16 miteinander verpaart. Abbildung 7.b zeigt das Autoradiogramm eines Southern-Blots von Schwanzspitzen-DNA solcher Nachkommen.

#### 2.1.4 Nachweis der Gfi-1-Defizienz

Da dem Gfi-1 Protein bisher weder eine enzymatische Aktivität, noch ein konkretes Zielgen als Transkriptionsfaktor zugeordnet werden kann, beschränkt sich der Nachweis der Gfi-1-Defizienz allein auf den Verlust der Expression. Zum Nachweis der Abwesenheit von *gfi-1* spezifischen Transkripten wurde Gesamt-RNA aus dem Thymus von wt (+/+), heterozygot (+/-) und homozygot (-/-) Gfi-1-defizienten Tieren isoliert (5.4.1), 6 µg hiervon in einem Formaldehyd-haltigen 1% Agarosegel aufgetrennt (5.4.2) und auf Nylonmembran transferiert (5.4.3.1). Zur Detektion wurde ein HincII Fragment der murinen *gfi-1* cDNA radioaktiv markiert und über Nacht an membranfixierte Thymus-RNA hybridisiert (5.4.3.2). Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Membran mit RNA erfolgte anschließend eine zweite Hybridisierung mit einer *gapdh*-spezifischen Sonde. Abbildung 8a zeigt das Autoradiogramm dieses sog. Northern-Blot Verfahrens. In der Thymus-RNA Gfi-1-defizienter Tiere können keine *gfi-1* spezifischen Transkripte mehr nachgewiesen werden, während sowohl wt als auch Gfi-1<sup>+/-</sup> Mäuse gleiche Mengen an *gfi-1* mRNA im Thymus aufweisen.

Zusätzlich wurde die Gfi-1 Proteinmenge in Thymozyten der drei unterschiedlichen Genotypen untersucht. Dazu wurden Thymozyten isoliert (5.6.6.1), Proteinextrakte gewonnen (5.5.4) und 30 µg Gesamtprotein mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (5.5.2). Nach Transfer auf eine NC-Membran (5.5.3) wurde zum Nachweis ein polyklonales Ziegenserum (M-19) eingesetzt, das Antikörper enthält, die spezifisch gegen den C-terminalen Bereich von Gfi-1 gerichtet sind. Die Abbildung 8b zeigt die endogene Gfi-1 Expression im Thymus von wt und Gfi-1<sup>+/-</sup> Tieren, während in Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren kein Protein mehr detektiert

werden kann. Damit kann auch ausgeschlossen werden, daß sich ein verkürztes Proteinprodukt aus den verbliebenen *gfi-1* Sequenzen gebildet hat.



**Abb. 8: Nachweis der Gfi-1-Defizienz in Knock-out Tieren**

**a:** 6 µg isolierte Gesamt-RNA aus Thymi von Gfi-1<sup>+/+</sup>, Gfi-1<sup>+/-</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde in einem Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend mit einem radioaktiv markierten HincII-Fragment der *gfi-1* cDNA hybridisiert. Das Autoradiogramm zeigt gleich starke Signale in den +/+ und +/- Proben sowie den Verlust *gfi-1* spezifischer Transkripte bei Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde anschließend die Membran mit einer *gapdh*-Sonde hybridisiert. **b:** Nachweis von Gfi-1 Protein. Aus Thymozyten der drei unterschiedlichen Genotypen Gfi-1<sup>+/+</sup>, Gfi-1<sup>+/-</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> wurden Proteinextrakte gewonnen, 30 µg über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf NC-Membran transferiert. Der Nachweis von Gfi-1 Protein erfolgte durch Inkubation mit einem polyklonalen anti-Gfi-1 Ziegenserum (M-19; Verdünnung 1:2000), anschließend mit einem HRP-konjugierten anti-Ziege Zweitantikörper (Verdünnung 1:5000) und Detektion unter zur Hilfenahme des ECL<sup>®</sup>-Kits und Exposition auf einem Röntgenfilm.

### 2.1.5 Allgemeine Bemerkungen zum Phänotyp

Der Verlust von Gfi-1 Expression führt zunächst zu einer normalen Entwicklung der Mäuse. Auch das Verhältnis der drei Genotypen Gfi-1<sup>+/+</sup>, Gfi-1<sup>+/-</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> nach Verpaarung heterozygoter Tieren untereinander entsprach mit 1:2:1 den Mendelschen Regeln. Allerdings hatte der Verlust an Gfi-1 postnatal dramatische Auswirkungen. So waren die Knock-out Mäuse erheblich kleiner als ihre Geschwister und starben ohne Ausnahme innerhalb der ersten sieben Wochen nach der Geburt. Heterozygote Tiere hingegen verhielten sich stets wie ihre wt-Geschwister. Daher werden im folgenden Ergebnisteil nur noch die wt-Kontrollen gezeigt. Bei Haltung der Tiere in einer weitestgehend pathogenfreien Versuchstieranlage (SPF-Einrichtung) trat die starke Gewichts- und Größenreduzierung zunächst nicht auf und die Lebenserwartung verlängerte sich auf bis zu 10 Wochen. Danach magerten auch diese Tiere ab und mußten getötet werden. Bei einer makroskopischen Untersuchung fielen sofort morphologische

Veränderungen nahezu aller lymphatischen Organe auf. Insbesondere Knochenmark, Thymus, Milz und Lymphknoten waren betroffen. Hingegen waren weder makroskopisch noch histologisch Veränderungen anderer Organe offensichtlich. Alle histologischen Untersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-P. Elsässer (Philipps Universität Marburg) statt.

## **2.2 Auswirkungen auf das Knochenmark und die Blutbildung**

### 2.2.1 Morphologische Veränderungen des Knochenmarks

Das Knochenmark ist als Ort der Hämatopoese und primäres lymphatisches Organ entscheidend für die Bildung aller Blutzellen. Da eine schwache Gfi-1 Expression im Knochenmark gezeigt wurde (Zörnig *et al.*, 1996) und die Entwicklung von T-Zellen hier ihren Ursprung nimmt, wurde zunächst das Knochenmark der Gfi-1 Knock-out Tiere analysiert. Dazu wurden in den meisten Fällen der Femur präpariert und die Knochenmarkszellen aus dem geöffneten Knochen mit PBS ausgespült. Die histologischen Untersuchungen hingegen fanden aus praktischen Gründen am Sternum statt. Schon bei der Isolation des Knochenmarks fiel auf, daß im Gegensatz zur tiefroten Farbe bei wt-Tieren, das Knochenmark der Gfi-1-defizienten Tiere weißlich war. Daher wurden Einzelzellsuspensionen aus dem Knochenmark hergestellt und nach Grünwald-Pappenheim gefärbt (5.7.2). Die Auswertung fand mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. U. Dührsen (Universitätsklinikum Essen) statt. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse nach zellmorphologischen Kriterien zusammengefaßt. Dabei fällt insbesondere die Vermehrung an Pro- und Monozyten auf sowie die Reduktion der Lymphozyten (fett hervorgehoben). Da die Gesamtzahl an kernhaltigen Zellen (gezählt nach Erythrozytenlyse) in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren auf 50-75 % im Vergleich zu den wt Tieren reduziert war (Daten nicht gezeigt), jedoch die Reduktion des Körpergewichts in der gleichen Größenordnung lag, sind hier nur die relativen Zellzahlen der unterschiedlichen Populationen im Knochenmark angegeben.

	Myeloblast	Pro-myelozyt	Myelozyt	Ringform	Segmentkernig	Pro-monozyt	Monozyt
<b>wt</b>	0,3 %	3,3 %	2 %	<b>13,7 %</b>	4,3 %	<b>0,7 %</b>	<b>13,7 %</b>
<b>ko</b>	0 %	0 %	0 %	<b>2,7 %</b>	0,7 %	<b>27,7 %</b>	<b>41,7 %</b>
	Meta-myelozyt	Lymphozyt	Plasmazelle	Eosinophile	Basophile	Normoblast	Proerythrozyt
<b>wt</b>	2,3 %	<b>32,7 %</b>	1 %	1,7 %	0 %	19,7 %	5 %
<b>ko</b>	1,7 %	<b>10,7 %</b>	0 %	2 %	0 %	11,3 %	1,7 %

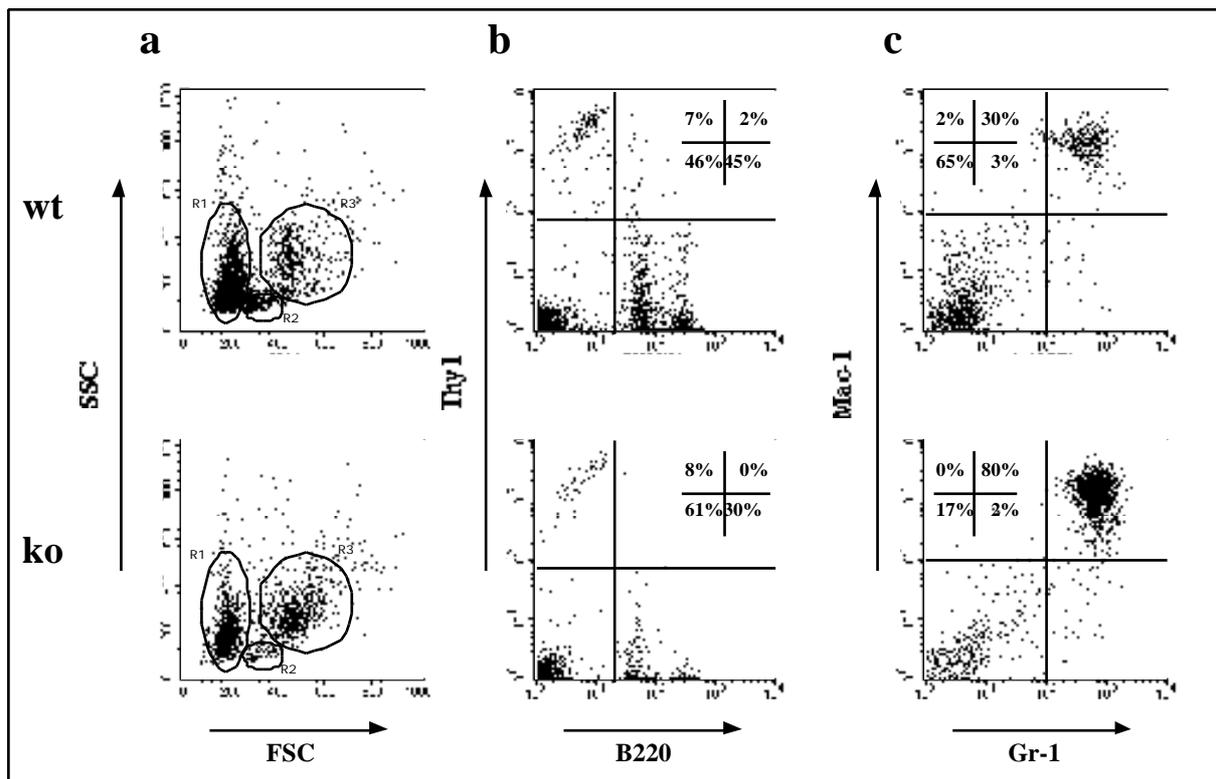
**Tab. 1: Differentialzählung von Zytospins des Knochenmarks**

Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks von Gfi-1<sup>+/+</sup> (wt) und Gfi-1<sup>-/-</sup> (ko) Mäusen wurden durch Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht, getrocknet und nach Grünwald-Pappenheim gefärbt. Die Auszählung von jeweils 100 Zellen und Bestimmung erfolgte nach morphologischen Kriterien (Größe, Kernform, Färbung, etc.). Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen jeweils einer repräsentativen Probe. Auffällige Werte sind fett hervorgehoben.

### 2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse des Knochenmarks

Zur näheren Charakterisierung der Knochenmarkszellen und ergänzend zur Differentialzählung nach morphologischen Kriterien wurden Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Über die Streuung und Beugung des Lichts durch die Zellen, können zudem Aussagen über die Größe und die Granularität von Zellen gemacht werden. In Abbildung 9 ist ein Teil dieser Analysen exemplarisch an einer wt und einer Gfi-1<sup>-/-</sup> Probe dargestellt. Teil a der Abbildung zeigt anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung die oben erwähnten morphologischen Parameter. Dabei erscheinen die Erythrozyten als kleinste Population (R1), gefolgt von den Lymphozyten mit einem kleinen Teil der Monozyten (R2) und den übrigen kernhaltigen Zellen, einschließlich erythroider und myeloider Vorläufer bzw. ausgereifter Zellen (R3). Auch diese Analyse weist auf eine Reduktion der Lymphozyten durch die Gfi-1-Defizienz hin, sowie dem Aufkommen einer neuen Population in R3. Es ist anzunehmen, daß diese neue Population mit den im vorherigen Abschnitt als Pro- bzw. Monozyten bezeichneten Zellen identisch sind. Durch elektronische Auswahl der einzelnen Populationen und Analyse der Expression linienspezifischer Marker (Ter-119 für erythroide Zellen, Daten nicht gezeigt; Thy1 und B220 für T- bzw. B-Lymphozyten, Abb. 9.b) wurde die morphologische Einteilung der Zellen in R1 und R2 bestätigt. Hierbei fiel auf, daß die relative Zahl der T-Zellen (Thy1<sup>+</sup>) im Vergleich zwischen wt und Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen nicht verändert, jedoch die Population der

monozytären Zellen (Thy1<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>) auf Kosten der B-Zellen (B220<sup>+</sup>) in Knock-out Tieren deutlich erhöht war. Legt man die absoluten Zellzahlen zugrunde, so ergibt sich eine Reduktion lymphoider Zellen im Knochenmark auf ca. 25 % der wt Population. Dies entspricht den Daten aus der Differentialzählung aus 2.2.1. Eine weitere Analyse der myeloiden Zellen in R3 fand über die Oberflächenexpression der Marker Mac-1 (CD11b) und Gr-1 (Ly6G), abgebildet im Teil c, statt. Es zeigt sich eine deutliche Vermehrung der Mac-1/Gr-1 doppelpositiven Zellen in den Gfi-1 defizienten Tieren. Diese Zellen sind jedoch für die Monozytenmarker F4/80 und CD16/32 (Fc RIII/II) negativ, sowie für alle weiteren getesteten, linienspezifischen Marker (Ter-119, CD11c, CD19, Thy1, NK1.1; Daten nicht gezeigt). Allerdings weisen sie eine hohe CD44 Expression auf (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit der morphologischen Einteilung als Pro- bzw. Monozyten scheint es sich also in der Mehrheit um eine atypische, in normalen Tieren nicht vorkommende Zellpopulation zu handeln, die vom Expressionsprofil noch am ehesten neutrophilen Granulozyten ähnelt (Lagasse und Weissman, 1996).

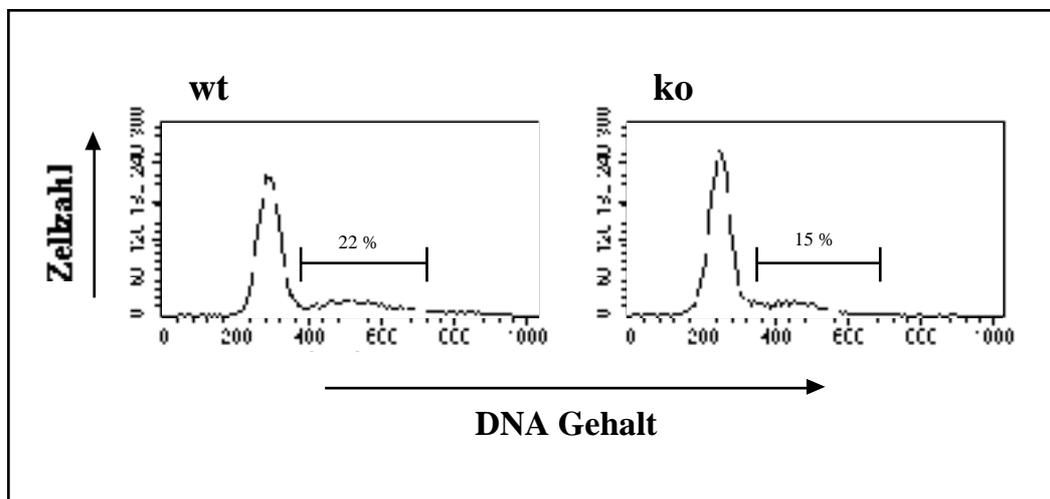


**Abb. 9: Durchflußzytometrische Analyse des Knochenmarks**

Aus dem Knochenmark des Femurs von Gfi-1<sup>+/+</sup> (wt) und Gfi-1<sup>-/-</sup> (ko) Mäusen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und für die Durchflußzytometrie aufgearbeitet. **a:** Morphologische Darstellung aller Knochenmarkszellen über die Intensitäten des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichts (SSC). Zu Erkennen sind drei Populationen, die elektronisch über die CELLQuest Software ausgewählt und als R1-3 benannt wurden. In R1 finden sich vornehmlich Erythrozyten, in R2 Lymphozyten und in R3 die Mehrheit der Makrophagen, Granulozyten und Monozyten. **b:** Färbung der Knochenmarkszellen mit anti-B220 FITC-gekoppelten und anti-Thy1 PE-konjugierten Antikörpern und anschließender Verknüpfung mit den in R2 befindlichen Zellen. Diese Analyse ermöglicht die differenzierte Darstellung der T- und B-Lymphozyten des

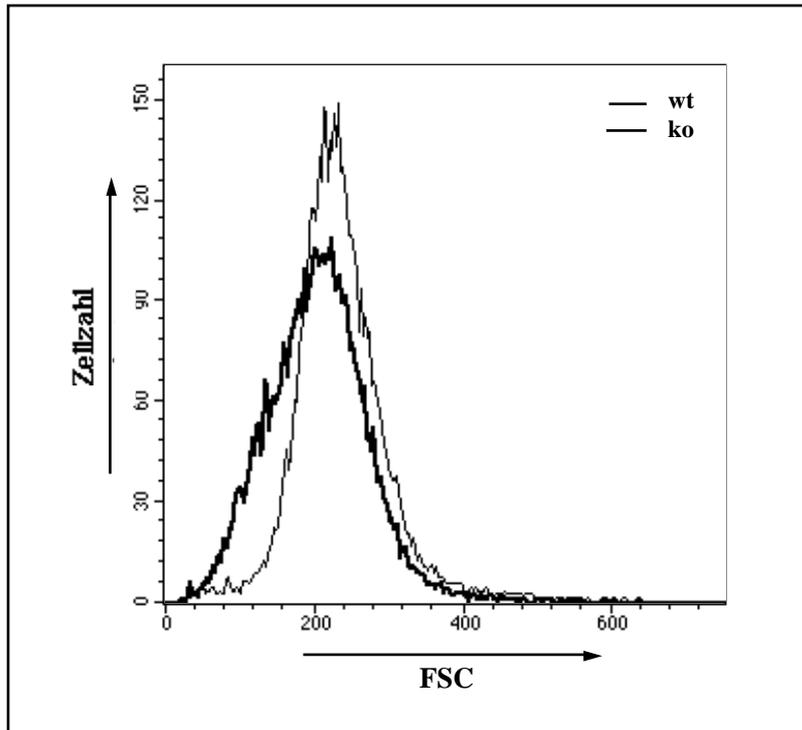
Knochenmarks. c: Färbung der Zellen mit Gr-1-FITC und Mac-1-PE Antikörpern und Verknüpfung mit der Region R3. Diese Form der Darstellung erlaubt eine grobe Einteilung der myeloischen Zellen in (hauptsächlich neutrophile) Granulozyten ( $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$ ) und Monozyten ( $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^{\text{int}}$ ). Die  $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$  Population besteht in ihrer Mehrzahl aus Promonozyten, unreifen Granulozyten und Lymphozyten.

Um die Ursachen der Akkumulation dieser atypischen, monozytären Population zu klären, wurden die Zellen zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33382 gefärbt, die  $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$  Zellen elektronisch markiert und über ein DNA-Histogramm (Abb. 10) die Zellzyklusverteilung dargestellt. Dabei zeigte sich, daß im Vergleich zu den wt  $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$  Zellen im Gfi-1-defizienten Tier weniger Zellen proliferierten (ca. 7% weniger). Damit scheidet eine Hyperproliferation dieser Zellen als Ursache für die Akkumulation aus. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit würde sich über eine veränderte Überlebensfähigkeit der Zellen ergeben. Um dies zu überprüfen wurden kernhaltige Knochenmarkszellen in DMEM mit 10% FBS in Kultur gehalten und die spontane Apoptoserate bestimmt (Daten nicht gezeigt). Trotz geringfügiger Unterschiede in der Kinetik waren nach wenigen Tagen die Zellen beider Kulturen,  $\text{Gfi-1}^{+/+}$  und  $\text{Gfi-1}^{-/-}$  Zellen, nahezu vollständig abgestorben.



**Abb. 10: Zellzyklusverteilung  $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$  Zellen aus dem Knochenmark**

Knochenmarkszellen aus  $\text{Gfi-1}^{+/+}$  und  $\text{Gfi-1}^{-/-}$  Mäusen wurden mit Gr-1-FITC und Mac-1-PE Antikörpern gefärbt. Im Anschluß fand eine 30 minütige Inkubation mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33382 statt. Bei der durchflußzytometrischen Analyse wurde zunächst im FSC/SSC alle kernhaltigen Zellen (vergl. Abb. 9; R2+R3) und in der Darstellung deren Fluoreszenz nur die  $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$  doppeltpositiven elektronisch ausgewählt. Nach Verknüpfung dieser beiden Markierungen, Darstellung der Hoechst 33382 Intensität der Population von 10.000  $\text{Mac-1}^+/\text{Gr-1}^+$  Zellen. Der Balken markiert die in S/G2/M-Phase befindlichen Zellen und gibt deren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation wieder.



**Abb. 11: Größenverteilung der Erythrozyten**

Darstellung der Größe von Erythrozyten aus dem Blut von Gfi-1<sup>+/+</sup> (wt) und Gfi-1<sup>-/-</sup> (ko) Mäusen über das Vorwärtsstreulicht (FSC) des Durchflußzytometers. Frisch isoliertes Blut wurde mit EDTA versetzt, um die Gerinnung zu hemmen und anschließend mit PBS verdünnt. Aufgenommen wurden jeweils 10.000 Erythrozyten und deren Größenverteilung als Histogramm abgebildet. Es zeigt sich, daß die Erythrozyten aus den Gfi-1-defizienten Mäusen (fette Linie) im Durchschnitt kleiner sind als die der entsprechenden Wildtypkontrolle.

### 2.2.3 Erythropoiese und Blutbild

Wie sich bereits durch die helle Farbe andeutete, befinden sich im Knochenmark von Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich weniger Erythrozyten. Sollte eine mangelhafte Erythropoiese vorliegen, so müßte sich dies in einer Anämie im peripheren Blutbild widerspiegeln. Zu diesem Zwecke wurde von einer Reihe von Gfi-1-defizienten Tieren einschließlich Kontrolltieren durch Herzpunktion EDTA-Blut gewonnen und in Zusammenarbeit mit Dr. Klug vom Tierärztlichen Dienst des Universitätsklinikums Aachen analysiert. Mit Ausnahme einer einzigen Gfi-1<sup>-/-</sup> Maus konnten jedoch keine Anomalitäten der Erythrozyten festgestellt werden. Sowohl Hämoglobingehalt als auch Hämatokrit waren normal. Bei der erwähnten Ausnahme handelte es sich um ein bereits stark geschwächtes, krankes Tier, welches tatsächlich anämisch war. Die Darstellung der Erythrozytengröße durch das Vorwärtsstreulicht (FSC) des Durchflußzytometers (siehe Abb. 11) ergab einen im Durchschnitt deutlich kleineren Durchmesser für Erythrozyten bei Gfi-1-defizienten Mäusen. Allerdings erbrachte die Auswertung von Blutaussstrichen keinerlei mikroskopisch erkennbaren Auffälligkeiten hervor. Größe und Form der Erythrozyten erschienen hier normal. Auch alle weiteren hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter waren weitestgehend normal. Nur die bereits im Knochenmark aufgefallene Verminderung von Lymphozyten bei gleichzeitiger Vermehrung von

monozytären Zellen konnte sowohl in Blutausstrichen als auch in Einzelzellsuspensionen von Milzzellen anhand morphologischer Kriterien bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Knochenmark waren diese in der Peripherie für Mac-1 und Gr-1 negativ, jedoch weiterhin CD44 hochexprimierend. Es wird daher angenommen, daß es sich um die gleiche Zellpopulation bzw. eine Weiterdifferenzierung der atypischen, monozytären Zellen des Knochenmarks handelt, die lediglich ein anderes Expressionsprofil an Oberflächenproteinen aufweist (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12: Makroskopischer Vergleich der Milzen von Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren**

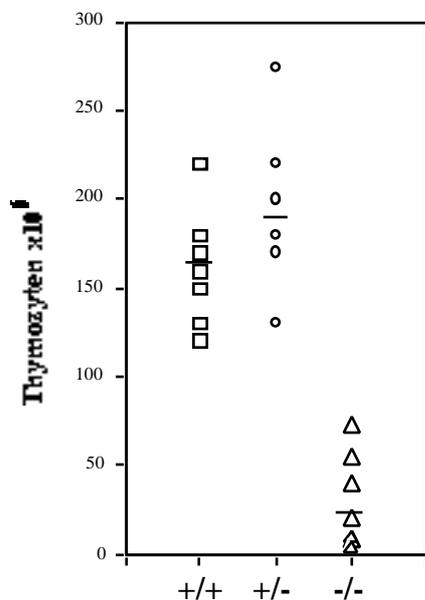
Vergleich der Milzen zweier vier Wochen alten wt bzw. Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse. Die obere, kleinere Milz entstammt aus einem Gfi-1<sup>-/-</sup> Tier und zeigt eine deutlich unebenere Oberfläche als die Milz des Kontrolltieres.

Im Gegensatz zum Menschen ist die murine Milz in sehr viel stärkerem Ausmaß Ort der Erythropoiese. Da das Knochenmark von Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren aufgrund der oben beschriebenen Defekte wahrscheinlich nicht mehr ausreichend die Blutbildung gewährleisten kann, das Blutbild aber weitestgehend normale Werte aufwies, kann eine Kompensation der Erythropoiese durch die Milz angenommen werden. Tatsächlich war bereits makroskopisch mit zunehmenden Alter der Mäuse eine Vergrößerung der Milz festzustellen. Bezogen auf das Gesamtkörpergewicht betrug diese zwischen 10 und 80 %. Zudem zeigten Milzen von Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen häufig Vorwölbungen nach außen, was auf eine Hyperproliferation bestimmter Gewebeabschnitte hindeutet (Abb. 12). Eine histologische Untersuchung ergab, daß die Vergrößerung der Milz auf eine Ausweitung der roten Pulpa, dem Ort der Erythropoiese, zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt). Auch bestätigten durchflußzytometrische Analysen einen erheblich größeren Anteil an erythroiden Ter-119<sup>+</sup> Zellen in den Milzen der Gfi-1-defizienten Tiere (Daten nicht gezeigt).

## 2.3 Veränderungen der T-Zellentwicklung im Thymus

### 2.3.1 Verminderung der Thymozytenzahl in Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen

Die stärkste Expression an Gfi-1 findet sich im Thymus. Es wurde gezeigt, daß Gfi-1 differentiell exprimiert in allen Thymozytenpopulationen vorkommt (Schmidt *et al.*, 1998b). Erst die reifen, CD4 bzw. CD8 einzelpositiven T-Zellen schalten die Gfi-1 Expression ab und regulieren sie erst nach Antigenkontakt transient wieder hoch. Zusätzlich gab es Hinweise für eine Funktion von Gfi-1 während der  $\alpha$ -Selektion (Schmidt *et al.*, 1998b). Daher lag der Schwerpunkt der Analysen des Phänotyps Gfi-1 defizienter Mäuse auf diesem Organ.

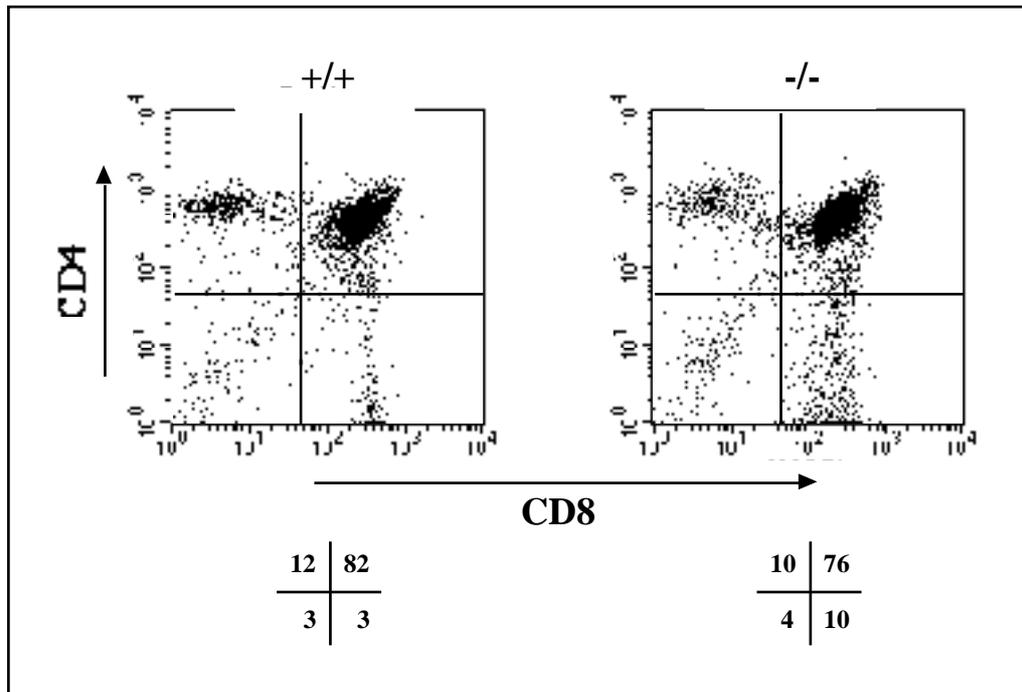


**Abb. 13: Absolute Thymozytenzahlen**

Graphische Darstellung der absoluten Thymozytenzahlen individueller 4-6 Wochen alter Tiere der Genotypen Gfi-1<sup>+/+</sup>, Gfi-1<sup>+/-</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup>. Nach Präparation der Thymi wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und 1:1000 Verdünnungen dieser Suspensionen mit einem CASY<sup>®</sup> Zellzählgerät vermessen. Als lebende Thymozyten wurden alle Partikel mit einem Durchmesser zwischen 5 und 10  $\mu$ m definiert. Der Querbalken markiert den Mittelwert aus 9 (+/+), 10 (+/-) bzw. 12 (-/-) einzelnen Individuen des jeweiligen Genotyps.

Veränderungen in der Entwicklung von Thymozyten schlagen sich fast immer in der Gesamthymozytenzahl sowie Verschiebungen der einzelnen Subpopulationen im CD4/CD8 Bild wieder. Bereits bei der Entnahme der Thymi zu Analysezwecken fielen deutliche Größenunterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Gfi-1-defizienten Tieren auf. Dies ist ursächlich auf eine Abnahme der Thymozytenzahlen zurückzuführen. Für eine genaue statistische Auswertung wurden daher aus den Thymi 4-6 Wochen alter Tiere Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellzahl mit Hilfe eines CASY<sup>®</sup> Zählgerätes (Fa. Schärfe) bestimmt. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis dieser Auswertung und verdeutlicht die

drastische Reduktion an Thymozyten in Gfi-1-defizienten Tieren. Die Thymusarchitektur selbst mit ihrer Aufteilung in Kortex- und Markregion war hiervon nicht betroffen. Hämatoxylin und Eosin (HE)-gefärbte histologische Schnitte zeigten zwar bei den Knock-out Mäusen eine Verminderung der Kortexregion; der strukturelle Aufbau des Organs blieb jedoch unverändert (Daten nicht gezeigt).

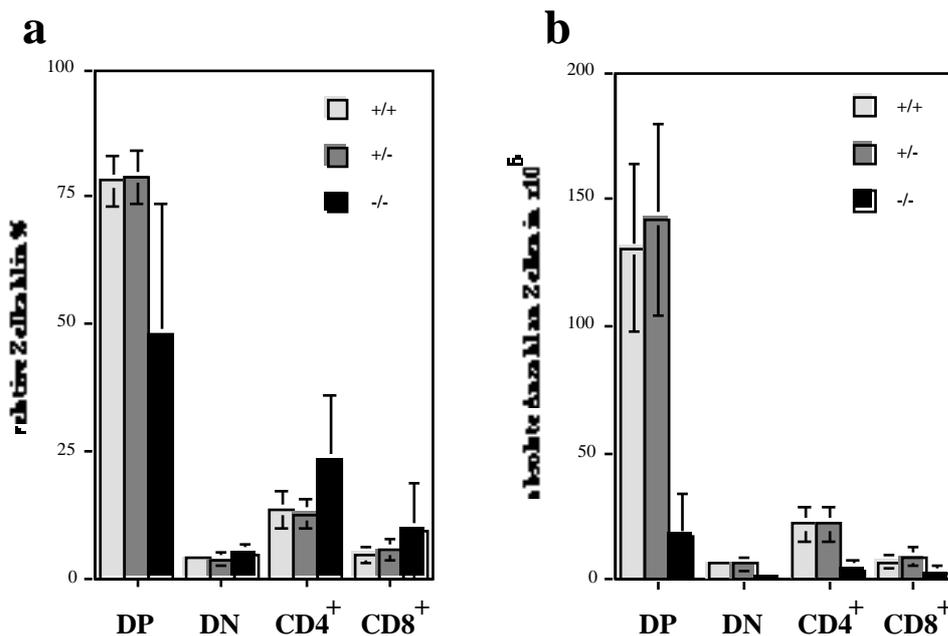


**Abb. 14: Durchflußzytometrische Analyse des Thymus**

Isolierte Thymozyten aus Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit PE bzw. FITC konjugierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD4 und CD8 gefärbt und die relative Verteilung der Subpopulationen dargestellt. Aufgenommen wurden jeweils 10.000 lebende Thymozyten, die zuvor in der FSC/SSC Darstellung elektronisch ausgewählt wurden. Die prozentuale Verteilung der Populationen entsprechend der Quadranten ist im Kreuz angegeben.

Die nähere Charakterisierung der einzelnen Subpopulationen über die Oberflächenmarker CD4 und CD8 zeigt besonders eine Verminderung der DP Thymozyten und eine Erhöhung der CD8 SP Population. Dies ist exemplarisch in Abb. 14 anhand einer durchflußzytometrischen Messung und in Abb. 15 statistisch demonstriert. Dabei fiel auf, daß die Thymi der Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse phänotypisch in zwei Gruppen unterteilt werden konnten. Das CD4/CD8 Profil in Abb. 14 zeigt ein Beispiel des schwächeren Phänotyps, der sich in den prozentualen Zahlen nicht stark vom wt unterscheidet. Daneben wurde in fast der Hälfte der analysierten Thymi von Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren ein nahezu vollständiger Verlust der DP Zellpopulation beobachtet. Damit einher ging die Reduktion der absoluten Thymozytenzahl auf 2-8 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Thymus.

Aus diesen sehr starken Schwankungen der DP Population bei Gfi-1-defizienten Tieren resultiert auch die hohe Fehlerabweichung in Abb. 15.a. Es bleibt jedoch zu beachten, daß der relative Anteil DP Thymozyten aus Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren ohne Ausnahme unter den Werten der Gfi-1<sup>+/+</sup> Tiere lagen. Im Vergleich der absoluten Thymozytenzahlen zwischen wt und Knock-out sind jedoch alle Thymussubpopulationen reduziert und somit vom Gfi-1 Verlust betroffen. Dies würde auf einen sehr frühen Entwicklungsblock hindeuten.



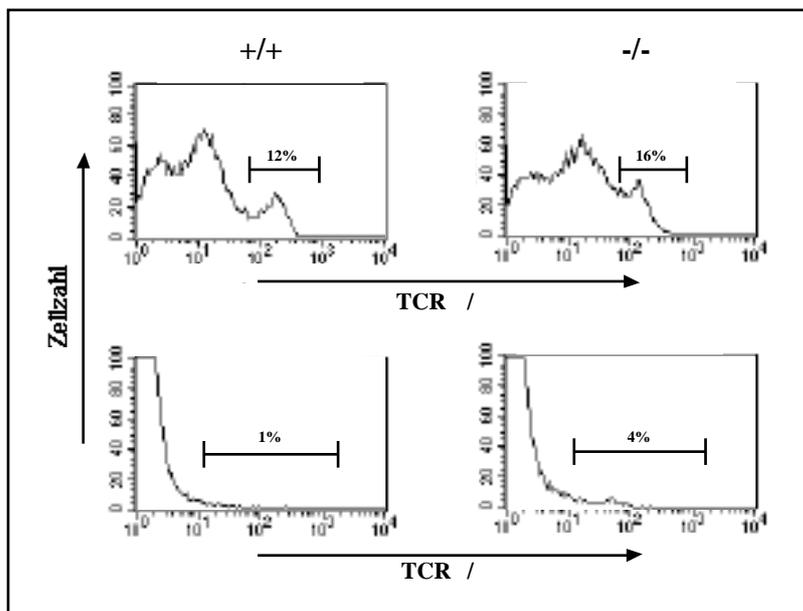
**Abb. 15: Statistische Auswertung der CD4/CD8 Subpopulationen des Thymus**

**a:** Statistische Darstellung mehrerer durchflußzytometrischer Analysen der CD4/CD8 Subpopulationen von Thymozyten und ihrer relativen Verteilung. Zu erkennen ist eine relative Abnahme der DP Zellen zugunsten der drei übrigen Subpopulationen im Thymus von Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren. **b:** Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der vier verschiedenen CD4/CD8 Subpopulationen zeigt eine signifikante Verminderung aller Populationen in Gfi-1 defizienten Tieren. Anzahl untersuchter Tiere: n (+/+) = 9; n (+/-) = 10 und n (-/-) = 12.

Da der Expression und Rekombination des TCR, wie in der Einleitung beschrieben, eine besondere Bedeutung zufällt und für die Thymozytenentwicklung essentiell ist, wurde zunächst dessen Expression überprüft. Auch wenn sich entsprechend den Verschiebungen zwischen den einzelnen Subpopulationen relative Veränderungen in der TCR / und CD3 Expression zeigen (Abb. 16), so zeichnen sich doch alle SP Thymozyten der Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere durch eine hohe Expression des TCR-Komplexes aus. Zudem finden sich in vergleichbaren relativen Zahlen alle getesteten variablen TCR-Ketten (V 8, V 4, V 7, V 8.2, V 10 und

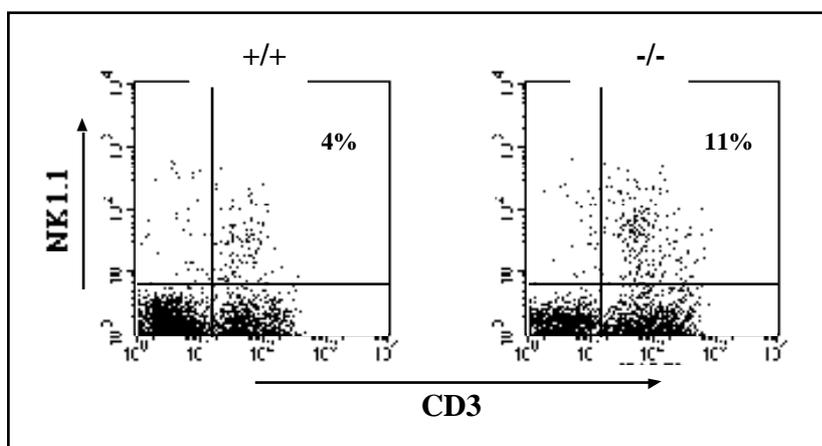
V 12b) auf den TCR  $\alpha$  /  $\beta$  Thymozyten der Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse wieder (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt die Funktionalität der V(D)J Rekombination und die Ausbildung polyklonaler Zellen.

Neben  $\alpha$  /  $\beta$  T-Zellen entwickeln sich auch  $\gamma$  /  $\delta$  und NK T-Zellen im Thymus aus gemeinsamen Vorläuferzellen. Beide Zellpopulationen finden sich in relativ erhöhter Zahl im Thymus der Gfi-1 defizienten Mäuse (siehe Abb. 17) sind jedoch in ihrer absoluten Zahl ähnlich dramatisch reduziert wie die übrigen Thymozytenpopulationen.



**Abb. 16: Expression der TCR  $\alpha$  /  $\beta$  bzw.  $\gamma$  /  $\delta$ -Ketten auf Thymozyten**

Isolierte Thymozyten von Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit FITC bzw. PE markierten Antikörpern gegen  $\alpha$  /  $\beta$  bzw.  $\gamma$  /  $\delta$  TCR gefärbt und deren Expression mittels Durchflußzytometrie dargestellt. Entsprechend der Expressionsstärke des  $\alpha$  /  $\beta$  TCR lassen sich drei Populationen unterscheiden. Zellen mit hoher Expression wurden elektronisch markiert und ihr prozentualer Anteil angegeben. Dagegen weisen nur sehr wenige Thymozyten eine geringe Expression des  $\gamma$  /  $\delta$  TCR auf.



**Abb. 17: Darstellung der NK T-Zellen im Thymus**

Färbung isolierter Thymozyten mit anti-CD3-FITC; anti-NK1.1-PE und anti-CD4- bzw. CD8-TriColor Antikörpern. Elektro-nische Auswahl der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen und Darstellung der CD3 und NK1.1 Expression. NK T-Zellen des Thymus sind positiv für diese beiden Oberflächen-proteine. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Messungen.

### 2.3.2 Analyse der DN Subpopulationen im Thymus

Die Reduktion aller Thymozytenpopulationen, einschließlich NK T- und / Zellen, legt bereits sehr frühe Defekte bei der T-Zellentwicklung nahe. Daher sollten zunächst die Zellen der DN Thymozyten näher untersucht werden. Wie in der Einleitung beschrieben erfolgt die Charakterisierung dieser Population hauptsächlich über die Expression der Oberflächenproteine CD25 und CD44. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymi mit TriColor-markierten anti-CD3, CD4 und CD8 Antikörpern gefärbt, in der Durchflußzytometrie alle TriColor negativen Zellen elektronisch markiert und deren CD25/CD44 Profil über zwei weitere Fluoreszenzmarker dargestellt. In Abbildung 18.a findet sich ein solches repräsentatives Profil der DN Thymozyten von wt und Gfi-1 Knock-out Mäusen. Es fällt auf, daß insbesondere die DN1 Population von CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> relativ vermehrt ist, also die unreifsten Zellen des Thymus. Von im Durchschnitt 20-25 % bei wt Tieren erhöht sich diese Zahl auf 35-50 % bei Gfi-1-defizienten Tieren. Desweiteren erscheint das Bild der DN1 Zellen deutlich heterogener, da sich eine gut unterscheidbare kleine Subpopulation mit sehr schwacher CD25 Expression abgrenzen läßt, die in den Kontrollen nicht vorkommt (siehe Pfeil in Abb. 18.a). Ähnliches gilt für die sonst nur sehr kleine nachfolgende Population des DN2 Stadiums. Sie ist zwar im Thymus der meisten Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse nicht dramatisch verändert, jedoch fällt auch hier eine Population mit mittlerer CD25 Expression auf (oberer, rechter Quadrant). Die erhöhte Zahl an DN1 Thymozyten geht vor allem zu Lasten der DN3 Population, in welcher der Prozeß der -Selektion stattfindet. Sie verringert sich von ca. 50 % im wt auf Werte zwischen 20 und 35 %. Dagegen schwankt die relative Zahl der Zellen in DN4 sowohl bei Gfi-1-defizienten als auch bei normalen Tieren um eine Marke von 25 %.

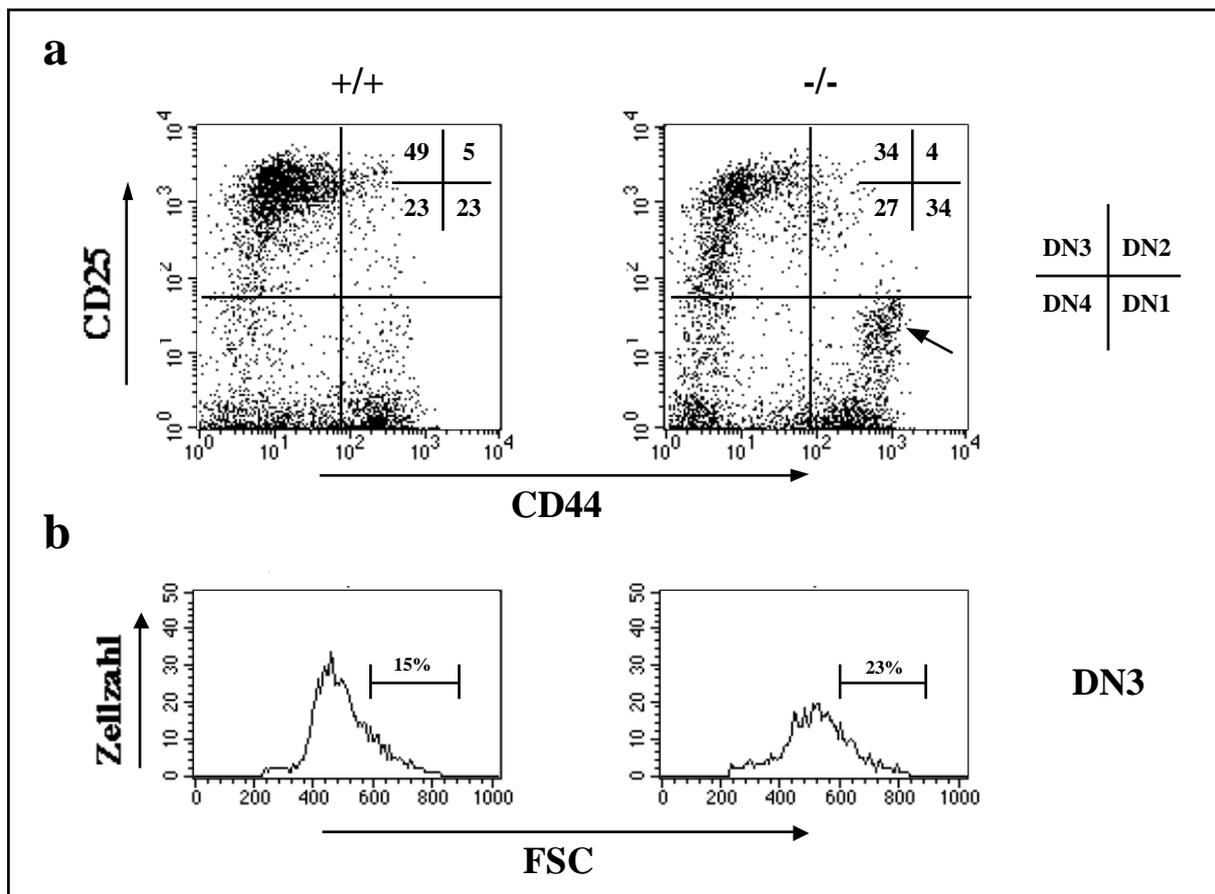


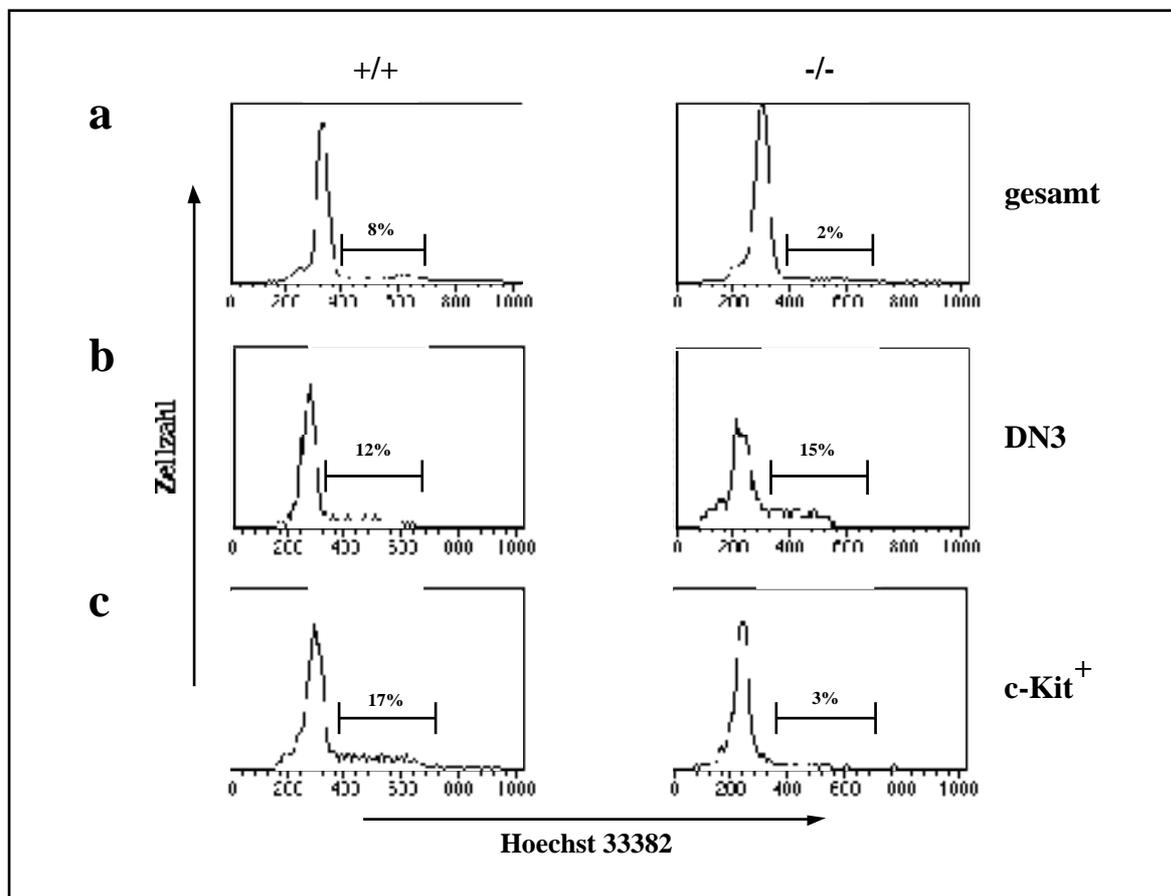
Abb 18.: Analyse der DN Subpopulationen von Thymozyten

**a:** Einzelzellsuspensionen von Thymozyten aus Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren wurden mit anti-CD44-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD3/4/8-TriColor konjugierten Antikörpern gefärbt. Gezeigt ist das CD44/CD25 Expressionsprofil elektronisch markierter CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> Thymozyten. Über die differentielle Expression von CD25/CD44 erfolgt die Unterteilung der DN Zellen in vier Subpopulationen entsprechend den eingezeichneten Quadranten. Die Zahlen im Kreuz geben die prozentuale Verteilung dieser vier Populationen wieder. Der Pfeil weist auf eine nur bei Gfi-1-defizienten Mäusen auftretende neue Population innerhalb der DN1 Zellen hin.

**b:** Zusätzliches elektronisches Markieren der CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> DN3 Population und Darstellung deren Größenverteilung über den FSC. Die unterschiedliche Größe der DN3 Zellen erlaubt eine weitere Unterteilung in E- und L-Zellen. Der Bereich der L-Zellen wurde elektronisch markiert und der prozentuale Anteil an der DN3 Population angegeben. Gezeigt sind repräsentative Darstellungen unabhängiger Messungen von jeweils sechs Mäusen.

Der Prozeß der  $\gamma$ -Selektion ist einer der entscheidenden Differenzierungsschritte während der T-Zellentwicklung. Die beobachtete Reduktion der DN3 Zellen sagt aber noch nicht aus, ob dieser Schritt durch den Verlust an Gfi-1 betroffen ist. Da die nachfolgenden Populationen reife TCR tragen, erscheint es unwahrscheinlich, daß die V(D)J Rekombination an sich verändert ist. Mit der  $\gamma$ -Selektion einher geht aber auch ein Proliferationsschritt, der der Expansion  $\gamma$ -selektierter Zellen dient. Zur Analyse dieses Schrittes wurden DN3 Zellen in Abb. 18.a wieder elektronisch markiert und deren Größenverteilung über das Vorwärtsstreulicht in einem Histogramm dargestellt (Abb. 18.b). Entsprechend der Publikation von Hoffman *et al.*, 1996 wurde bei der wt Probe die Verteilung zwischen E- und L-Zellen auf

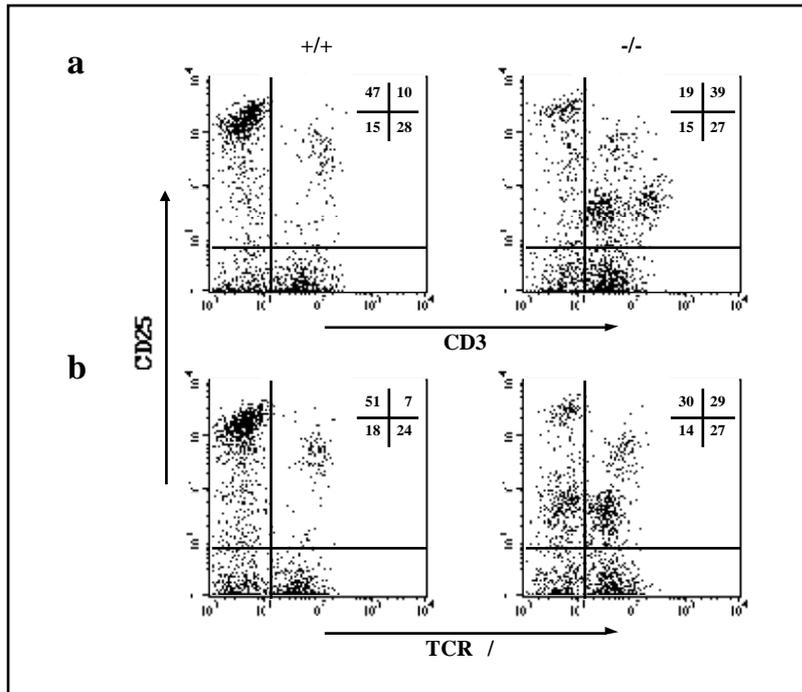
85 % zu 15 % gesetzt und die dazugehörigen Marker auf das Histogramm der DN3 Zellen aus dem Knock-out Thymus übertragen. Daraus ergibt sich eine Erhöhung der L-Zellpopulation in dem gezeigten Beispiel, aus der auf eine vermehrte Expansion von Zellen nach der -Selektion geschlossen werden kann. Da die Größe allein kein sicheres Kriterium für die Proliferation darstellt, wurden die Zellen in einem zusätzlichen Ansatz mit Hoechst 33382 gefärbt und das DNA Profil der DN3 Zellen dargestellt. Diese Analyse bestätigt die erhöhte Anzahl an L-Zellen und weist einen größeren Prozentsatz an proliferierenden Zellen in der DN3 Population der Gfi-1 defizienten Tiere aus (siehe Abb. 19b). Gleichzeitig zeigen aber auch beide Parameter, Vorwärtsstreulicht und DNA-Färbung, eine deutlich erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen bei DN3 Thymozyten der Gfi-1 Knock-out Tiere (2.4.3). Da der -Selektion bereits ein Expansionsschritt vorausgeht und zwar in der DN1 Population, wurden diese Zellen in die Analyse der Proliferation mit einbezogen. Dazu wurden die c-Kit<sup>+</sup> Thymozyten elektronisch ausgewählt und deren Zellzyklusverteilung durch Hoechst 33382 Färbung abgebildet (Abb. 19.c). Im Gegensatz zur DN3 Population zeigen die c-Kit<sup>+</sup> Zellen aus wt Tieren einen erheblich größeren Anteil an proliferierenden Zellen im Vergleich zu dem Gfi-1<sup>-/-</sup> Tier.



### Abb. 19: Zellzyklusverteilung einzelner Thymozytenpopulationen

Isolierte Thymozyten aus Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst 33382 angefärbt und die Zellzyklusverteilung über Intensität der Fluoreszenz mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Angegeben sind die prozentualen Anteile der Zellen, die sich im Zellzyklus (S/G2/M-Phase) befinden. **a:** Darstellung der Zellzyklusverteilung der gesamten Thymozyten. Es zeigt sich eine Reduktion zyklischer Zellen bei Knock-out auf 25 % des wt Wertes. **b:** Neben Hoechst 33382 Anfärbung der Thymozyten mit anti-CD25-PE, anti-CD44-FITC, anti-CD3/4/8-TriColor Antikörpern, elektronisches Markieren der CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN3 Population und Darstellung der Zellzyklusverteilung dieser Subpopulation. Hier zeigt sich ein erhöhter Anteil an proliferierenden Zellen bei der Gfi-1<sup>-/-</sup> Probe im Vergleich zum Wildtyp. Auffällig ist aber auch der Anstieg des Sub-G1 Signals bei den Gfi-1-defizienten DN3 Zellen, was ein Zeichen apoptotischer Zellen ist. **c:** Zusätzliches Anfärben der Zellen mit c-Kit-PE Antikörpern und elektronisches Markieren der c-Kit positiven Thymozyten zur Darstellung deren Zellzyklusverteilung. Während sich bei der Gfi-1<sup>+/+</sup> Probe erwartungsgemäß der Anteil proliferierender Zellen erhöht, bleibt er bei der Gfi-1<sup>-/-</sup> Maus auf niedrigem Niveau.

Ein völlig anderes Bild ergibt sich, wenn man aus der Analyse der DN Thymozyten den Marker CD3 aus der negativen Markierung entfernt, d.h. wenn nur CD4 und CD8 negative Zellen elektronisch selektiert werden und anschließend deren CD25/CD44 Profil dargestellt wird. Nun kommt in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen sehr viel stärker eine oben bereits erwähnte Population innerhalb des DN2 Quadranten mit mittlerer CD25 Expression auf (Daten nicht gezeigt). Es ist daher folgerichtig anzunehmen, daß die Mehrheit dieser Zellen einen TCR trägt. Um dies zu zeigen wurde in der gleichen Auswahl der DN Population der Marker CD44 gegen CD3 bzw. TCR / ausgetauscht. Die Abbildung 20 zeigt das Ergebnis dieser durchflußzytometrischen Bestimmung. Tatsächlich treten zwei neue Populationen im Thymus Gfi-1 defizienter Mäuse mit mittlerer CD25 Expression auf, die unterschiedliche Mengen an CD3 exprimieren. Eine dieser Populationen färbt sich zudem mit dem anti-TCR / Antikörper an, und erfüllt somit ein wesentliches Kriterium reifer T-Zellen. Weitere Analysen, die u.a. die Marker CD11c für dendritische Zellen, NK1.1 für NK-Zellen und den / TCR einbezogen, unterstützen die Annahme, daß es sich bei den CD3<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup> Zellen um DN T-Zellen handelt, da sie für alle weiteren getesteten Marker negativ waren (Daten nicht gezeigt).

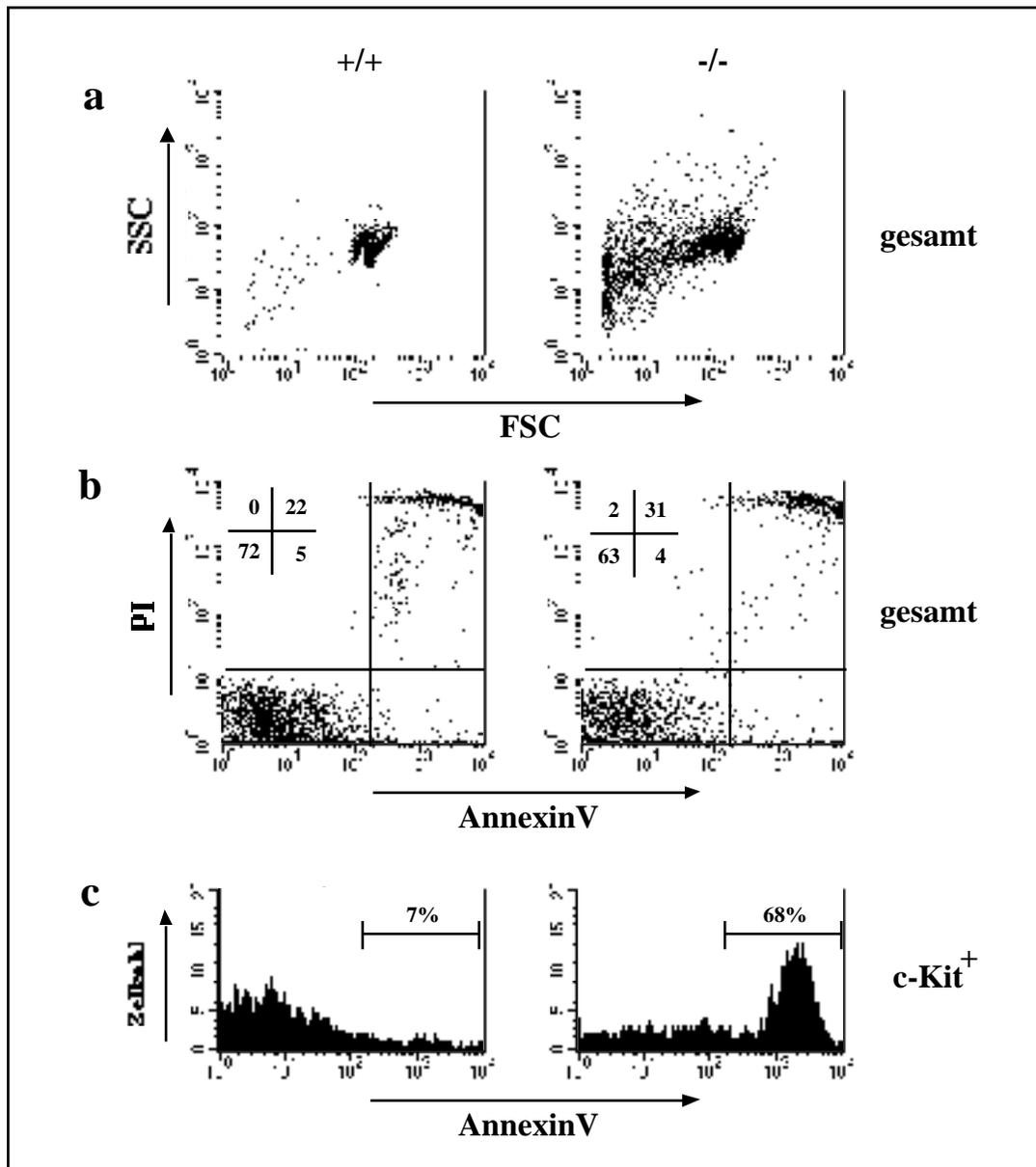


**Abb. 21: Darstellung der DN Subpopulationen unter Einbeziehung des TCR**

Einzelzellsuspensionen von Thymozyten aus Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren wurden mit anti-CD25-PE, anti-CD3- bzw. TCR / -FITC und anti-CD4/8-TriColor Antikörpern gefärbt. Nach elektronischer Auswahl der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> DN Population wurde die Expression von CD25 und CD3 bzw. TCR / abgebildet. Deutlich zeigt sich im CD3 Profil das Aufkommen zweier zusätzlicher Populationen bei Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren (rechter, oberer Quadrant), die bei der wt Probe nicht vorkommen. Die Analyse der TCR / Expression zeigt außerdem, daß ein Teil dieser CD3<sup>+</sup>CD25<sup>int</sup> Zellen auch einen / TCR tragen.

### 2.3.3 Einfluß der Apoptose auf den Phänotyp der Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse

Die insgesamt sehr deutliche Reduktion an Thymozyten, verursacht durch den Gfi-1 Verlust, muß nicht allein auf mangelnde Expansion der frühen c-Kit<sup>+</sup> Thymozyten zurückzuführen sein. Neben der Proliferation fällt auch der Regulation der Apoptose eine große Bedeutung für die T-Zellentwicklung zu. Entscheidende Überlebenssignale gehen dabei sowohl von Zytokinrezeptoren als auch vom TCR aus (siehe Einleitung). Sie wirken häufig über die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>.



**Abb. 21: Darstellung apoptotischer Zellen im Thymus**

**a:** Abbildung der Morphologie von Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymozyten über das Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) des Durchflußzytometers. Die Thymozyten der wt Probe zeigen ein relativ homogenes Bild mit zwei unterscheidbaren Populationen. Dagegen sind deutlich mehr kleinere Zellen im Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymus aufgrund geringerer FSC Werte zu erkennen. **b:** Die beiden Thymozytenpopulationen des Wildtyps aus Teil a der Abbildung wurden elektronisch ausgewählt, sowie mit AnnexinV-FITC und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Dabei sind apoptotische Zellen positiv für AnnexinV und bereits tote Zellen lassen sich zusätzlich mit PI anfärben. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Apoptosestadien ist im Kreuz angegeben. Es zeigt sich, daß der Thymus Gfi-1-defizienter Mäuse ca. 10 % weniger intakte, nicht-apoptotische Zellen enthält als der wt Thymus im Vergleich. **c:** Färbung der Thymozyten mit anti-c-Kit-PE Antikörper und AnnexinV-FITC. Elektronisches Markieren der intakten und c-Kit exprimierenden Zellen und anschließende Analyse deren Anfärbung durch AnnexinV verdeutlicht die dramatische Zunahme an apoptotischen Zellen innerhalb dieser Thymozytensubpopulation in Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils drei analysierte Tiere.

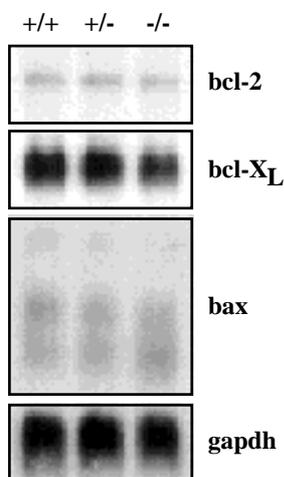
Apoptotische Zellen lassen sich anhand verschiedener Kriterien leicht von intakten Zellen unterscheiden. Zum einen verändert sich die Morphologie der Zellen, was in der

Durchflußzytometrie ausgenutzt werden kann. Apoptotische Thymozyten weisen sich vor allem durch eine geringere Größe und z.T. auch durch eine verstärkte Granularität aus. Die Abb. 21.a zeigt exemplarisch das Vorwärts-/Seitwärtsstreulichtprofil von Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymozyten. Der Thymus der wt Maus zeichnet sich durch zwei homogene Thymozytenpopulationen aus. Eine Hauptpopulation (ca. 80 %) mit etwas größeren FSC-Werten und links davon eine zweite, kleinere (ca. 20 %) Population. Dagegen ist das Bild beim Gfi-1 Knock-out sehr viel uneinheitlicher. Neben den Populationen des wt, existiert ein dritter, sehr heterogener Bereich von Signalen mit geringerer Intensität. Diese breite Wolke, die sich zu immer kleineren Vorwärts-/Seitwärtsstreulichtwerten ausdehnt, wird vermutlich von toten Zellen und Zellebris gebildet. Dies kann ein Zeichen für verstärkte Nekrose sein, da apoptotische Zellen normalerweise effizient von Makrophagen eliminiert werden, um Entzündungsreaktionen zu vermeiden. Es ergibt sich also ein Bild vom Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymus, in dem es wahrscheinlich zu einer starken Akkumulation apoptotischer und möglicherweise auch nekrotischer Zellen kommt.

Ein weiteres Merkmal apoptotischer Zellen ist die Präsentation von Phosphatidylserinen auf ihrer Zelloberfläche. Diese Moleküle können über eine spezifische Bindung an fluorochrommarkiertes AnnexinV detektiert und im Durchflußzytometer quantifiziert werden (5.8.6). Dazu wurden Thymozyten mit AnnexinV-FITC Konjugaten und Propidiumiodid inkubiert. Propidiumiodid dient dazu, zwischen frühen und späten apoptotischen Zellen zu unterscheiden, da es nur in Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran eindringen kann und als DNA-interkalierender Farbstoff nur spät apoptotische Zellen anfärbt. Abbildung 21.b zeigt eine solche Anfärbung, in der zuvor im Vorwärts-/Seitwärtstreulicht intakte Zellen elektronisch markiert wurden. Auch hier bestätigt sich, daß der Verlust von Gfi-1 zu einer deutlichen Vermehrung apoptotischer Thymozyten führt. Zudem kann durch wechselseitiges elektronisches Markieren gezeigt werden, daß die kleinere Population, die im FSC/SSC beschrieben wurde, nahezu identisch mit den AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> toten Zellen ist. Da wichtige Überlebenssignale von IL-7R und c-Kit ausgehen, und sich die Expression der beiden entsprechenden Rezeptoren größtenteils überschneidet, wurden zunächst aus praktischen Gründen nur c-Kit<sup>+</sup> Thymozysten näher auf Apoptose hin untersucht (Abb. 21.c). Dabei ergab sich, daß sich relativ viel mehr c-Kit<sup>+</sup> Zellen aus dem Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymus im Vergleich zum wt mit

AnnexinV anfärben ließen. Außerdem zeigte sich, daß diese Population überproportional zum Gesamtanstieg apoptotischer Zellen positiv durch AnnexinV-FITC markiert wurde: von durchschnittlich ca. 35 % AnnexinV<sup>+</sup> Zellen im gesamten Thymus auf über 70 % der c-Kit<sup>+</sup> Thymozyten im Knock-out. Demhingegen reduzierte sich erwartungsgemäß in der wt Maus die Zahl apoptotischer Zellen der c-Kit<sup>+</sup> Subpopulation im Vergleich zum Gesamthymus von 27 % auf 7 %. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür würde sich ergeben, wenn durch den Verlust an Gfi-1 die Produktion von IL-7 oder SCF reduziert wäre. Daher wurde die Expression dieser Zytokine durch RT-PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Es wurden jedoch gleiche Expressionsmengen detektiert wie bei den wt Kontrollen und in einzelnen Fällen war das SCF Signal von Gfi-1<sup>-/-</sup> Proben eher stärker als das der Kontrollen.

Um einen möglichen molekularen Erklärungsansatz für den zahlenmäßigen Unterschied an apoptotischen Thymozyten zu erlangen und da das pro-apoptotische *bax* Gen als Zielgen von Gfi-1 diskutiert wird (Grimes *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1999), wurde eine Expressionsanalyse von Apoptose regulierenden Genen durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Thymi von Gfi-1<sup>+/+</sup>, Gfi-1<sup>+/-</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren isoliert (5.4.1) und anhand einer Northern-Blot Analyse (5.4.3) die Expression von *bax*, *bcl-2* und *bcl-x* untersucht. Jedoch zeigt sich bei keinem der untersuchten Gene eine signifikante Veränderung in der Expression (Abb. 22). Die leicht erhöhte Menge an *bax* spezifischer mRNA (unteres Signal) resultiert in erster Linie aus den vermehrten apoptotischen Zellen im Knock-out Thymus, da diese die Form transkriptionell hochregulieren (Schmidt *et al.*, 1999).

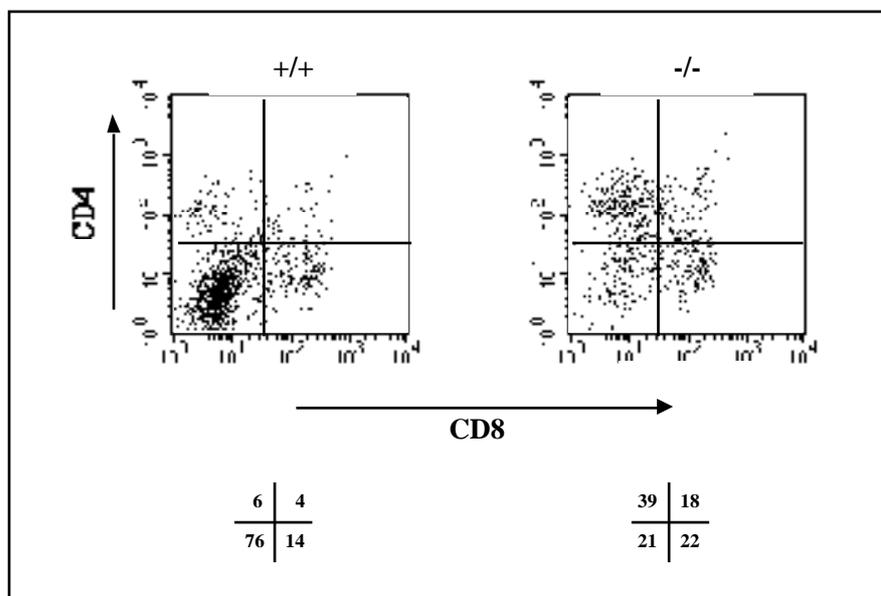


**Abb. 22: Expressionsanalyse verschiedener Mitglieder der Bcl-2 Familie**

Nach Isolation von Gesamt-RNA aus Thymozyten von Gfi-1<sup>+/+</sup>, Gfi-1<sup>+/-</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen, elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Nylonmembran wurden diese mit spezifischen, radioaktiv markierten Sonden für die murinen Gene *bcl-2*, *bcl-x<sub>L</sub>*, *bax* und *gapdh* hybridisiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm dieser RNA-Analyse. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene. Die Hybridisierung mit einer *gapdh*-spezifischen Sonde dient der Kontrolle des gleichmäßigen Auftragens von RNA.

### 2.3.4 Nähere Charakterisierung der c-Kit<sup>+</sup> Thymozyten

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß besonders die c-Kit exprimierenden Thymozyten vom Verlust an Gfi-1 betroffen sind. Wie in der Einleitung erläutert, wird c-Kit von der Mehrzahl der DN Zellen und einer kleinen Population von DP bzw SP Thymozyten exprimiert. Um festzustellen, ob alle c-Kit<sup>+</sup> Zellen im gleichen Maße an der beobachteten Reduktion der Proliferation bei gleichzeitiger Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen beteiligt sind, wurden c-Kit<sup>+</sup> Thymozyten nach ihrem CD4/CD8 Expressionsprofil weiter analysiert (Abb. 23). Diese Analyse ergab, daß die Subpopulation der DN Zellen in Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymozyten besonders stark reduziert ist.



**Abb. 23: Differenzierte Darstellung der c-Kit<sup>+</sup> Thymozyten**

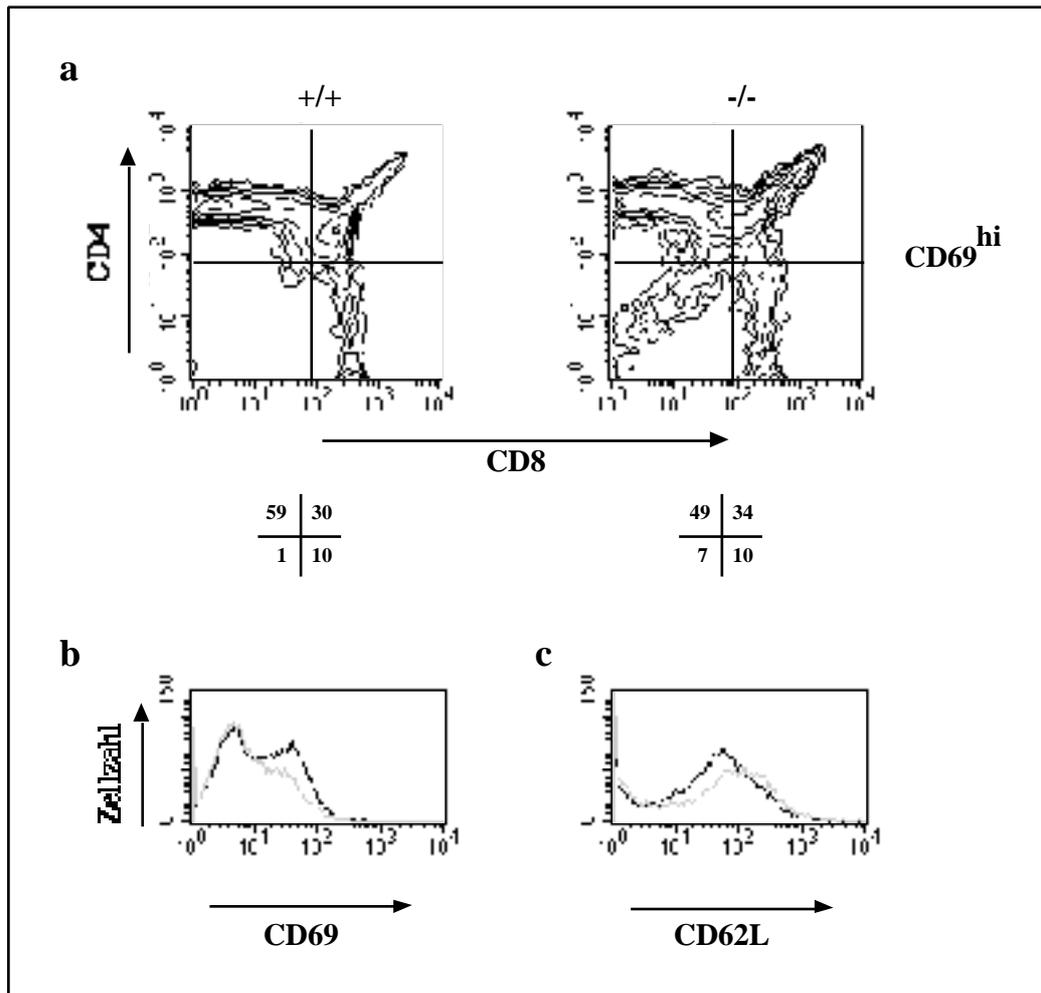
Isolierte Thymozyten wurden mit anti-c-Kit-PE, anti-CD4-TriColor und anti-CD8-FITC Antikörper gefärbt und in der Durchflußzytometrie analysiert. Dabei wurden zunächst alle c-Kit<sup>+</sup> Zellen elektronisch ausgewählt und das CD4/CD8 Expressionsprofil von 10.000 c-Kit<sup>+</sup> Zellen abgebildet. Es zeigt sich eine deutliche Verschiebung der relativen Verhältnisse im Thymus der Gfi-1-defizienten Tiere auf Kosten der DN Population.

### 2.3.5 Positive und negative Selektion DP Thymozyten

Der zweite wesentliche Selektionsprozeß während der Thymozytenreifung findet in der Population der DP Zellen statt. Schon das CD4/CD8 Bild des Gesamthymus läßt auf Veränderungen durch den Gfi-1 Verlust schließen (vergl. Abb. 14). Zum einen hat sich das Verhältnis zwischen CD4 und CD8 SP Zellen verschoben, was auf eine Beeinflussung der Liniendeterminierung zurückzuführen sein könnte. Zudem fällt verstärkt eine CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup>

Subpopulation innerhalb der DP Gfi-1-defizienter Mäuse auf, bei der es sich um eine in der Einleitung beschriebene normalerweise sehr kleine Population von selektionierten, bereits CD4 oder CD8 determinierten Thymozyten handelt. Eine Anhäufung dieser Zellen könnte also auf einen Entwicklungsblock während dieses letzten Differenzierungsschrittes im Thymus hindeuten. Die positive/negative Selektion sowie der Übergang von DP zu SP Thymozyten ist mit phänotypischen Veränderungen verbunden, welche erneut über differentiell exprimierte Oberflächenmoleküle dargestellt werden können. Zwei dieser Marker sind CD69, ein früher Aktivierungsmarker von T-Zellen, und CD62L (L-Selectin), welches als Adhäsionsmolekül bei der Migration von T-Lymphozyten eine Rolle spielt. Die Expression beider Moleküle wird gegensätzlich über Signale des TCR reguliert. Während der positiven Selektion wird die CD69 Expression dann stimuliert, wenn eine DP T-Zelle über ihren TCR positiv selektioniert wird und somit ein TCR-abhängiges Signal erhält. Umgekehrt führt dies zu einer Repression von CD62L, d.h. DP Thymozyten mit erhöhter CD69 und erniedrigter CD62L Expression haben Signale über ihren TCR erhalten und gelten somit als selektioniert. Über die Expression von CD69 und CD62L kann die Funktionalität dieses Prozesses überprüft werden. Wählt man die CD69<sup>+</sup> Thymozyten elektronisch aus und stellt die Expression von CD4/CD8 nur dieser Zellen dar, erhält man ein Profil der Zellen, die gerade selektioniert werden oder schon selektioniert wurden. Abbildung 24.a zeigt ein solches Profil. Es wird ersichtlich, daß der überwiegende Teil der CD69<sup>+</sup> Zellen entweder gerade selektioniert wird und überwiegend der DP<sup>int</sup> Population zugehörig ist oder bereits die CD4 Linie eingeschlagen hat. Im Gegensatz dazu erhöht sich leicht die relative Anzahl von DN und DP CD69<sup>+</sup> Thymozyten im Thymus Gfi-1-defizienter Tiere auf Kosten der CD4 SP. Dies weist auf eine veränderte Linienentscheidung zugunsten der CD8 Reihe hin.

Vergleicht man zusätzlich das CD69 und CD62L Profil von wt und Gfi-1<sup>-/-</sup> DP Thymozyten, so geht daraus hervor, daß deutlich weniger Thymozyten des Knock-out Tieres entsprechende Signale vom TCR erhalten haben. Dies zeigt sich an der im Mittel geringeren CD69 und höheren CD62L Expression auf den DP Zellen der Gfi-1<sup>-/-</sup> (Abb. 24.b und c, graue Linie) Proben im Vergleich zum wt (schwarze Linie).



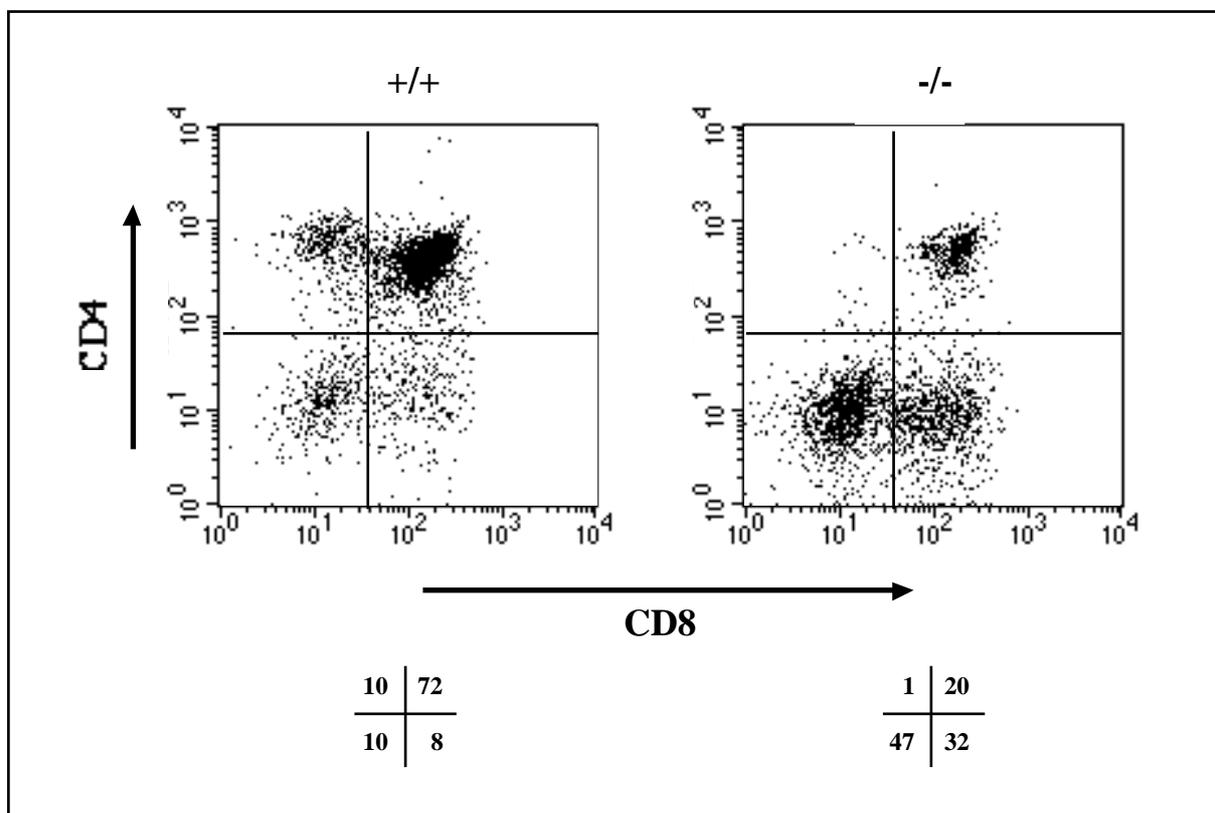
**Abb. 24: Darstellung des Übergangs von DP zu SP Thymozyten**

Thymozytensuspensionen wurden mit Antikörpern gegen CD69 (FITC), CD4 (TriColor) und CD8 (PE) gefärbt. **a:** Nach elektronischer Auswahl der CD69 hochexprimierenden Thymozyten wurde deren CD4/CD8 Profil als Dichtewolke dargestellt. Neben den im Kreuz angegebenen prozentualen Veränderungen zwischen Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymozyten fällt eine allgemeine Verschiebung der CD4/CD8 Expression auf. Während die Hauptpopulation bei der wt Probe das Profil CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> aufweist, verschiebt sich das Bild in dem Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymus mehr zu einer CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> Population hin. **b:** Gleiche Proben wie unter a, nur wurden diesmal die SP und CD4<sup>int</sup>CD8<sup>int</sup> Zellen elektronisch markiert und deren CD69 Expression dargestellt. Die schwarze Kurve repräsentiert die Zellverteilung von wt und die graue von Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymozyten in Verbindung mit der CD69 Expression. Es zeigt sich, daß weniger Zellen bei Gfi-1-defizienten Tieren CD69 hoch exprimieren. **c:** Gleiche Auswahl und Darstellung der Zellen wie unter b, nur Färbung mit anti-CD62L Antikörper im Austausch mit anti-CD69. Hier zeigt sich eine Erhöhung der CD62L Expression bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymozyten im Vergleich zum wt.

### 2.3.6 Veränderungen während der embryonalen Thymusentwicklung

Um eine mögliche Funktion von Gfi-1 während der Embryonalentwicklung des Thymus herauszufinden, wurden sogenannte foetale Thymus Organkulturen (FTOC) angelegt. Dazu wurden Verpaarungen zwischen Gfi-1<sup>+/-</sup> Tieren angesetzt und die Weibchen „Plug-Verpaart“. Am Tag 13 *post coitum* wurden die Thymianlagen aller Embryos isoliert und *in vitro* einzeln auf Polykarbonfiltern kultiviert (5.6.10). Gleichzeitig wurde aus Gewebeproben der Foeten

DNA gewonnen, um den Genotyp zu bestimmen. Nach fünf Tagen hatten sich die Thymi soweit entwickelt, daß sie geerntet und durchflußzytometrisch analysiert werden konnten. Als Ergebnis ist in Abb. 25 die Verteilung der CD4/CD8 Subpopulationen dargestellt. Daraus ergibt sich eine starke Reduktion der CD4 SP Zellen bei gleichzeitiger Zunahme der CD8 SP Thymozyten. Von den 22 untersuchten Thymi entstammten fünf Gfi-1<sup>-/-</sup> Embryos, die alle fünf einheitlich diesen Phänotyp aufwiesen. Damit bestätigt diese Analyse die unter 2.4.4 getroffene Annahme, daß der Verlust von Gfi-1 die Liniendeterminierung CD4 versus CD8 zugunsten der CD8 Zellen verschiebt.



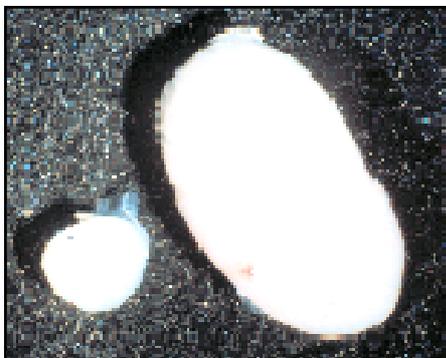
**Abb. 25: Analyse der CD4/CD8 Subpopulationen von foetalen Thymuskulturen (FTOC)**

Aus 13 d alten Mausembryos wurden die Thymianlagen präpariert und für fünf Tage auf Polycarbonfiltern *in vitro* kultiviert. Zur Analyse wurden Einzelzellsuspensionen erstellt und diese mit anti-CD4-PE und anti-CD8-FITC Antikörpern gefärbt. Die Darstellung der vier Subpopulationen von Thymozyten weist einen verringerten prozentualen Anteil von DP Thymozyten zugunsten der DN und CD8 SP Population bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Kulturen auf. Noch ausgeprägter ist die Reduktion der Population CD4 einzelpositiver Zellen bei Gfi-1-Defizienz. Anzahl der untersuchten Foeten: n (+/+) = 4; n (+/-) = 12; n (-/-) = 5.

## 2.4 Einfluß von Gfi-1 auf die Effektorfunktionen reifer, peripherer T-Zellen

### 2.4.1 Lymphadenopathie der zervikalen Lymphknoten bei Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen

Neben der Frage, welche Rolle Gfi-1 bei der Entwicklung von T-Zellen spielt, ließen Expressionsanalysen (Karsunky, 1996) eine weitere Funktion während der Aktivierung nach Antigenkontakt in der Peripherie vermuten. So wird nach Stimulierung der T-Zellen die mRNA sehr rasch aber nur transient induziert, während das Protein aufgrund seiner langen Halbwertszeit innerhalb der ersten 24 h akkumuliert. Auch bei der Untersuchung der sekundären lymphatischen Organe fiel schon makroskopisch die enorme Vergrößerung, insbesondere der zervikalen Lymphknoten auf. Abbildung 26 zeigt die Photographie eines solchen LK aus einer Gfi-1-defizienten Maus im Vergleich zu einem wt Lymphknoten. Diese Vergrößerung war erst bei 4-5 Wochen alten Tieren zu beobachten, stieg mit zunehmenden Alter noch weiter an und war hauptsächlich auf die zervikalen Lymphknoten beschränkt.



**Abb. 26: Vergleich der zervikalen Lymphknoten**

Photographische Aufnahme zweier zervikaler Lymphknoten (LK). Der linke, kleinere LK stammt aus einem wt Tier und der rechte, vergrößerte aus einem Gfi-1-defizienten Tier, beide knapp 6 Wochen alt. Die gezeigte Vergrößerung der Lymphknoten bei Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen war ab der 4.-6. Lebenswoche erkennbar und nahm mit fortschreitendem Alter weiter zu.

Die Analyse der zellulären Zusammensetzung erfolgte wieder über die Durchflußzytometrie und ist in Teilen in Abbildung 27 wiedergegeben. Für die wt Kontrolle ergibt sich dabei, daß die T- zu B-Zellen in einem ungefähren Verhältnis von 60-70 % zu 30-40 % vorliegen, während das Verhältnis der CD4 zu CD8 T-Zellen ca. 2:1 ausmacht. Offensichtlich existiert eine sehr genaue homöostatische Regulation der lymphoiden Populationen, da in gesunden Tieren diese Verhältnisse nur sehr geringen Schwankungen unterliegen. Dagegen sind die

Verhältnisse in den Lymphknoten Gfi-1 defizienter Tiere sehr viel weniger stabil. Bei der Analyse fiel allgemein eine relative Verminderung der T-Zellen im Verhältnis zu B-Zellen auf. Die Werte für die T-Zellen lagen um die 30-40 %, die der B-Zellen zwischen 35-60 % (Abb. 27.b). Damit hatte sich das Verhältnis dieser Populationen zueinander nahezu umgekehrt. Dies war aufgrund der fehlerhaften T-Zellentwicklung im Thymus nicht unerwartet. Legt man jedoch die absoluten Zahlen zugrunde, so waren bei der enormen Vergrößerung der Lymphknoten beide Zellpopulationen stark expandiert. Immerhin erhöhte sich die durchschnittliche Zellzahl eines zervikalen Lymphknoten aus einem sechs Wochen alten Gfi-1-defizienten Tier um den Faktor 5-10 im Vergleich zur wt Kontrolle. Die Veränderungen der relativen Zellzahlen fanden sich aber auch genauso in jüngeren Tieren mit nicht vergrößerten Lymphknoten sowie allen anderen untersuchten Lymphknoten und der Milz wieder.

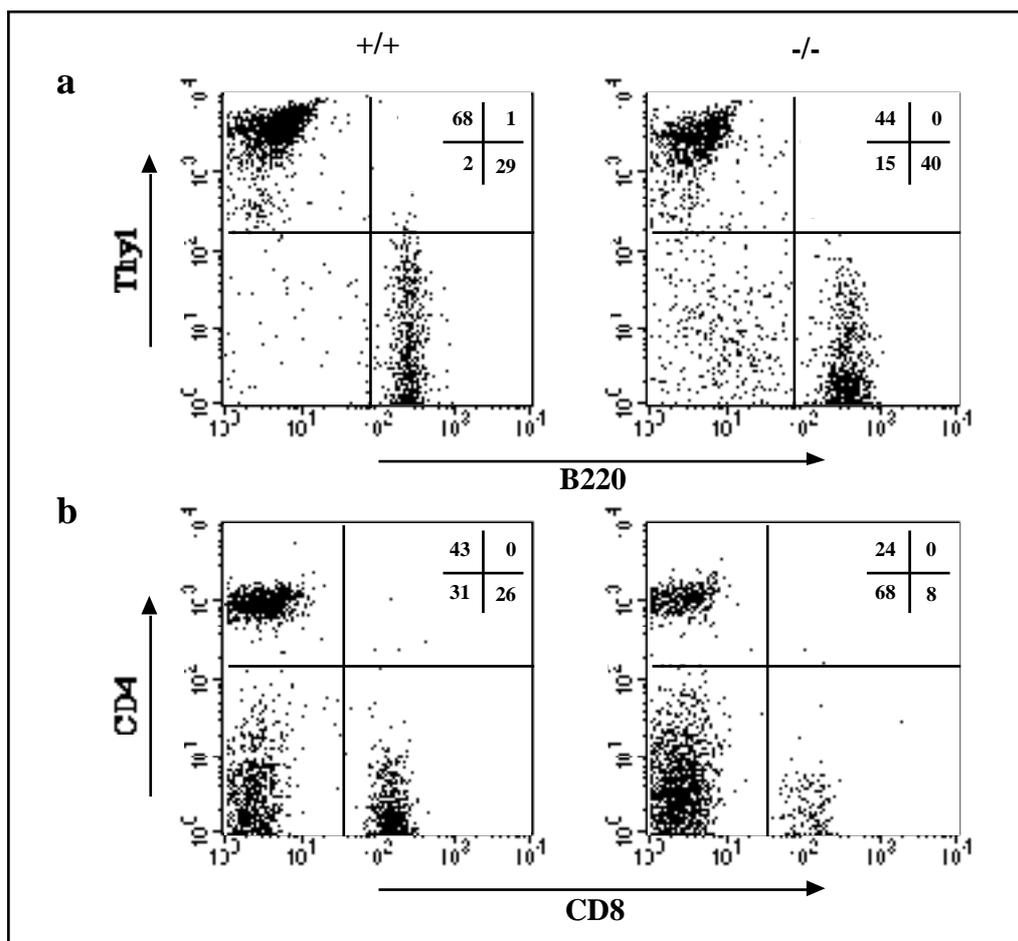


Abb. 27: Darstellung der Lymphozytenpopulationen in den Lymphknoten

Zervikale und/oder mesenteriale Lymphknoten wurden präpariert und Einzelzellsuspensionen hergestellt. **a:** Die Zellen wurden mit anti-B220-FITC und anti-Thy1-PE Antikörpern gefärbt, Lymphozyten nach morphologischen Kriterien ausgewählt und die Expression der Oberflächenproteine B220/Thy1 mittels Durchflußzytometrie dargestellt. B220 (CD45R) gilt als Marker für B-Zellen und Thy1 (CD90) als Marker für T-Zellen. Somit läßt sich das Verhältnis dieser beiden Lymphozytensubpopulationen zueinander bestimmen. Es zeigt sich, daß der

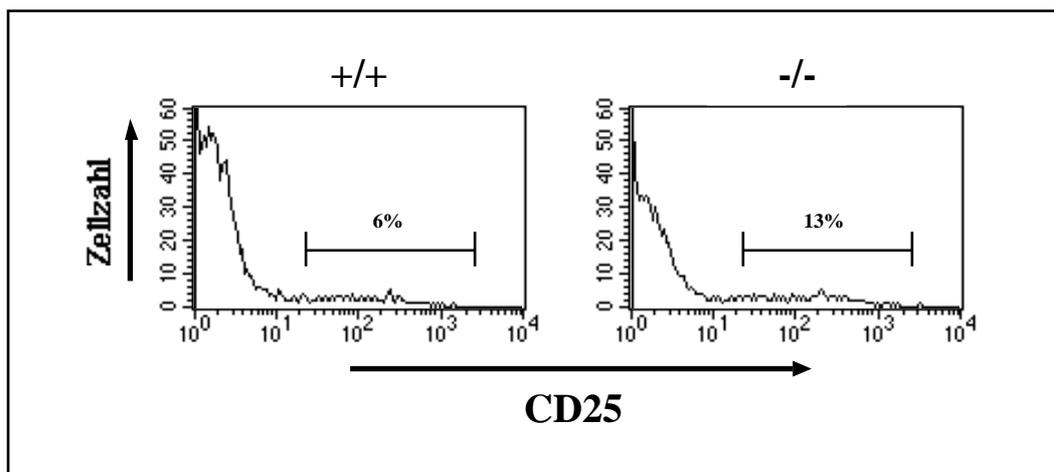
prozentuale Anteil an T-Zellen bei Gfi-1-defizienten Tieren erniedrigt ist, bei gleichzeitiger Zunahme der B-Zellpopulation und einer dritten, weder T- noch B-Zellpopulation. **b:** Differenzierte Analyse der T-Zellpopulation durch Anfärben von Lymphknotenzellen mit fluoreszenzmarkierten anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern. Neben der bereits unter a gezeigten Zunahme des Anteils an nicht T-Zellen läßt sich desweiteren eine relative Verminderung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen ausmachen. Das Verhältnis CD4 zu CD8 positiven Zellen erhöht sich von knapp 1:2 auf 1:3.

Das Verhältnis der CD4<sup>+</sup> Helferzellen zu den CD8<sup>+</sup> zytotoxischen Zellen in den Lymphknoten Gfi-1-defizienter Tiere war weniger stark verändert, jedoch ergab sich statistisch eine relative Verminderung an CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Beispiel siehe Abb. 27.b). Zusätzlich fällt beim Knock-out eine sehr starke, weder T- noch B-Zellpopulation auf. Während im wt Lymphknoten maximal 1-3 % der kernhaltigen Zellen nicht B- oder T-Zellen sind, vergrößert sich diese Population relativ gesehen auf durchschnittlich 20 % und noch sehr viel stärker in absoluten Zahlen. Diesen Zellen konnten keinerlei linienspezifische Marker zugeordnet werden und ihre Herkunft bleibt unklar. Ähnlich den atypischen, monozytären Knochenmarkszellen exprimieren sie sehr hohe Mengen an CD44 und sind deutlich größer als ruhende Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

Überraschend war die Zunahme der B-Zellpopulation, da in diesen bisher keine Gfi-1 Expression nachgewiesen werden konnte. Vielmehr scheint dort das Gen *gfi-1b* dessen Funktion zu übernehmen (Tong *et al.*, 1998; Rödel *et al.*, 1998). Da B220 auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert werden kann, wurde die Einteilung der B220 exprimierenden Zellen als B-Zellen zusätzlich über den B-Zell-spezifischen Marker CD19 überprüft. Allerdings waren alle B220<sup>+</sup> Zellen auch CD19 positiv und trugen membranständiges IgM auf ihrer Oberfläche, ein Kennzeichen ausgereifter B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme eines DNA-Histogramms fixierter, elektronisch markierter B-Zellen über Propidiumiodidfärbung ergab keinen Hinweis auf eine verstärkte Proliferation der B-Zellen. Auch lag keiner der getesteten Aktivierungsmarker (CD69, CD71 und CD95) in seiner Expression verändert vor (Daten nicht gezeigt). Es ist daher davon auszugehen, daß die Akkumulation von B-Zellen in den Lymphknoten Gfi-1-defizienter Tiere eher ein sekundärer Effekt ist, der möglicherweise auf eine veränderte T-Zellpopulation zurückzuführen ist. Somit bleibt festzuhalten, daß die beobachtete Lymphadenopathie auf eine Vergrößerung aller lymphoider Zellpopulationen, einschließlich einer nicht näher charakterisierbaren Population, zurückzuführen ist.

## 2.4.2 Veränderte Eigenschaften peripherer Gfi-1<sup>-/-</sup> T-Zellen

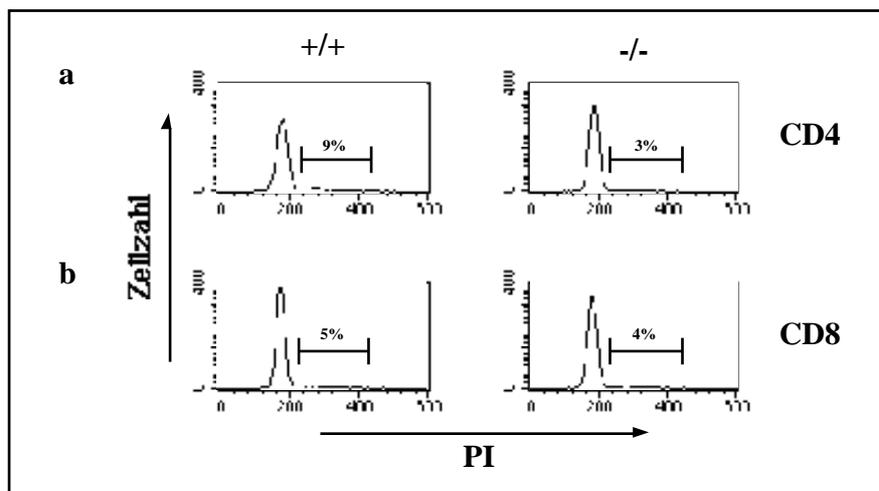
Die Vergrößerung der Lymphknoten verbunden mit einer Akkumulation von Lymphozyten durch Verlust von Gfi-1 ist am ehesten auf veränderte Eigenschaften der T-Zellpopulation zurückzuführen. Lymphknotenschwellungen treten typischerweise als Folge einer Immunantwort transient auf. Eine mögliche Erklärung wäre daher, daß sich die Gfi-1<sup>-/-</sup> Zellen in einem chronisch aktivierten Zustand befinden. Nach Aktivierung durchlaufen T-Zellen eine Vielzahl von phänotypischen Veränderungen, einschließlich Größenzunahme (Blastenbildung) und veränderter Genexpression. Um diese These der Aktivierung zu überprüfen, wurden die T-Zellen auf Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD40L, CD69, CD71 und CD95L hin untersucht. Diese Membranproteine werden nach Stimulierung der T-Zellen innerhalb kürzester Zeit auf der Zelloberfläche exprimiert und zeigen somit den aktivierten Zustand der Zellen an. In Abbildung 28 ist exemplarisch das Bild einer zytometrischen Messung der CD25 Expression in Zusammenhang mit CD3 als T-Zellmarker dargestellt. Für diesen wie für alle weiteren Aktivierungsmarker zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den wt und Gfi-1 Knock-out Proben (siehe auch 2.4.4). Interessanterweise zeichnen sich die T-Zellen der Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse im statistischen Mittel durch ein vergrößertes Zellvolumen aus (Daten nicht gezeigt). Dies ist noch nicht vergleichbar mit dem einer aktivierten Zelle, liegt aber deutlich über der Größe einer normalen, naiven T-Zelle.



**Abb. 28: Analyse der CD25 Expression auf peripheren T-Zellen**

Einzelzellsuspensionen von Lymphknoten aus Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren wurden mit anti-CD3-FITC und anti-CD25-PE Antikörpern gefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Dargestellt ist das CD25 Expressionsprofil elektronisch ausgewählter CD3<sup>+</sup> Zellen. Die Zahlen über den Balken geben den prozentualen Anteil der CD25<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup> Zellen an. Es zeigt sich eine leichte Anhebung der CD25 positiven T-Zellsubpopulation in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren, die aber alleine nicht Ursache für die Lymphadenopathie sein kann.

Als nächstes wurde überprüft, ob vielleicht eine Hyperproliferation der T-Zellen vorlag. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen mit einem FITC-gekoppelten T-Zellmarker (CD4 oder CD8) inkubiert, mit Ethanol fixiert und anschließend Propidiumiodid gefärbt, um über ein DNA-Histogramm die Zellzyklusverteilung abzubilden (Abb. 29). Allerdings befanden sich sowohl im wt wie auch bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen die T-Zellen der Lymphknoten nur zu durchschnittlich 5 % im Zellzyklus. Bei den jeweils vier untersuchten Individuen war tendenziell sogar eher eine Reduzierung der Proliferation um 1-2 % festzustellen.

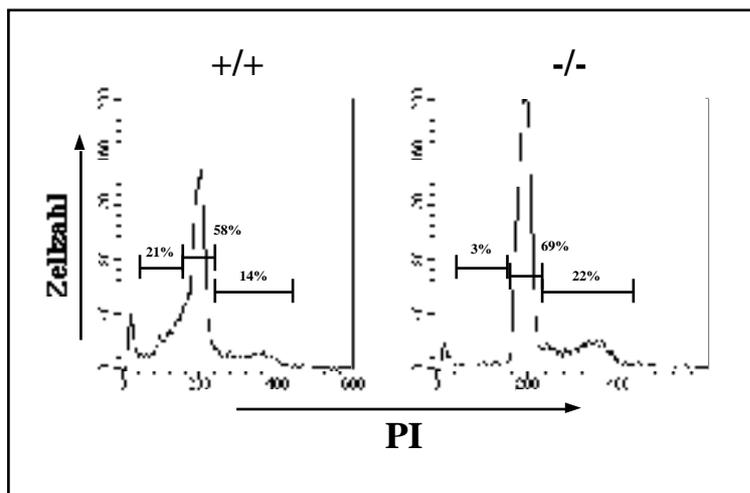


**Abb. 29: Zellzyklusverteilung naiver T-Zellen**

Einzelzellsuspensionen der zervikalen und mesenterialen Lymphknoten wurden mit anti-CD4-FITC oder anti-CD8-FITC Antikörpern inkubiert, anschließend mit Ethanol fixiert und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Nach elektronischer Auswahl der CD4 bzw. der CD8 positiven Zellen zeigt sich in der Darstellung der Zellzyklusverteilung kein signifikanter Unterschied.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit läge in einem veränderten apoptotischen Verhalten der T-Zellen. Klassische Modelle für eine Lymphadenopathie stellen *lpr* und *gld* Mausmutanten dar, bei denen durch Defekte der Fas-induzierten Apoptose sich massiv aktivierte T-Zellen ansammeln (Nagata und Golstein, 1995). Allerdings war weder die Expression des Fas-Rezeptors (CD95) noch die des Fas-Liganden (CD95L; siehe auch 2.4.4) durch den Gfi-1 Verlust reduziert (Daten nicht gezeigt). Im Gegenteil, CD8 positive Subpopulationen der Knock-out Tiere zeichneten sich eher durch eine erhöhte CD95 Expression auf ihrer Oberfläche aus (Daten nicht gezeigt). Neben dem Fas-abhängigen Apoptoseweg wurden die Zellen auch auf ihre spontane Apoptose hin untersucht. Dazu wurden isolierte T-Zellen *in vitro* kultiviert und nach 24, 48 und 72 h der Anteil apoptotischer Zellen durch Messung des „Sub-G1“ Signals nach Propidiumiodidfärbung bestimmt (5.8.3). Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die spontane Apoptose von aktivierten T-Zellen untersucht. Über Anreicherungssäulen

isolierte T-Zellen (5.6.6.2) wurden *in vitro* mit anti-CD3 Antikörper oder SEB stimuliert, nach drei Tagen in frischem Medium ausplattiert und genau wie zuvor bei naiven T-Zellen der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Das DNA Histogramm in Abbildung 30 zeigt exemplarisch das erzielte Ergebnis. Während bei der wt Maus ca. 20 % der aktivierten T-Zellen fragmentierte DNA aufweisen und somit Apoptose durchlaufen, reduziert sich dieser Wert bei T-Zellen aus Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren auf 3 %.



**Abb. 30: DNA-Profil aktivierter T-Zellen**

Über Affinitätssäulen aufgereinigte T-Zellen wurden in Zellkultur ausgesät und mit einer Kombination von Staphylokokkus Enterotoxin A und B (SEA, SEB) stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen gewaschen und in frischem Medium ohne Stimulus für weitere 36 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Darstellung des DNA-Gehaltes der Zellen zeigt insbesondere eine deutliche Verringerung von apoptotischen Zellen, also solchen mit fragmentierter DNA.

Als letztes wurde bei „älteren“ Tieren (6-10 Wochen) die Anzahl an Gedächtniszellen innerhalb der T-Zellpopulation bestimmt. Diese, für die Immunität nach einer erfolgreich abgewehrten Erstinfektion verantwortlichen Zellen, zeichnen sich durch drei Kriterien aus: phänotypisch über das Profil CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup>, Langlebigkeit und erhöhte Zytokinproduktion nach Restimulation. Daher wurde zunächst die Expression von CD62L und CD44 analysiert. Dazu wurden CD4 bzw. CD8 positive Zellen elektronisch ausgewählt und die CD62L Expression gegen die CD44 Expression aufgetragen. Um aktivierte T-Zellen auszuschließen, wurden zudem über das Vorwärtsstreulicht nur kleine Zellen ausgewählt. Das resultierende Bild (Abb. 31) verdeutlicht eine enorme Zunahme insbesondere CD4<sup>+</sup> aber in geringerem Maße auch CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen in den Lymphknoten Gfi-1-defizienter Tiere. Auffällig ist die große Zahl an T-Zellen, die bereits CD44 positiv sind, aber im Gegensatz zu Gedächtniszellen noch nicht die CD62L Expression eingestellt haben. Da ein ähnliches Profil auch aktivierte T-Zellen zeigen, wurden die Zellen zur Kontrolle auf CD69 Expression

überprüft (Daten nicht gezeigt). Diese Kontrolle fiel jedoch wie bereits oben erwähnt stets negativ aus.

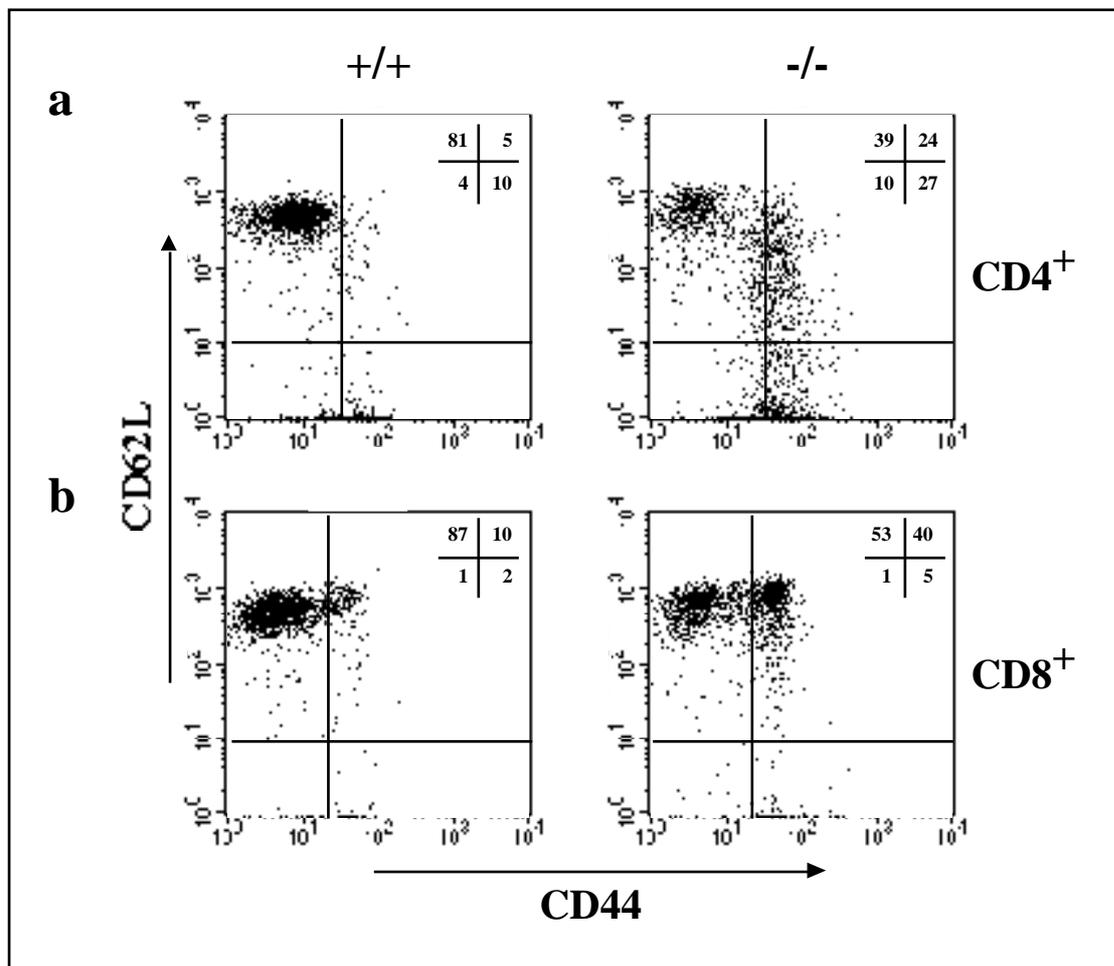


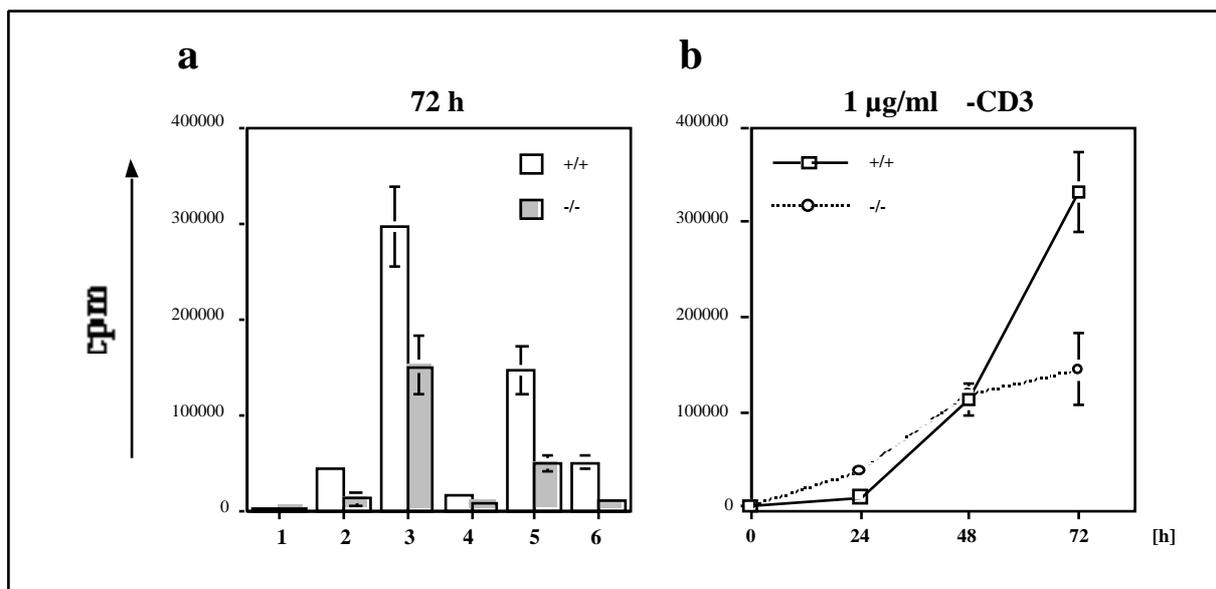
Abb. 31: Darstellung von Gedächtniszellen

Isolierte Zellen aus den Lymphknoten von 10 Wochen alten Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren wurden mit Antikörpern gegen CD44, CD62L und CD4 (a) bzw. CD8 (b) gefärbt. Dargestellt ist das CD44/CD62L Expressionsprofil von CD4 bzw. CD8 positiven T-Zellen. Zuvor wurden über morphologische Kriterien nur kleine und damit nicht aktivierte Lymphozyten elektronisch ausgewählt. Naive, ruhende T-Zellen weisen eine hohe CD62L Expression bei gleichzeitig niedriger CD44 Expression auf, während Gedächtniszellen ein entgegengesetztes Profil zeigen. Die überwiegende Mehrheit der T-Zellen bei der wt Maus sind naive Zellen und lediglich 10 % der CD4<sup>+</sup> bzw. 2 % der CD8<sup>+</sup> zeigen Charakteristika von Gedächtniszellen. Im Gegensatz dazu ist ein erheblich größerer Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen (a) beim Knock-out der Population der Gedächtniszellen zuzuordnen. Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen (b) ist das Bild nicht ganz eindeutig, da zwar ein Großteil der Zellen bereits CD44 verstärkt exprimiert aber die CD62L Expression nicht verringert ist.

#### 2.4.3 Verminderte Proliferation *in vitro* nach Aktivierung Gfi-1-defizienter T-Zellen

Eine der routinemäßig angewandten Methoden zur Bestimmung der Proliferation ist der Einbau von radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-Thymidin in das Genom von T-Zellen während der S-Phase. Dazu wurden affinitätsgereinigte T-Zellen aus der Milz isoliert (5.6.6.2) und 40.000 Zellen pro Vertiefung einer 96 Lochplatte ausgesät. Die Qualität der Aufreinigung wurde stets durch

eine Färbung mit Thy1 und B220 durchflußzytometrisch überprüft und lag durchschnittlich zwischen 80-95 %. Zur Stimulation der T-Zellen wurden verschiedene Konzentrationen anti-CD3 Antikörper, ConcanavalinA, PMA und Staphylokokken Enterotoxin B eingesetzt. Nach 24, 48 und 72 h in Kultur wurde pro Vertiefung 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin zugegeben, die Zellen nach 8-stündiger Inkubation geerntet und der Thymidineinbau als Maß für die Proliferation gemessen (5.6.9). Abbildung 32 zeigt einige dieser Ergebnisse als Einzelwert nach 72 h oder über die Zeit aufgetragen. Es wird ersichtlich, daß die T-Zellen aus den Gfi-1-defizienten Tieren nach Stimulation deutlich schlechter proliferieren als die Zellen der wt Kontrolle. Dieser Effekt scheint unabhängig von der Art des Stimulus zu sein. Es fiel lediglich auf, daß besonders bei hohen Konzentrationen an anti-CD3 Antikörper als Stimulus die Unterschiede geringer wurden (Daten nicht gezeigt).

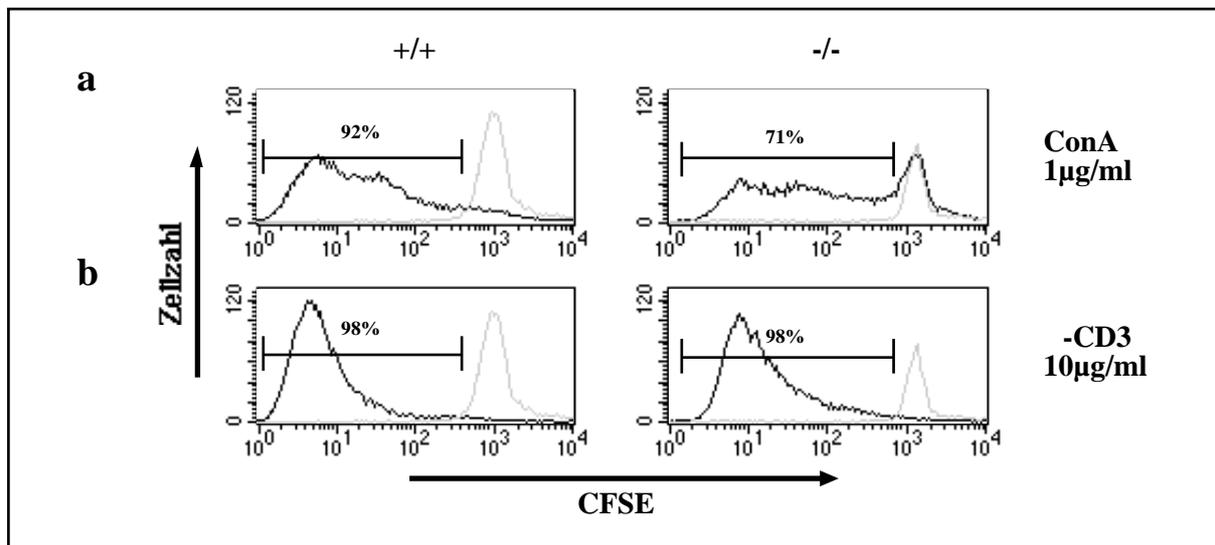


**Abb. 32: Bestimmung der Proliferationsrate durch Thymidineinbau**

T-Zellen der Milz aus Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren wurden über Affinitätssäulen aufgereinigt, mit einer Dichte von 40.000 Zellen / Vertiefung in einer 96-Lochplatte ausgesät und mit verschiedenen Reagenzien stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde für 8 h 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin zugegeben, die Zellen geerntet und der Einbau an radioaktivem Thymidin bestimmt. Angegeben sind immer die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardfehlerabweichung **a**: Vergleich der Thymidininkorporation nach 72 h von wt und Gfi-1-defizienten Mäusen: (1) unstimuliert, (2) 0,1  $\mu\text{g/ml}$  -CD3, (3) 2  $\mu\text{g/ml}$  -CD3, (4) 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ConcanavalinA, (5) 0,1  $\mu\text{g/ml}$  -CD3 + 10 ng/ml IL-2, (6) 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ConcanavalinA + 10 ng/ml IL-2. Es zeigt sich, daß unabhängig von der Art und Konzentration des Stimulus die Proliferationsrate von T-Zellen durch den Gfi-1 Verlust verringert ist. Dieser Effekt kann auch durch die exogene Zugabe von Interleukin-2 nicht aufgehoben werden. **b**: Zeitlicher Verlauf der Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  -CD3 über 72 h. Auch hier zeigt sich eine deutliche Verringerung der Thymidininkorporation beim Gfi-1<sup>-/-</sup> Tier jedoch offensichtlich erst nach längerer Zeit.

Ergänzend zum Thymidineinbau wurde eine CFSE-Färbung durchgeführt, mit deren Hilfe die Anzahl mitotischer Teilungen bestimmt werden kann. Hierzu wurden entweder vollständige

Splenozytensuspensionen oder aufgereinigte T-Zellen für 5 min mit CFSE gefärbt (5.8.5), stimuliert und kultiviert. Dabei halbiert sich die Intensität des eingebauten Farbstoffs bei jeder Mitose um genau die Hälfte. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Thy1 gefärbt, um T-Zellen elektronisch markieren zu können und die CFSE Intensität als Histogramm aufgetragen (Abb. 33.a). Es zeigt sich, daß sich die Gfi-1<sup>-/-</sup> T-Zellen sehr viel schlechter stimulieren lassen, da ein großer Anteil der Zellen über die Ausgangsintensität an CFSE verfügt. Die Zellen, die stimuliert wurden, teilen sich aber in einem vergleichbaren Ausmaß, wie dies bei den wt Zellen der Fall ist. Wird ein stärkerer Stimulus eingesetzt, so schwächen sich auch die Unterschiede zwischen den wt und den Gfi-1-defizienten T-Zellen deutlich ab (Abb. 33.b). Es bestätigen sich somit die Ergebnisse aus den Thymidineinbauten.



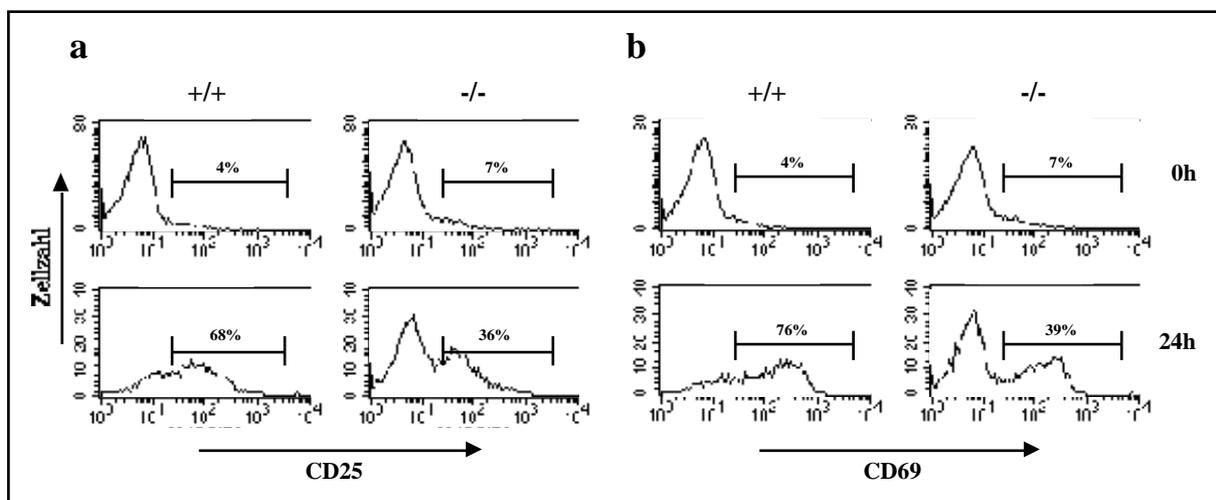
**Abb. 33: Darstellung mitotischer Teilungen durch CFSE-Färbung**

Einzelzellsuspensionen von Milzzellen wurden für fünf min mit CFSE gefärbt und anschließend *in vitro* mit den angegebenen Reagenzien stimuliert. Nach 72 h wurden die Zellen zusätzlich mit anti-Thy1-PE Antikörper gefärbt. Dargestellt ist das Histogramm der CFSE-Intensität von 20.000 Zellen nach elektronischer Auswahl lebender, Thy1<sup>+</sup> Zellen. Zur Kontrolle ist als graue Kurve die Intensität der jeweiligen nicht-stimulierten Zellen eingezeichnet **a**: Es zeigt sich, daß sich bei schwächeren Stimuli ein geringerer Anteil der Gfi-1<sup>-/-</sup> T-Zellen stimulieren läßt im Vergleich zum wt. **b**: Dagegen sind keinerlei Unterschiede zwischen wt und Knock-out nach Stimulation mit 10 µg/ml anti-CD3 Antikörper mehr nachweisbar.

#### 2.4.4 Analyse der Aktivierbarkeit

Um eine Erklärung für die verminderte Proliferation zu finden, wurde die Aktivierbarkeit der T-Zellen *in vitro* getestet. Dazu wurden sowohl isolierte T-Zellen aus der Milz als auch Einzelzellsuspensionen kompletter Lymphknoten mit ConA bzw. anti-CD3 stimuliert und

nach 12-24 h die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 analysiert. Gleichzeitiges Färben mit Antikörpern gegen Thy1 oder CD4/CD8 ermöglichte durch elektronische Auswahl eine differenzierte Darstellung der T-Zellsubpopulationen. Im Teil a der Abbildung 34 findet sich eine repräsentative Analyse der CD25 Expression auf Thy1<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation peripherer T-Zellen mit 1 µg/ml ConcanavalinA (ConA). Es zeigt sich, daß zum Ausgangspunkt der Stimulation ein vergleichbarer Anteil der T-Zellen CD25 exprimiert, sich aber nur halb so viele T-Zellen aus der Gfi-1-defizienten Maus stimulieren lassen wie bei der wt Kontrolle. Da ähnliche Unterschiede für alle Aktivierungsmarker, einschließlich CD69 (siehe Abb. 34.b), gefunden wurde, handelt es sich um eine allgemein reduzierte Aktivierbarkeit der Gfi-1<sup>-/-</sup> T-Zellen. Die differenzierte Analyse von CD4 und CD8 T-Zellen ergab, daß beide Subpopulationen im gleichen Maße hiervon betroffen waren (Daten nicht gezeigt). Auch war der Effekt unabhängig von der Art des Stimulus. Lediglich bei zunehmender Konzentration von anti-CD3 Antikörper wurden die Unterschiede in der Aktivierbarkeit von Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> T-Zellen immer geringer.

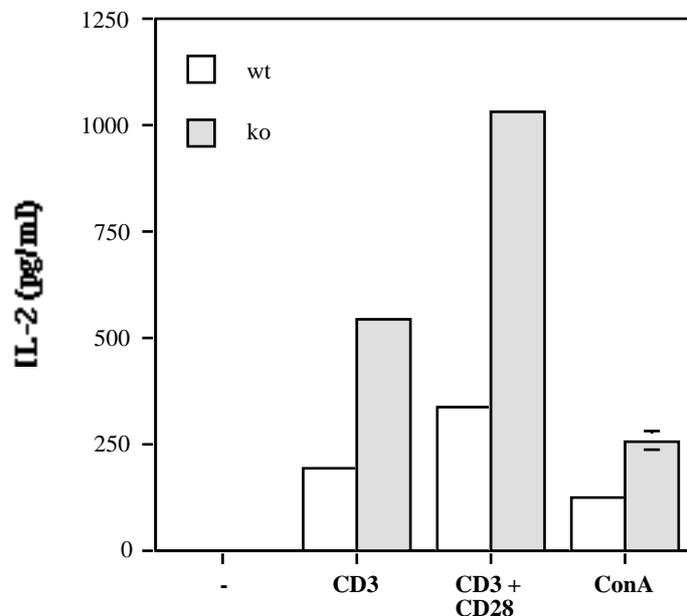


**Abb. 34: Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 nach Stimulation**

Einzelzellensuspensionen der Milz wurden mit 1 µg/ml ConcanavalinA (ConA) stimuliert und die T-Zellen vor und 24 h nach der Stimulation durchflußzytometrisch analysiert. **a:** Darstellung der CD25 Expression von Thy1<sup>+</sup> elektronisch ausgewählten Zellen. Angegeben sind jeweils die prozentualen Anteile CD25<sup>+</sup> Zellen unter den Thy1<sup>+</sup> Zellen. Es zeigt sich eine deutliche Verminderung CD25<sup>+</sup> und damit aktivierter T-Zellen beim Gfi-1 Knock-out im Vergleich zum wt. **b:** Färbung der Zellen mit anti-Thy1 und anti-CD69 Antikörpern und Darstellung der CD69 Expression von Thy1<sup>+</sup> Zellen. Auch hier zeigt sich in einem ähnlichen Ausmaß wie unter a ein verminderter Anteil an CD69<sup>+</sup> T-Zellen bei Gfi-1-defizienten Tieren.

### 2.4.5 Interleukin-2 Produktion

Interleukin-2 ist das entscheidende Zytokin, welches nach Aktivierung von T-Zellen sezerniert wird, auto- oder parakrin auf T-Zellen wirkt und ihre Proliferation aufrechterhält. Daher sollte überprüft werden, ob die Veränderungen in der Proliferationsrate auf eine verminderte IL-2 Produktion zurückzuführen sind. Die sezernierte IL-2 Menge wurde im ELISA-Sandwich Verfahren (5.5.5) aus Zellkulturüberständen bestimmt. Dazu wurden erneut T-Zellen *in vitro* mit ConA oder anti-CD3 stimuliert (5.6.8) und nach 24 h zellfreie Überstände durch Zentrifugation gewonnen. Die Quantifizierung der IL-2 Konzentration erfolgte über eine Verdünnungsreihe mit rekombinantem IL-2. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind anhand eines Beispiels in Abbildung 35 illustriert. Es konnte in drei unabhängigen Experimenten gezeigt werden, daß Zellen aus Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren, unabhängig von Art und Konzentration des Stimulus, stets signifikant mehr IL-2 sezernierten. Damit ist eine mangelnde IL-2 Produktion mit Sicherheit nicht für die schwächere Proliferation verantwortlich. Dies könnte aber ein weiteres Indiz für das verstärkte Vorhandensein von Gedächtniszellen liefern, da diese in der Lage sind, im stärkeren Maße Zytokine, bei CD4 Zellen insbesondere IL-2, zu produzieren.



**Abb. 35: Messung der IL-2 Produktion nach Stimulation**

Isolierte Zellen aus Lymphknoten von Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden *in vitro* mit 1 µg/ml -CD3, 1 µg/ml -CD3 + 1 µg/ml -CD28 oder 2 µg/ml ConA stimuliert und nach 24 h die Konzentration von IL-2 in den Überständen mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. In den Überständen aus nicht stimulierten (-) Zellen konnte in beiden Proben keinerlei IL-2 nachgewiesen werden. Dagegen zeigt sich nach Stimulation eine signifikant höhere IL-2 Produktion bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zur wt Kontrolle. Dieser Effekt ist offensichtlich unabhängig von der Art des Stimulus.

## 3 Diskussion

### 3.1 Bedeutung der Gfi-1-defizienten Mäuse

Die kontrollierte Differenzierung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen zu ausdifferenzierten Zellen, mit hochspezifischen Funktionen, ist ein immerwährender Prozeß, der nicht allein auf die Embryonalentwicklung begrenzt ist. Vielmehr dient er der ständigen Erneuerung aller zellulären Blutbestandteile und damit der Integrität des Organismus. Jedoch müssen die einzelnen Zellpopulationen zueinander in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, d.h. die relativen und absoluten Zahlen sollen möglichst konstant bleiben und gleichzeitig soll auf Veränderungen sofort durch Zu- oder Abnahme von Zellpopulationen reagiert werden können. Bestes Beispiel hierfür ist die Abwehr einer Infektion, bei der es nach Erkennung des Pathogens zu einer massiven Expansion geeigneter Abwehrzellen kommt, diese differenzieren in spezialisierte Effektorzellen, um schließlich, nach Ausführung ihrer Funktion, wieder eliminiert zu werden. Um eine solche Homöostase aufrechtzuerhalten, ist es notwendig, auf zellulärer Ebene eine Vielzahl der unterschiedlichsten Signale zu integrieren. Fehlfunktionen dieser Signalwege haben häufig drastische Konsequenzen und führen zu Erkrankungen wie Leukämien, Immunschwächen oder Autoimmunerkrankungen. Am Ende dieser Signalwege stehen Transkriptionsfaktoren, die über ein verändertes Expressionsmuster letztlich zu einem neuen Phänotyp führen. Einer dieser Transkriptionsfaktoren, denen eine Funktion im hämatopoetischen System, insbesondere in T-Zellen zugeordnet wurde, ist das Zinkfingerprotein Gfi-1. Die vorliegende Arbeit sollte weniger die biochemische Wirkungsweise dieses Proteins klären, als vielmehr dessen Bedeutung für den Prozeß der Hämatopoese aufzeigen und den Fragen nachgehen, wann und bei welchen Entwicklungsschritten es eine Rolle spielt. Dieser Arbeit z.T. vorausgegangene bzw. begleitende Untersuchungen zur Expression von Gfi-1 deuteten auf zwei Funktionen hin: zum einen während der Blutbildung in der foetalen Leber und im Knochenmark sowie während der Entwicklung und Aktivierung von T-Lymphozyten im embryonalen und adulten Thymus und in aktivierten T-Zellen.

Einer der hilfreichsten Ansätze der modernen Molekularbiologie, um Informationen über die Funktion eines Genproduktes *in vivo* zu erlangen, stellt die Generierung sogenannter Null-Mutanten der Maus dar. Durch den gezielten Verlust eines einzelnen Genes in der Keimbahn von Mäusen können resultierende phänotypische Veränderungen allein auf diesen Verlust zurückgeführt werden. Solche Veränderungen erlauben zunächst eine Aussage, in welchen Zellen und zu welchem Zeitpunkt das entsprechende Genprodukt eine Funktion übernimmt. Weiterführend können auf vielfältigen Ebenen Vergleiche zwischen dem gendefizienten und dem wt System durchgeführt werden. Diese können sowohl den gesamten Organismus betreffen als auch isolierte Zellen. Grenzen sind dieser Methode dadurch gesetzt, daß häufig die Defizienz bereits in einem frühen Stadium der Entwicklung für den Organismus letal ist oder die Funktion des Genproduktes durch ein zweites, redundantes Gen abgedeckt wird. Die Wahl der Maus als hochentwickeltes Säugetier ermöglicht zudem nur im begrenzten Umfang erzielte Ergebnisse auf das menschliche System zu extrapolieren. Allerdings gibt es bereits eine Vielzahl von Beispielen, wo genetisch bedingte Erkrankungen des Menschen durch gendefiziente Mausmodelle eine Bestätigung erfuhren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Herstellung einer Gfi-1-defizienten Mauslinie verwirklicht. Dazu wurden wie in 2.1 beschrieben durch homologe Rekombination mit einem Austauschvektor wesentliche Bestandteile des *gfi-1* Gens zerstört und für Gfi-1 heterozygote embryonale Stammzellen gewonnen. Nach Injektion dieser Zellen in Blastozysten und anschließenden Kreuzungsexperimenten konnten schließlich Mäuse generiert werden, die für das mutierte Allel homozygot waren und somit kein *gfi-1* Genprodukt mehr exprimieren konnten. Der Verlust an Gfi-1 wurde auf mRNA- und Proteinebene gezeigt. Da Restsequenzen des *gfi-1* Locus erhalten blieben, wurde die theoretische Möglichkeit der Expression eines aberranten Proteins überprüft. Aber auch mit einem Antikörper, der den durch die verbliebenen Sequenzen kodierten Zinkfingeranteil von Gfi-1 erkennt, waren keinerlei Peptide detektierbar. Da zudem kein ATG als potentielle Startstelle der Translation nach der homologen Rekombination übrig blieb, ist davon auszugehen, daß ein vollständiger Verlust an Gfi-1 erreicht wurde. Bisher gelang nur die Kultivierung eines keimbahnfähigen ES-Klones. Die sonst übliche Bestätigung des Phänotypes durch einen zweiten, unabhängigen Klon entfiel. Dies dient der Absicherung, daß sich nicht zufällig weitere Mutationen sich

während der Kultivierung der ES-Zellen *in vitro* ereignet haben. Größere Mutationen wie chromosomale Aberrationen konnten durch die Anfertigung eines Karyogramms ausgeschlossen werden. Da der beobachtete Phänotyp auch nach mehreren Generationen von Rückkreuzungen in einer Vielzahl von Verpaarungen konstant blieb, können Beteiligungen anderer Chromosomen außer dem mutierten an dem Phänotyp ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Tatsache, daß alle in dieser Arbeit beschriebenen phänotypischen Veränderungen allein in Geweben auftraten, für die zuvor eine Expression von Gfi-1 gezeigt worden war, kann als ein weiteres sehr starkes Indiz für den ursächlichen Zusammenhang zwischen Gfi-1-Defizienz und Phänotyp angesehen werden.

### **3.2 Neue Funktion von Gfi-1 während der Erythropoiese?**

Die dramatischen Auswirkungen, die der Verlust von Gfi-1 auf das Knochenmark hatte, waren zunächst überraschend. Die sehr schwache Gfi-1 Expression war bis dahin allein auf die kleine Population von T-Zellen im Knochenmark zurückgeführt worden. Allerdings spricht die sehr starke Expression in der foetalen Leber, in der nur sehr wenige T-Lymphozyten vorkommen, für eine zusätzliche Funktion von Gfi-1 in anderen Zellen des hämatopoetischen Systems. Mit Ausnahme einer Reihe von myeloiden humanen Leukämien (HL-60, K562) ist bisher keine Expression oder gar Funktion von Gfi-1 in Zellen myeloischer Abstammung beschrieben worden. Eine detaillierte Aufschlüsselung, welche Zellen zu welchem Zeitpunkt ihrer Entwicklung wirklich Gfi-1 exprimieren, steht noch aus. Da viele dieser Zellen nur in geringer Zahl in der Maus vorkommen, war dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Neben der gesicherten Funktion von Gfi-1 in T-Zellen lieferten die Gfi-1-defizienten Mäuse jedoch Hinweise für eine breitere Bedeutung im hämatopoetischen System.

Besonders auffällig war der Einfluß auf die Erythropoiese im Knochenmark. Der Verlust an Gfi-1 führte mit zunehmenden Alter zu einem fast vollständigen Verlust der Erythrozytenbildung im sonst roten Knochenmark. Dies kann mehrere Ursachen haben. Entweder wird Gfi-1 in erythroiden Vorläuferzellen exprimiert und die Gfi-1-Defizienz führt

zu einer veränderten Entwicklung von Erythrozyten oder eine zweite Zellpopulation, die durch den Verlust betroffen ist, wirkt indirekt auf den Vorgang der Erythropoese, z.B. durch Zell-Zellkontakte oder Produktion von Zytokinen. Für die erstere Möglichkeit spricht, daß die Erythrozyten ganz allgemein in ihren Eigenschaften verändert sind. Zwar konnten die klinisch-hämatologischen Untersuchungen keinen Unterschied zu Erythrozyten aus wt Tieren feststellen und auch lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben keinerlei morphologischen Veränderungen. Jedoch wurden die geringeren Vorwärtsstreulicht-Werte in der Durchflußzytometrie kontinuierlich gemessen. Dies betraf sowohl frisch gewonnenes EDTA-Blut als auch Erythrozyten aus Einzelzellsuspensionen der Milz und des Knochenmarks. Da die Zellen nur in isotonischem PBS aufgenommen wurden, erscheint ein Präparationsartefakt eher unwahrscheinlich. Ob mit der geringeren Größe eine Beeinträchtigung der Erythrozytenfunktionen einhergeht, konnte ebenfalls nicht geklärt werden. Die entscheidenden Parameter wie Hämoglobingehalt waren jedenfalls nicht betroffen. Erwähnenswert scheint in diesem Zusammenhang die Klonierung des *gfi-1* Gens aus dem Huhn zu sein (Fuchs *et al.*, 1996), welches starke Homologien zum murinen und humanen Gfi-1 aufweist. Expression des chGfi-1 konnte in allen erythroiden Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in myeloiden und lymphoiden. Da allerdings mittlerweile ein weiteres *gfi-1*-verwandtes Gen, das humane *GFI-1b* kloniert wurde (Rödel *et al.*, 1998), ist nicht klar, ob es sich hierbei wirklich um das homologe Gen zu *gfi-1* oder nur ein verwandtes aus einer größeren Genfamilie handelt.

Gegen einen direkten Einfluß des Gfi-1 Verlustes auf die Erythropoese spricht die Kompensation durch die Milz. Offensichtlich ist in dieser Umgebung eine ausreichende Bildung von Erythrozyten aus Vorläuferzellen möglich. Wahrscheinlich führt die zunehmende Zerstörung des roten Knochenmarks über einen Rückkoppelungsmechanismus zu einer verstärkten Produktion von Erythropoietin (Epo) in den Nieren und unter dessen Einfluß zu der beobachteten Hyperproliferation der roten Pulpa der Milz. Tatsächlich ist die murine Milz in sehr viel stärkerem Ausmaße befähigt an der Blutbildung teilzunehmen, als dies beim Menschen der Fall ist. Zwar entstammen auch bei einem gesunden Tier bis zu 90 % der Erythrozyten aus dem Knochenmark, jedoch kann die Milz die Funktion des Knochenmarks als Ort der Erythropoese innerhalb kürzester Zeit vollständig übernehmen. Ein Unterschied zwischen dem Knochenmark und der Milz der Gfi-1-defizienten Tiere auf zellulärer Ebene ist

eindeutig die beschriebene atypische, monozytäre Population, deren Konzentration im Knochenmark um ein Vielfaches höher ist als in der Milz. Zudem scheint diese Population in der Peripherie neue Eigenschaften zu erhalten, da sich ihr Expressionsprofil von Oberflächenproteinen verändert. Möglicherweise handelt es sich im Knochenmark um eine reine Verdrängung der erythroiden Zellen durch die Mac-1/Gr-1 doppelpositiven Zellen. Schließlich ist das Knochenmark als Zellkompartiment fest umgrenzt und erlaubt im Gegensatz zur Milz keine einfache Ausdehnung. Wahrscheinlicher ist aber der Einfluß von Zytokinen verantwortlich für diese Veränderungen. Erste vorläufige Experimente wiesen eine erhöhte Produktion von Interferon- ( $\text{IFN-}\gamma$ ) und GM-CSF im Knochenmark von Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse hin. Für  $\text{IFN-}\gamma$  ist mehrfach gezeigt worden (Wang *et al.*, 1995; Means *et al.*, 1994), daß es inhibitorisch auf frühe erythroide Vorläuferzellen wirkt. So induziert  $\text{IFN-}\gamma$  die Expression des Fas-Rezeptors (CD95) auf erythroiden Vorläuferzellen und damit direkt die Fas-abhängige Apoptose, da der Fas-Ligand (CD95L) konstitutiv auf den gleichen Zellen exprimiert wird (Dai *et al.*, 1998). Allerdings kann die starke Beeinträchtigung der Erythropoese im Knochenmark Gfi-1-defizienter Mäuse nicht allein auf  $\text{IFN-}\gamma$  zurückgeführt werden, da sich auch in einzelnen Gfi-1<sup>+/-</sup> Tieren vergleichbare Mengen an  $\text{IFN-}\gamma$  Expression fanden. Gleiches gilt für GM-CSF, welches ebenfalls inhibitorisch auf die Erythropoese wirkt, indem es sozusagen mit Epo um einen gemeinsamen erythroiden/myeloiden Vorläufer kompetitiert (Hermine *et al.*, 1992). So wird die *in vitro* beobachtete Hemmung von erythroiden Kolonien aus Stammzellen durch Granulozyten hauptsächlich diesen beiden Zytokinen zugeschrieben. Interessanterweise führt die systemische Applikation von GM-CSF zwar wie erwartet zu einer Reduktion der Erythropoese im Knochenmark und in der Milz und damit zu einer Anämie, jedoch ist diese nur transient, da im Gegensatz zum Knochenmark die Milz nach kürzester Zeit für eine vollständige Kompensation sorgt (de Haan *et al.*, 1992; Barrios *et al.*, 1998). Die Parallelen zu dem hier beschriebenen Phänotyp der Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse sind offensichtlich und stellen eine wertvolle Arbeitshypothese für zukünftige Analysen dar. Außerdem unterstützen einige Makrophagenpopulationen die Erythropoese im Knochenmark durch lösliche Faktoren und Zell-Zellkontakte (Sadahira und Mori, 1999). So könnte es auch durch eine fehlerhafte Differenzierung der Monozyten/Makrophagen im Knochenmark zu einem Mangel an diesen unterstützenden Zellen kommen.

### 3.3 Einfluß auf die Entwicklung myeloischer Zellen im Knochenmark

Die zweite große phänotypische Veränderung im Knochenmark betraf die Akkumulation der Mac-1/Gr-1 doppelt positiven, atypischen Zellen. Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie korrelierten in den relativen Zahlen mit der hämatologischen Einteilung als Pro- bzw. Monozyten, so daß man die beiden Populationen als identisch ansehen kann. Im Gegensatz dazu standen die Untersuchungen des Blutes und der Milz. In diesen Organen konnten die monozytären Zellen nur noch nach morphologischen Kriterien identifiziert werden, aber nicht mehr anhand der Oberflächenmarker Mac-1 und Gr-1. Eine vorläufige zytochemische Untersuchung konnte die Aktivität von unspezifischen Esterasen in den Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen des Knochenmarks nachweisen und bestätigte somit die Einteilung als Monozyten. Gleichzeitig waren diese Zellen negativ für Peroxidase und saure Phosphatasen, die in der Zytochemie als Marker für Granulozyten bzw. Lymphozyten und Makrophagen dienen (Prof. Dr. U. Dührsen, persönliche Mitteilung). Allerdings nahm die Esteraseaktivität in den atypischen, monozytären Zellen aus der Milz von Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren auch ab, aber in ihrer Mehrzahl waren diese Zellen noch positiv. Man kann daher davon ausgehen, daß die Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellpopulation das Knochenmark verläßt, aber nach dem Auswandern neue Eigenschaften erlangt. Gegen die Einteilung der Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen als Monozyten sprechen vor allem die durchflußzytometrischen Analysen. Schon das Profil der hohen Mac-1/Gr-1 Expression läßt eher auf eine Population von neutrophilen Granulozyten schließen. Unreife Monozyten im Knochenmark zeichnen sich durch eine leicht reduzierte Expression von Gr-1 aus, bei gleichbleibend hoher Expression von Mac-1 (Lagasse und Weissman, 1997). Tatsächlich kann diese Population, die ca. 2% der kernhaltigen Zellen im Knochenmarks ausmacht, bei den wt Proben detektiert werden (vergl. Abb. 9.c; linker, oberer Quadrant). Dagegen fehlen diese Zellen fast vollständig bei den Gfi-1-defizienten Tieren. Vielmehr breitet sich hier eine Population der Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen zu kleineren Expressionswerten für Mac-1 aus. Desweiteren ergab die Durchflußzytometrie keine Hinweise für ein verstärktes Auftreten reiferer Monozyten im Knochenmark oder der Milz. Vielmehr fehlte eine Population von reifen, CD16/32 positiven Monozyten im Knochenmark der Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse fast vollständig (Daten nicht gezeigt). Auch die Analyse der Expression von F4/80, einem Marker für murine Monozyten, ergab keine größeren Unterschiede zwischen den wt und den Gfi-1-defizienten

Tieren. Die durchflußzytometrischen Untersuchungen weisen also eher auf einen Differenzierungsblock zuungunsten der Monozyten hin und können den atypischen, monozytären Zellen keine Expression typischer Monozytenmarker zuordnen.

Die Entwicklung und Identifikation dieser neuen Zellpopulation, die mit dem Verlust an Gfi-1 korreliert, bleibt letztlich unklar. Es stellt sich erneut die Frage, ob dies ein direkter Effekt des Gfi-1 Verlustes ist oder von einer zweiten, veränderten Zellpopulation induziert wird. Für die letztere Hypothese gibt es derzeit keine Anhaltspunkte. Neben den Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen lag keine andere Zellpopulation des Knochenmarks, soweit dies untersucht wurde, in ihren Eigenschaften verändert vor. Die massiven Verschiebungen der prozentualen Anteile der einzelnen Populationen ist vor allem auf die Ansammlung der atypischen, monozytären Zellen zurückzuführen. Allerdings konnten viele der selteneren, sehr frühen Vorläuferzellpopulationen nicht näher analysiert werden. Es ist aber unwahrscheinlich, daß diese sehr kleinen Populationen einen solchen indirekten Effekt ausüben können. Auch ein Einfluß der veränderten Erythrozyten ist nicht anzunehmen, allein schon weil diese Veränderung der Akkumulation von Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen zeitlich nachfolgt. Eine direktere Auswirkung des *gfi-1* Genverlustes auf die Entwicklung myeloider Zellen erscheint dagegen sehr viel wahrscheinlicher. Ein erstes Indiz hierfür könnte die bereits oben erwähnte Expression in myeloiden Zelllinien sein. So unterliegt die Gfi-1 Expression z.B. während der induzierten Differenzierung der humanen promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60 zu Makrophagen oder Granulozyten einer Regulation und wird bei der Differenzierung in beide Richtungen reduziert (Karsunky, 1996). Ein weiteres Argument könnte die langsame Akkumulation der atypischen Zellen liefern. Diese sind bereits in der 1. Woche nach der Geburt im Knochenmark nachweisbar, machen aber höchstens 5 % der kerntragenden Zellen aus. Mit zunehmenden Alter vergrößert sich diese Population bis sie nach ca. 4-6 Wochen bis zu 80 % der Zellen im Knochenmark von Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren ausmacht. Dabei wird die Ansammlung der Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen im Gfi-1 Knock-out offensichtlich nicht durch eine erhöhte Proliferationsrate oder veränderter Apoptoseeigenschaften verursacht. Vielmehr deuten die durchflußzytometrischen Analysen auf eine gestörte Differenzierung hin. Diese betrifft bereits die Bildung von Promonozyten schließt aber auch die Granulozytenreihe mit ein. Da die auftretende atypische Zellpopulation Eigenschaften beider Zelltypen, Monozyten

und Granulozyten, in sich vereint und beide einer gemeinsamen Vorläuferpopulation entstammen (vergl. Abb.1), erscheint es nahezuliegen, daß bereits diese frühe Linienentscheidung durch den Gfi-1 Verlust gestört ist. Aus technischen Gründen konnte leider diese gemeinsame Vorläuferpopulation nicht näher analysiert werden. Erneut bieten sich zwei Erklärungsmodelle an. Zum einen könnte der Verlust von Gfi-1 das Gleichgewicht bei der Linienentscheidung Monozyt *versus* Granulozyt in der Weise beeinträchtigen, daß weniger Monozyten gebildet werden. Oder die Gfi-1-Defizienz beeinträchtigt die Differenzierung an einem bestimmten Schritt und es kommt damit zu einer Blockade in der Entwicklung, an der die Zellen auflaufen und akkumulieren. Für beide Hypothesen gibt es derzeit keine experimentellen Grundlagen. Es bleibt aber festzuhalten, daß der Verlust von Gfi-1 zu keinem vollständigen Block eines Entwicklungsschrittes führt, da nach der hämatologischen Analyse alle myeloiden Zellen in der Peripherie als reife Zellen vorkommen. Vielmehr scheint der Ausgang einer oder mehrerer Entscheidungen in der frühen Entwicklung myeloider Zellen durch Gfi-1 in einer Weise beeinflusst zu werden, daß es zu Verschiebungen in den prozentualen und absoluten Zellzahlen der einzelnen Populationen kommt. Weiterhin bleibt zu klären, inwiefern die gebildeten myeloiden Zellen wirklich funktionell sind. Dazu müßten typische Eigenschaften dieser Zellen wie Phagozytose und Migration näher untersucht werden.

Eine letzte, ebenfalls noch nicht experimentell weiter verfolgte Möglichkeit für die Entstehung der beschriebenen Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen wäre, daß es sich um transformierte Zellen, also eine myeloische Leukämie, handelt. Hierfür würde u.a. die Zeitspanne von einigen Wochen sprechen, die verstreicht, bevor diese Zellen das Knochenmark der Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere dominieren. Sicherlich ist diese Theorie schwer mit der nachgewiesenen Rolle von Gfi-1 als Onkoprotein in der T-Zell Lymphomagenese in Einklang zu bringen (Schmidt *et al.*, 1998b). Auch das stets sehr einheitliche Bild der Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> Zellen bei allen durchflußzytometrischen Untersuchungen unterschiedlicher Individuen spricht eher gegen die Ausbildung einer Leukämie.

### 3.4 Vielfältige Störungen der T-Zellentwicklung

Der Schwerpunkt der Analyse der Gfi-1-defizienten Mäuse lag auf der Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus. Die nachgewiesene Expression von Gfi-1 in allen Thymozytenpopulationen sowie der Einfluß auf den Prozeß der  $\alpha$ -Selektion ließen bereits auf eine Funktion von Gfi-1 während der T-Zellentwicklung schließen (Schmidt *et al.*, 1998b). Die Auswirkungen des Gfi-1 Verlustes auf die Entwicklung von T-Zellen wurde schon bei der Präparation der Thymi und der Bestimmung der absoluten Thymozytenzahl deutlich, die im statistischen Mittel fast auf ein Zehntel im Vergleich zu den Gfi-1<sup>+/+</sup> und Gfi-1<sup>+/-</sup> Tieren reduziert war. Allerdings fanden sich z.T. sehr große Schwankungen der absoluten Zellzahlen einzelner Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere. Bei einer ersten phänotypischen Analyse der Thymi über die differenzierte Darstellung der CD4 und CD8 Expression fiel sofort auf, daß sich der Phänotyp der Gfi-1<sup>-/-</sup> Thymi in zwei Gruppen einteilen ließ. Bei ungefähr der Hälfte der untersuchten Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere wurden durchschnittlich 50 Millionen Zellen pro Thymus gezählt. Die Tiere dieser Gruppe (vergl. Abb. 15) zeigten nur geringe Veränderungen in den relativen Anteilen der vier Thymuspopulationen, die sich anhand der CD4/CD8 Expression ergeben. Dagegen fiel die Reduktion der Zellzahl im Thymus bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren der zweiten Gruppe sehr viel dramatischer aus und lag bei Werten zwischen 2-8 Millionen Zellen pro Thymus. Der enorme Verlust an Thymuszellularität war insbesondere auf die Reduktion der DP Thymozyten zurückzuführen. Der relative Anteil dieser Population lag bei den Thymi der zweiten Gruppe nur noch zwischen 8 % bis 25 %. Ob dieser sehr viel ausgeprägtere Phänotyp wirklich durch den Verlust von Gfi-1 verursacht wird, ist nicht geklärt. Die Population der DP Thymozyten ist im Vergleich zu den anderen Zellen des Thymus sehr viel empfindlicher gegenüber einer Vielzahl von apoptotischen Stimuli. Für eine ganze Reihe von Streßfaktoren einschließlich Nahrungsmangel, sowie einer Vielzahl von Infektionen oder allgemeiner Erkrankungen ist gezeigt worden, daß sie zu einer Reduktion von DP Thymozyten führen können (Leite de Moraes *et al.*, 1991; Ayala *et al.*, 1996; Ashwell *et al.*, 2000). Da die Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere eindeutig geschwächt sind und z.T. eine Reduktion des Körpergewichts auf die Hälfte des Gewichts ihrer Geschwister zeigten, kann ein solcher sekundärer Effekt auf die DP Thymozyten nicht ausgeschlossen werden. Zumal die Gfi-1-defizienten Tiere wahrscheinlich stark immunsupprimiert sind und ausnahmslos wenige Wochen nach der Geburt starben (siehe auch

3.6). Allerdings findet sich in der Literatur mit den IL-7R<sup>-/-</sup>-gendifizienten Mäusen auch ein Beispiel mit einem sehr ähnlichen, zweigeteilten Phänotyp, der ursächlich auf den eingebrachten Genverlust zurückgeführt werden konnte (Maraskovsky *et al.*, 1997; Peschon *et al.*, 1994). IL-7R<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen zu ca. 60 % einen sehr stark ausgeprägten Phänotyp mit einer Thymozytenzahl von unter 1% im Vergleich zu wt Tieren und einen nahezu vollständigen Verlust der DP Zellen. Die übrigen 40 % der Tiere hingegen zeigen mit mehreren Millionen Thymozyten und gut 60 % davon DP Zellen einen weniger dramatischen Phänotyp. Offensichtlich gibt es in der T-Zellentwicklung einen kritischen Punkt, bei dem der IL-7R<sup>-/-</sup> Verlust zu zwei verschiedenen Resultaten führen kann. Ähnliches könnte durchaus auch für den Gfi-1 Knock-out gelten, zumal dies nicht die einzigen Parallelen zu den IL-7R<sup>-/-</sup> Tieren darstellen (siehe unten). Außerdem konnte keine Korrelation zwischen dem Gesundheitsstatus oder der Gewichtsreduktion und der Thymozytenzahl bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt werden. Selbst Tiere aus der SPF-Anlage und nicht gewichtsreduzierte Mäuse mit Thymozytenzahlen von weniger als fünf Millionen wurden beobachtet. Da aber trotzdem ein sekundärer Effekt für den ausgeprägteren Phänotyp nicht ausgeschlossen werden kann, beschränkte sich die vorliegende Arbeit in erster Linie auf die Analyse und Beschreibung der Gfi-1-defizienten Mäuse mit dem schwächeren Phänotyp.

Selbst wenn man den weniger dramatischen Phänotyp zugrunde legt, kommt man zu einer Reduktion aller Thymozytenpopulationen in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren. Dies betrifft nicht nur die T-Zellen sondern auch die T-Zellen der  $\gamma\delta$  Reihe sowie die NK T-Zellen des Thymus (siehe 2.3.1). Es ist daher anzunehmen, daß bereits früheste Stadien der T-Zellentwicklung von dem Gfi-1 Verlust betroffen sind. Die frühesten lymphoiden Vorläuferzellen, die im Knochenmark entstehen und anschließend in den Thymus einwandern, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert werden. Es ist daher möglich, daß bereits weniger Zellen den Thymus besiedeln und zur Reduktion der Zellularität beitragen. Allerdings weisen die gezeigten Daten auch auf Störungen nachfolgender Differenzierungsschritte hin. Wie in der Einleitung beschrieben, lassen sich die frühesten T-Zellpopulationen im Thymus über die Oberflächenmarker CD25, CD44 und c-Kit darstellen (siehe Abb. 3). Die unreifen Zellen der DN1 und z.T. auch DN2 Subpopulation besitzen noch die Kapazität andere lymphoide Zellen, einschließlich NK T-Zellen, auszubilden. Die Analyse der DN Populationen von Gfi-

1-defizienten Mäusen zeigte tatsächlich eine Reihe von Veränderungen auf. Als erstes war die Population der DN1 Zellen in ihrem relativen Anteil an den DN Thymozyten in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht. Dies könnte ein Indiz für einen partiellen Entwicklungsblock in diesem Stadium der Entwicklung sein. Noch auffälliger war jedoch das Auftreten einer zusätzlichen Population mit sehr schwacher CD25 Expression (CD25<sup>lo</sup>CD44<sup>+</sup>; vergl. Abb. 19.a). Herkunft und Identität dieser Zellen bleibt unklar. Es ist wahrscheinlich, daß diese Zellen aus den sehr unreifen CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> Zellen hervorgegangen sind. Die Tatsache, daß diese Zellen CD25 exprimieren, legt die Vermutung nahe, daß es sich um T-Zellen handelt, da CD25 in unreifen Lymphozyten als T-Zellmarker angesehen werden kann. Desweiteren erscheint es naheliegend anzunehmen, daß die in Abb. 21 dargestellte Population von TCR-tragenden und CD25 schwach exprimierenden DN Thymozyten (CD25<sup>int</sup>CD44<sup>+</sup>TCR<sup>int</sup>) aus den CD25<sup>lo</sup>CD44<sup>+</sup> Zellen hervorgegangen sind. Ob es sich hierbei um eine aberrante lymphoide Zellpopulation oder einer in wt Tieren sonst nur sehr kleinen Population handelt, konnte nicht geklärt werden. Allerdings sind reife, CD4/CD8 negative und TCR positive T-Zellen beschrieben worden, deren Herkunft und Funktion unbekannt ist (Garcia-Ojeda *et al.*, 1998). Es bleibt weiterhin zu klären, ob die beobachteten CD25<sup>int</sup>CD44<sup>+</sup>TCR<sup>int</sup> Zellen ihre TCR Gene umgruppiert haben und polyklonal sind oder ob sie alle den gleichen TCR tragen. So werden z.B. während der Ontogenese bestimmte TCR bevorzugt exprimiert und auch NK T-Zellen tragen häufig gleiche TCR (Lantz und Bendelac, 1994; Weissman, 1994). Das Auftreten der CD25<sup>lo</sup>CD44<sup>+</sup> Zellen und der wahrscheinlich daraus resultierenden CD25<sup>int</sup>CD44<sup>+</sup>TCR<sup>int</sup> Population, ist aber ein Hinweis, daß eine sehr frühe Linienentscheidung in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren gestört ist.

Um die frühen Stadien der T-Zellentwicklung näher zu charakterisieren, wurde die c-Kit Expression der DN1 und DN2 Zellen als zusätzlicher Marker eingesetzt. Wie in der Einleitung erläutert, findet vor der  $\alpha$ -Selektion bereits eine Expansion c-Kit<sup>+</sup> Zellen statt. Dementsprechend konnte gezeigt werden, daß sich die c-Kit<sup>+</sup> Zellen in wt Mäusen überproportional zur Gesamtheit der Thymozyten im Zellzyklus befinden und damit proliferieren. Im Gegensatz dazu war der Anteil proliferierender c-Kit<sup>+</sup> Zellen in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren deutlich reduziert (s. Abb. 20 c), von knapp 20 % in den wt Proben auf ca. 3 % in den Knock-out Mäusen. Diese Reduktion an proliferierenden frühen Thymozyten ist sicherlich zu einem Teil an der Verminderung der Thymuszellularität beteiligt, zumal eine mangelnde

Expansion der c-Kit<sup>+</sup> Zellen auch die beobachtete Reduktion der NK und T-Zellen erklären würde. Damit ist zum ersten Mal gezeigt, daß Gfi-1 eine Funktion während der sehr frühen T-Zellentwicklung besitzt. Interessant ist in diesem Zusammenhang das Ergebnis, daß der zweite große Expansionsschritt nach der  $\beta$ -Selektion offensichtlich nicht gestört ist (s. Abb 20.b). Gfi-1 transgene Mäuse wiesen eine verminderte Proliferation nach erfolgter  $\beta$ -Selektion und damit weniger L-Zellen bzw. proliferierende Zellen in der DN3 Population auf (Schmidt *et al.*, 1998b). Die Gfi-1-defizienten Tiere zeigen nun in Übereinstimmung mit dem transgenen Modell den reziproken Phänotyp mit einem höheren Anteil an L-Zellen und vermehrter Zahl an proliferierenden Zellen in der DN3 Population. Wie in der Einleitung beschrieben ist die Proliferation der DN3 Zellen abhängig von Signalen des prä-TCR und offensichtlich ist Gfi-1 für die TCR-vermittelte Proliferation nicht entscheidend. Im Gegensatz dazu ist die Proliferation der frühen T-Zellen in DN1, die noch keinen TCR tragen, abhängig von Signalen verschiedener Zytokinrezeptoren. Insbesondere der IL-7R und c-Kit sind hier funktionell von Bedeutung. Da der Verlust von Gfi-1 nicht allgemein mit der Regulation der Proliferation interferiert, sondern spezifisch die sehr frühen Expansionsschritte betrifft, scheint es plausibel anzunehmen, daß Gfi-1 IL-7 oder SCF abhängige Signale beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Gfi-1-Defizienz weder die Expression von c-Kit oder des IL-7R beeinträchtigt wird, noch die Expression der entsprechenden Zytokine SCF und IL-7. Da zudem der Phänotyp der Gfi-1-defizienten Mäuse deutlich schwächer ist, als die in der Literatur beschriebenen gendefizienten Mauslinien, die diese beiden Zytokine betreffen, kann Gfi-1 nur zu einem Teil die IL-7 und SCF abhängigen Signalwege beeinflussen. Für IL-7 ist gezeigt worden, daß es zum einen die Expression von Bcl-2 aufrechterhält und somit die Apoptose verhindert (von Freedon-Jeffry *et al.*, 1997). Die Expressionsanalyse von Bcl-2 und verwandten Genen zeigte allerdings in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren keine veränderte Expression. Gleichzeitig konnte aber eine stark erhöhte Zahl an apoptotischen Thymozyten in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen detektiert werden und erneut schien besonders die Population der frühen c-Kit<sup>+</sup> Zellen hiervon betroffen zu sein. Es ist allerdings nicht klar, ob Gfi-1 wirklich einen Einfluß auf die Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli hat, oder ob die Anhäufung apoptotischer Zellen nur das Resultat eines Blocks in der Entwicklung darstellt. Ein weiteres Signal, das vom IL-7 Rezeptor ausgeht, scheint essentiell für die Entwicklung von T-Zellen zu sein. So zeigen sowohl IL-7, IL-7R und c gendefiziente Mäuse einen vollständigen Verlust von

Zellen im Thymus (Di Santo und Rodewald, 1998). Kreuzungen mit Bcl-2 transgenen Mäusen weisen darauf hin, daß dieses Signal unabhängig von dem Bcl-2 vermittelten pro Überlebenssignal ist (Kondo *et al.*, 1997). Vielmehr wird die Zugänglichkeit des Locus für die TCR-Kette reguliert (Durum *et al.*, 1998) und zwar über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 (Ye *et al.*, 1999). Die vorliegenden Ergebnisse der Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere geben aber keinen Hinweis auf eine spezifisch gestörte Entwicklung der T-Zellen. Schließlich muß noch ein drittes Signal vom IL-7 Rezeptor ausgehen, welches ein proliferatives Signal weiterleitet (Di Santo und Rodewald, 1998). Über welche Signalwege dies vermittelt wird, ist derzeit unklar. Ein Kandidat wäre die Aktivierung von STAT3, die für den IL-7R in der Peripherie gezeigt worden ist. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang Ergebnisse aus biochemischen Untersuchungen, die zeigen, daß Gfi-1 mit STAT3 Signalwegen interagiert (Rödel *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Hier könnte also eine mögliche molekulare Erklärung für die verminderte Proliferation in den Gfi-1-defizienten Mäusen liegen. Es bleibt aber festzuhalten, daß die Ergebnisse der Versuche mit Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren auf eine Funktion von Gfi-1 abwärts der Signaltransduktionsketten von Zytokinrezeptoren schließen lassen.

Ein weitere Störung der T-Zelldifferenzierung in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren scheint beim Übergang der DP Thymozyten zu den SP Thymozyten zu liegen. Schon das Profil der CD4/CD8 Expression zeigte zwei Veränderungen auf. Zum einen war die Population der CD8 SP Thymozyten erhöht, was ein Hinweis auf eine begünstigte CD8 Linienentscheidung sein kann oder auf eine Störung der Entwicklung hin zu CD4 SP T-Zellen. Zweitens fiel in allen analysierten Proben eine DP Population mit leicht erniedrigter CD8 Expression auf (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>int</sup>). Bei dieser Population scheint es sich um selektionierte Zellen zu handeln, die bereits einen reifen TCR auf ihrer Oberfläche tragen, aber gerade die Festlegung auf eine Linie durchlaufen (Sant'Angelo *et al.*, 1998). Sollte es also durch den Verlust an Gfi-1 zu einer Akkumulation dieser Zellen kommen, kann dies auf eine gestörte Linienentscheidung hindeuten. Insbesondere das Ergebnis der FTOC Experimente ließ darauf schließen, daß die Liniendeterminierung in Richtung der CD4 SP T-Zellen gestört ist. An diesem Prozeß sind neben dem TCR auch wieder Signale der Zytokine IL-7 und SCF beteiligt (Akashi *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 1998). Eine Störung der positiven/negativen Selektion und der damit verbundenen Linienentscheidung in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren konnte weiterhin indirekt über

veränderte Expression von CD62L und CD69 gezeigt werden. Beide Marker deuten darauf hin, daß die DP Thymozyten nicht die notwendigen Signale erhalten, um positiv selektioniert zu werden. Näheren Aufschluß, welche Prozesse beim Übergang von DP zu SP Thymozyten gestört sind, könnten dabei Kreuzungen mit TCR-transgenen Mauslinien erbringen.

### **3.5 Auswirkungen der Gfi-1-Defizienz auf periphere T-Zellen**

Da die Entwicklung von T-Zellen im Thymus massiv gestört ist, war die beobachtete Lymphadenopathie der zervikalen Lymphknoten unerwartet. Zwar zeigte sich eine Reduktion der relativen Anteile von T-Zellen, doch waren zumindest bei den älteren Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren die absoluten Zellzahlen an T-Lymphozyten erhöht. Das damit gleichzeitig die absolute Zahl an B-Lymphozyten stieg, obwohl in diesen bisher keine Gfi-1 Expression nachgewiesen werden konnte, ist nicht unerwartet, da die Vermehrung einer Lymphozytenpopulation auch immer das zelluläre Gleichgewicht anderer Immunzellen beeinflusst. Die Tatsache, daß die Lymphadenopathie erst nach einigen Wochen auftrat und fast ausschließlich die zervikalen Lymphknoten betraf, läßt vermuten, daß für die Entwicklung dieses Phänotyps Kontakt mit Antigenen notwendig war. Die zervikalen Lymphknoten gelten aufgrund ihrer Lokalisation in dieser Hinsicht als besonders prädisponiert. Auch das verstärkte Auftreten von Gedächtniszellen bestärkt die Vermutung, daß Antigenkontakt der Akkumulation von Lymphozyten vorausgegangen war. Der Verlust von Gfi-1 scheint also die normalen T-Zell Effektorfunktionen zu beeinflussen und drängt die Zellen verstärkt, Gedächtniszellen auszubilden. Die physiologische Funktion von Gfi-1 während der Aktivierung könnte also darin liegen, diese Differenzierung zu unterdrücken, damit aktivierte T-Zellen zunächst einmal expandieren können. Neben der veränderten Oberflächenexpression von CD44 und CD62L liefert auch die *in vitro* gezeigte verstärkte Produktion von IL-2 ein weiteres Indiz, daß es sich um funktionelle Gedächtniszellen handelt. Ein wesentliches Kriterium von Gedächtniszellen ist die erhöhte Sekretion von Zytokinen nach erneuter Stimulation. Ein weiteres Kriterium wäre die erhöhte Proliferation nach Restimulation gewesen. Die gezeigten Stimulationsexperimente wurden jedoch ausschließlich mit T-Zellen aus der Milz

durchgeführt, in der sich keine erhöhte Population von Gedächtniszellen zeigte. Um eindeutig nachzuweisen, ob die  $CD44^+CD62L^-$  Zellen der Lymphknoten wirklich Gedächtniszellen sind oder eine atypische Zellpopulation, müssten diese aufgereinigt und die Stimulationsexperimente an diesen wiederholt werden. Die gezeigte Lymphadenopathie erinnert zudem an den Phänotyp von Mausmutanten mit Defekten der Fas abhängigen Apoptose. Allerdings war die Expression von Fas-Rezeptor (CD95) und Fas-Ligand (CD95L) in den  $Gfi-1^{-/-}$  Mäusen normal und konnte auch *in vitro* zusätzlich stimuliert werden. Jedoch schließt dies eine Beeinflussung von abwärts des Fas-Rezeptors gelegenen Signalwegen nicht aus.

Eine zweite veränderte Eigenschaft der peripheren T-Zellen war ihre verminderte Aktivierbarkeit. Die Stimulation naiver T-Zellen *in vitro* zeigte eine deutliche Verminderung der Proliferationsrate. Dies konnte insbesondere auf eine verminderte Aktivierbarkeit gegenüber den eingesetzten mitogenen Substanzen zurückgeführt werden. Wurden die T-Zellen aus  $Gfi-1^{-/-}$  Mäusen entsprechend stark stimuliert, waren kaum Unterschiede in der Proliferation meßbar. Gerade die Darstellung der Mitoserate über die CFSE-Färbung aktivierter T-Zellen zeigte, daß trotz  $Gfi-1$  Verlust, die T-Zellen in der gleichen Zeitspanne ebensoviele Teilungen durchführten, wenn der Stimulus nur stark genug war. Für die reduzierte Aktivierbarkeit spricht weiterhin die deutlich verminderte Hochregulation der Expression von frühen Aktivierungsmarkern wie CD25 und CD69. Es ist davon auszugehen, daß die Unterschiede in der Proliferationsrate dadurch zustande kamen, daß einfach weniger T-Zellen aus den  $Gfi-1^{-/-}$  Mäusen stimuliert wurden als beim wt und nicht, daß die Teilungsrate an sich verändert war. Auch dies spricht für eine Funktion von  $Gfi-1$  während der frühen Phase der Aktivierung von T-Zellen.

### 3.6 Das Problem der Letalität

Eine der ungeklärten Fragen ergibt sich aus der beobachteten postnatalen Letalität der Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäuse. Die Störungen der T-Zellentwicklung und die daraus resultierende Immunsuffizienz allein kann hierfür nicht Ursache sein. Dagegen spricht vor allem, daß eine Reihe anderer immunsuprimierter Mausstämme, einschließlich Rag-2<sup>-/-</sup> und E<sup>-/-</sup> Mäuse, unter den gleichen Haltungsbedingungen nicht oder sehr viel später unter völlig anderen Symptomen verstarben. Zumal die erwähnten Mausstämme durch den Verlust aller Lymphozyten bzw. nur der T-Lymphozyten über ein sehr viel schwächeres Immunsystem verfügen, als dies bei den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren der Fall ist. Immerhin kommen in diesen alle bekannten immunkompetenten Populationen in ausreichender Zahl vor. Die verlängerte Lebenserwartung unter SPF Bedingungen zeigt aber auch, daß die Immunsuffizienz zumindest ihren Anteil an der Letalität hat. Durch die fehlerhafte Entwicklung der T-Zellen, vor allem bei den Selektionsprozessen, wäre die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen (AI) naheliegend. Solche Erkrankungen resultieren aus dem fehlgeleiteten Angriff von Immunzellen gegen gesundes, körpereigenes Gewebe. Ziel sind dabei häufig die Nieren, die Haut und Gefäßwände. Histologische Untersuchungen dieser und anderer Gewebe erbrachten jedoch keinerlei Hinweis für pathologische Veränderungen. Ein wesentliches Kennzeichen aller AI-Erkrankungen ist zudem die relativ große Zeitdauer, die bis zur vollen Ausprägung der Krankheit notwendig ist. Da aber die Mehrzahl der Mäuse im Alter von 4-6 Wochen verstarb, sind AI-Erkrankungen als Ursache der Letalität sehr unwahrscheinlich. Dagegen kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß autoreaktive T-Zellen durch mangelhafte negative Selektion oder Anergie gebildet wurden.

Ein zweiter Erklärungsansatz ergibt sich aus der bereits angesprochenen gestörten Erythropoiese im Knochenmark. So könnte es einen kritischen Punkt geben, an dem die Milz den Verlust an gesundem Knochenmark noch nicht vollständig kompensieren kann. Dies mag jedoch nur für die Todesfälle innerhalb der ersten fünf Lebenswochen gelten. Danach zeigte sich die Milz stets enorm vergrößert und sollte die Blutbildung ausreichend übernehmen können. Da viele der Gfi-1<sup>-/-</sup> Tiere relativ plötzlich verstarben, erscheinen auch Infarkte eine mögliche Erklärung zu bieten. Zumal nahezu alle untersuchten zellulären Bestandteile des Blutes in ihren Eigenschaften verändert vorlagen, einschließlich der Erythrozyten. Eine letzte

zu überprüfende Hypothese wäre der Einfluß von Zytokinen. Es ist mehrfach gezeigt worden, daß insbesondere die Zytokine der Entzündungsreaktionen, einschließlich INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-12, bei hohen Serumkonzentrationen einen septischen Schock auslösen können, der zum Tod der Tiere führen kann (Beutler *et al.*, 1985; Ozmen *et al.*, 1994; Dinarello, 1996). Da in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Mäusen sowohl myeloide als auch lymphoide Zellen verändert vorliegen, für die z.T. schon eine erhöhte Zytokinproduktion *in vitro* gezeigt werden konnte, und die potentiell diese Zytokine sezernieren können, erscheint die Theorie des septischen Schocks als nicht unwahrscheinlich.

## 4 Zusammenfassung

Um nähere Einblicke in die Funktion des Zinkfingerproteins Gfi-1 *in vivo* zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Gfi-1-defizientes Mausmodell generiert. Dazu wurden zunächst ES-Zellen mit einem Rekombinationsvektor transfiziert und homolog rekombinante Klone isoliert, die heterozygot für das Gfi-1 Nullallel waren. Durch Injektion dieser Klone in Blastozysten wurden Chimäre erzeugt, die schließlich durch Kreuzung mit wt Tieren heterozygote Gfi-1<sup>+/-</sup> Mäuse hervorbrachten. Diese wurden miteinander verpaart, um Nachkommen zu erhalten, die für das Gfi-1 Nullallel homozygot waren. Anhand von Protein und RNA Analysen konnte bestätigt werden, daß ein vollständiger Verlust an Gfi-1 Protein in diesen Mäusen erzielt wurde. Der Verlust an Gfi-1 hatte dramatische Konsequenzen und führte zu einer 100 %igen Letalität innerhalb der ersten Lebenswochen. Die durchgeführten Untersuchungen der Gfi-1-defizienten Mäuse zeigten Veränderungen im gesamten hämatopoetischen System auf. Mit zunehmendem Alter der Mäuse konnte eine Akkumulation von atypischen, monozytären Gr-1<sup>+</sup>Mac-1<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark beobachtet werden, deren Herkunft und Identität nicht eindeutig geklärt werden konnte. Mit dem Auftreten der Gr-1<sup>+</sup>Mac-1<sup>+</sup> Zellen einher ging eine Reduktion der Erythropoese im Knochenmark. Diese konnte jedoch offensichtlich durch verstärkte Blutbildung in der Milz kompensiert werden. Eine weitere Veränderung in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren betraf die Entwicklung von T-Lymphozyten im Thymus. Es konnte gezeigt werden, daß bereits früheste T-Zellpopulationen von dem Gfi-1 Verlust betroffen waren. Insbesondere die c-Kit positiven Thymozyten zeigten eine verminderte Proliferation und gleichzeitig eine erhöhte Apoptoserate. Dementsprechend lagen alle Thymozytenpopulationen in den Gfi-1<sup>-/-</sup> Tieren reduziert vor. Betroffen waren auch die Populationen der NK und T-Zellen. Eine weitere Störung der Thymozytenentwicklung konnte bei dem Prozeß der positiven/negativen Selektion und der Linienentscheidung CD4 *versus* CD8 gezeigt werden. Neben einer Verschiebung des Verhältnisses von CD4 zu CD8 SP T-Zellen im Thymus konnte indirekt über die Expression von CD69 und CD62L nachgewiesen werden, daß Störungen der positiven Selektion vorliegen. Eine Bestätigung hierfür ergaben Experimente mit foetalen Thymi, die eine reduzierte Entwicklung von CD4 T-Zellen aufzeigten. Trotz massiv gestörter T-Zelldifferenzierung und verminderter Zahl an

Thymozyten, wurde in der Peripherie eine Lymphadenopathie der zervikalen Lymphknoten beobachtet, mit einer Akkumulation aller Lymphozytenpopulationen. Auffällig war ein gehäuftes Auftreten von Gedächtniszellen in den Lymphknoten, das vor allem die CD4<sup>+</sup> T-Zellen betraf. Experimente *in vitro* an isolierten T-Zellen zeigten, daß der Verlust von Gfi-1 zu einer verminderten Aktivierbarkeit der T-Zellen führte und letztlich zu einer reduzierten Proliferationsrate. Hierin dürfte u.a. die beobachtete Immunsuppression der Gfi-1<sup>-/-</sup>Tiere begründet liegen. So konnte mit dem gendefizienten Mausmodell die Bedeutung des Proteins Gfi-1 für die Hämatopoese *in vivo* demonstriert werden.

## 5 Material und Methoden

Die nachfolgenden Arbeitsprotokolle sind, wenn nicht auf andere Literaturquellen verwiesen wurde, im wesentlichen den Methodensammlungen von Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) entnommen.

### 5.1 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

#### 5.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten nichtradioaktiven Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Gibco/BRL, Eggenstein; Merck, Darmstadt; Roche, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg und Sigma, Deisenhofen bezogen.

Alle radioaktiven Chemikalien wurden von der Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.

#### 5.1.2 Häufig verwendete Lösungen

1x PBS	137 mM	NaCl
	2,6 mM	KCl
	6,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,2 einstellen
5x Probenpuffer	20 % (w/v)	Ficoll 400
	100 mM	EDTA
	0,025 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,025 % (w/v)	Xylencyanol
20x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
		pH 7,0 einstellen

TE	10 mM	Tris-HCl, pH 7,9
	1 mM	EDTA

### 5.1.3 Verwendete Größenmarker

DNA-Größenmarker	1 kb DNA- Leitermarker Fa. Genecraft/Münster
Protein-Größenmarker	Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range) Fa. NEB/Schwalbach

### 5.1.4 Verwendete DNA-Sonden

Sonde	Beschreibung/Verwendung	Herkunft/Referenz
gfi-1	2,0 kb HincII murines cDNA Fragment	T. Schmidt, Essen
ko A	0,9 kb Asp718/HindIII genomisches DNA Fragment	T. Schmidt, Essen
bax	0,9 kb EcoRI murines cDNA Fragment	S. Korsmeyer, St. Louis
bcl-2	0,7 kb HindIII/XbaI murines cDNA Fragment	S. Korsmeyer, St. Louis
bcl-x	0,65 kb BamHI murines cDNA Fragment	S. Korsmeyer, St. Louis
gapdh	1,4 kb PstI murines cDNA Fragment	M. Zörnig, Frankfurt

## 5.2 Bakterien

### 5.2.1 Verwendeter Bakterienstamm

**DH5** : *supE44, hsdR17, recA, lacU169, ( 80ac 15), endA1, gyrA96, thi-1, relA1*

Langsam wachsender *recA*<sup>-</sup> Stamm, der sich für die Transformation und die Vermehrung von Plasmiden eignet.

### 5.2.2 Kultivierung von Bakterien

Bakterien wurden in LB-Medium, dem gegebenenfalls Ampicillin als Antibiotikum zugesetzt wurde, bei 37°C kultiviert. Alle LB-Medien wurden autoklaviert und das Antibiotikum nach Abkühlen auf 50 °C zugegeben.

LB-Medium	20 g/l	LB Broth Base (Fa. Sigma) pH 7,2 einstellen
-----------	--------	--

### 5.2.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter DH5<sup>-</sup> Bakterien wurden 300 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 (logarithmische Wachstumsphase) im Schüttler wachsen gelassen. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 4°C und 2.500 Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in jeweils 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und die Sedimente in insgesamt 12 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und vereinigt. Nach einer weiteren Inkubationsperiode von 2 h auf Eis, wurde 4 ml Glycerin hinzugegeben, die Bakteriensuspension zu 400 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 5.2.4 Transformation von Bakterien

Für die Retransformation aufgereinigter Plasmid-DNA wurden 50 µl kompetenter Bakterien (s. 5.3.3) zusammen mit 1µg DNA 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock von 90 sec bei 42°C durchgeführt und der Ansatz erneut 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde 500 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien 1 h bei 37°C inkubiert. Entsprechend des Selektionsmarkers des Plasmids wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

### **5.3 DNA-Techniken**

#### 5.3.1 Präparative Plasmidaufreinigung

Die Präparation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad für die Transfektion der ES-Zellen erfolgte mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits der Fa. Qiagen/Hilden. Dazu wurden 300 ml Bakterienkultur abzentrifugiert und die DNA gemäß des Protokolls des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in TE aufgenommen und deren Konzentration photometrisch bestimmt (s. 5.3.3).

#### 5.3.2 Präparation genomischer DNA

Durch eine Biopsie gewonnene Mausschwanzspitzen oder Zellpellets wurden in 750 µl Lysis-Puffer und 35 µl Proteinase K-Lösung über Nacht bei 56°C inkubiert, feste Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand mit 550 µl 2-Propanol versetzt. Die ausgefällte DNA wurde nach einmaligem Waschen in 70%-igem Alkohol in 100 µl TE gelöst und konnte dann direkt enzymatisch weiterbehandelt werden. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

Lysis-Puffer	100 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	80 mM	EDTA pH 8,0
	0,2 % (w/v)	SDS
Proteinase K-Lsg.	0,1 mg/ml	Proteinase K

### 5.3.3 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Dabei entsprachen:

1 OD <sub>260</sub> = 50 µg/ml	für doppelsträngige DNA
1 OD <sub>260</sub> = 40 µg/ml	für einzelsträngige DNA oder RNA
1 OD <sub>260</sub> = 20 µg/ml	für Oligonukleotide

### 5.3.4 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Zur Auftrennung restriktionsverdauter DNA wurden horizontale 0,8 - 1,6 %ige Agarosegele mit 0,05 µg/ml Ethidiumbromid und mit 1x TAE als Laufpuffer verwendet. Zu den Proben wurde entsprechend ihres Volumens 5x Probenpuffer gegeben und bei 50-120 V elektrophoretisch 1-12 h aufgetrennt. Über das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht direkt sichtbar gemacht und gegebenenfalls dokumentiert werden. Die Auftrennung genomischer DNA erfolgte bei 20 V über Nacht

TAE	40 mM	Tris-Acetat, pH 7,8
	2 mM	EDTA

### 5.3.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Die Behandlung von Plasmid- und genomischer DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers.

### 5.3.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach enzymatischer Modifikation (s. 5.3.5) und elektrophoretischer Auftrennung (s. 5.3.4) wurden entsprechende DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des "QIAEX-Gel Extraktions Kits" (Fa. Qiagen/Hilden) nach den Anleitungen des Herstellers. Die DNA wurde in 50 µl TE resuspendiert und ein Aliquot von 3 µl zur Mengenabschätzung erneut auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

### 5.3.7 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  $^{32}\text{P}$ -dCTP und 5 U Klenow-Fragment eingesetzt, und der Ansatz 20 min bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute freie Nukleotide wurden unter Verwendung des Nucleotide Removal-Kits der Fa. Qiagen/Hilden nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Vor Einsatz der radioaktiv markierten Sonden wurden diese für 5 min bei 95°C denaturiert.

### 5.3.8 „Southern-Blot“ Analyse (Southern, 1975)

Zum Nachweis des Genotyps von Mäusen wurde die aus der Schwanzspitze extrahierte genomische DNA nach Restriktionsverdau (s. 5.4.5) auf einem Agarose-Gel (s. 5.4.4)

elektrophoretisch aufgetrennt und mittels "Schwerkraft-Alkali-Blot" auf Nylon 66-Membran (Fluka) transferiert. Zur kovalenten Bindung der DNA an die Membran wurde diese in einem UV-Stratalinker 2400 (Fa. Stratagene) für 30 sec mit 120 mJ/cm<sup>2</sup> kreuzvernetzt. Nach einstündiger Inkubation in Prähybridisierungslösung bei 68°C wurde die radioaktiv markierte Sonde in Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 68°C weiter inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran mehrfach in 2xSSC / 0,1 % SDS gewaschen und autoradiographisch ausgewertet.

Prähybridisierungspuffer	10 % (v/v)	20xSSC
	1 % (w/v)	SDS
	0,5 % (w/v)	Magermilchpulver
	0,75 mg/ml	Heringssperma-DNA (denaturiert)
Hybridisierungspuffer	10 % (v/v)	20xSSC
	1 % (w/v)	SDS
	0,5 % (w/v)	Magermilchpulver
	0,75 mg/ml	Heringssperma-DNA (denaturiert)
	10 % (w/v)	Dextransulfat

## 5.4 RNA-Techniken

### 5.4.1 Aufreinigung von RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebe erfolgte unter Anwendung des „RNeasy-Kits“ (Fa. Qiagen/Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Nach Aufnahme der Gewebe in Lysis-Puffer wurden diese in 15 ml Rundboden-Röhrchen mit einem Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel) homogenisiert. Die Elution erfolgte nach leichter Modifikation des Protokolls mit 2x 30 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O. Die so gewonnene RNA wurde photometrisch vermessen und bei -80°C zur Lagerung weggefroren.

### 5.4.2 Auftrennung von RNA

Für die elektrophoretische Auftrennung von RNA fanden denaturierende Formaldehydgele Verwendung (Lehrach, 1977). Dazu wurden 1,5 g Agarose mit 120 ml DEPC-behandelten H<sub>2</sub>O in einem Erlenmeyerkolben aufgeköcht und auf 60°C heruntergekühlt. Danach wurden 26 ml 37% Formaldehydlösung sowie 3 ml 50x MOPS Lösung hinzugefügt und das Gel in einen waagerechten Schlitten gegossen. Von der aufzutragenden RNA wurden 6 µg mit dem gleichen Volumenanteil Denaturierungspuffer versetzt und für 15 min bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge 5x Probenpuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 60 V für etwa 10 h in 1x MOPS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt.

Denaturierungspuffer	356 µl 37 % Formaldehyd-Lösung
	124 µl Formamid
	22 µl 50x MOPS
	1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)

50x MOPS	1 M MOPS
	250 mM Natriumacetat
	5 mM EDTA

### 5.4.3 „Northern“-Analyse (Thomas, 1980)

#### 5.4.3.1 Kapillartransfer von RNA

Der Transfer Aufbau erfolgt nach dem „Schwerkraft-Alkali-Blot“ Prinzip. Das Formaldehydgel wurde jedoch zuvor 40 min in 20x SSC äquilibriert und als Transferlösung wurde ebenfalls 20x SSC verwendet. Der Transfer erfolgte ausschließlich auf Hybond N<sup>+</sup> Membranen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Zur kovalenten Bindung der RNA an die Membran wurde diese in einem UV-Stratalinker 2400 (Fa. Stratagene) für 30 sec mit 120 mJ/cm<sup>2</sup> kreuzvernetzt.

#### 5.4.3.2 Hybridisierung von RNA auf Nylonmembranen

Auch bei der Hybridisierung wurde analog der DNA-Hybridisierung verfahren (s. 5.3.8). Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde die gleiche Lösung benutzt und alle Inkubationsschritte fanden bei 65°C statt.

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

### 5.5 Protein-Techniken

#### 5.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältliches Farbreagenz (Bradford-Reagenz, Biorad/München) benutzt. 2 µl der jeweiligen Probe wurden mit 800 µl Wasser und 200 µl Farbreagenz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Aus einem Leerwert und einer Messreihe aus BSA-Standards (1 mg/ml) wurde eine Standardkurve erstellt. Die Auswertung erfolgte mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von  $n = 595$ .

#### 5.5.2 Elektrophoretische 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 200 µl Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol

abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel aufgetragen und der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit einem Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA für 2-3 h in 1x SDS-Laufpuffer.

10 % APS-Lösung	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 8,8 SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS
10x SDS-Laufpuffer	52 mM 53 mM 0,1 % (w/v)	Tris-Base Glycin SDS
2x SDS-Probenpuffer	100 mM 3 % (w/v) 15 % (v/v) 100 mM 0,025 % (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin DTT Bromphenolblau
12,5 % Trenngel	4,25 ml 5,4 ml 7,1 ml 150 µl 8,5 µl	Trenngelpuffer H <sub>2</sub> O 30 % PAA-Lösung 10 % APS-Lösung TEMED
4 % Sammelgel	2,25 ml 5,3 ml 1,2 ml 200 µl 15 µl	Sammelgelpuffer H <sub>2</sub> O 30 % PAA-Lösung 10 % APS-Lösung TEMED

### 5.5.3 „Immunoblot“-Analyse

#### 5.5.3.1 Protein Transfer

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 3M-Papiere mit Anodenpuffer 1 angefeuchtet, 4 Whatman 3M-Papiere mit Anodenpuffer 2 angefeuchtet, eine Nitrozellulosemembran C<sup>+</sup> (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) ebenfalls mit Anodenpuffer 2 angefeuchtet, das Proteingel und abschließend 5 Whatman 3M-Papiere mit Kathodenpuffer angefeuchtet. Der Transfer fand für 2 h bei 1,5 mA/cm Membran statt. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran kurz mit Ponceau-Rot angefärbt und mit PBS wieder entfärbt.

Anodenpuffer 1	25 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl Methanol pH-Wert auf 10,4 einstellen
Anodenpuffer 2	300 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl Methanol pH-Wert auf 10,4 einstellen
Kathodenpuffer	25 mM 40 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl 6-Aminohexansäure Methanol pH-Wert auf 9,4 einstellen

#### 5.5.3.2 Immunologischer Nachweis

Vor Zugabe des 1. Antikörpers wurde zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen die Membran zunächst für 30 min in Blotto geschwenkt. Anschließend wurde der 1. Antikörper 1:2000 in Blotto verdünnt zugegeben und über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/0,1 % Tween20 wurde die Membran für 2 h bei RT mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten 2. Antikörper (1:5000; Fa. Dianova)

inkubiert. Der Blot wurde nach wiederholtem Waschen mit PBS/0,1 % Tween20 in eine ECL Entwickler-Lösung (Fa. Amersham) gelegt und anschließend luminographisch ausgewertet .

Blotto	100 ml	1xPBS
	5 g	Magermilchpulver
	100 µl	Tween20

verwendete Antikörper:

Gfi-1	polyklonales Ziegen Serum (IgG) gegen murines Gfi-1 Protein	M-19, # sc-6357 Fa. Santa Cruz
Anti-Ziege-HRP	Peroxidase - gekoppelter Sekundär- Antikörper gegen Ziegen Antikörper des Typs IgG und IgM	# 112-035-068 Fa. Dianova

#### 5.5.4 Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten

Zur Isolierung von gesamtzellulären Proteinen wurden tiefgefrorene Thymi oder frisch isolierte Einzelzellsuspensionen aus Thymozyten einmal mit PBS gewaschen, in einem entsprechenden Volumen WCE-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorffzentrifuge, 10 Min., 14000 Upm, 4°C). Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden nach einer Proteinbestimmung (s. 5.5.1) bei -70°C gelagert.

WCE-Puffer:	50 mM	HEPES, pH 7,8
	450 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	1 mM	Na-Ortho-Vanadat
	20 mM	NaF
	25 % (v/v)	Glyzerin
	50 µg/ml	Aprotinin
	50 µg/ml	Leupeptin
	1 mM	DTT
	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
	1 % (v/v)	NP 40

### 5.5.5 Sandwich-ELISA zur Detektion von Interleukin-2

Die Quantifizierung von Interleukin-2 Protein in Überständen aktivierter Lymphozytenkulturen erfolgte unter Anwendung des „OptEIA Mouse IL-2 Set“ der Fa. Pharmingen nach Anleitung des Herstellers. Die Überstände von mehreren Experimenten wurden zunächst gesammelt und bei -80°C gelagert. Vor Bestimmung der IL-2 Konzentration wurden die Überstände 1:5 mit PBS / 10% FBS verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Eichkurve mittels rekombinanten, murinen IL-2. Alle Schritte fanden in MaxiSorb 96-Lochplatten der Fa. Nunc statt. Als Substrat für die Entwicklung wurden 100 µl 1 mg/µl O-phenyldiamin (OPD) und 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Fa. Sigma) in Substratpuffer pro Vertiefung hinzugegeben und die Reaktion nach 15-20 min durch Zugabe von 50 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung abgestoppt. Abschließend wurde die Absorption bei 490 nm unter Zuhilfenahme eines Microplate Reader 550 (Fa. Biorad) bestimmt. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung.

Substratpuffer	7,3 g	Zitronensäure
	11,87 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		ad 1l H <sub>2</sub> O und pH auf 5,0 einstellen

## **5.6 Zellkultur-Techniken**

### 5.6.1 Medien und Lösungen

anti-CD3	100 mg/ml (Klon 2C11; Fa. Pharmingen)
anti-CD28	100 mg/ml (Klon 37.51; Fa. Pharmingen)
2-Mercaptoethanol	10 mM (Fa. Gibco)
Colcemid	1 mg/ml in PBS (Fa. Gibco)
Concanavalin A	1 mg/ml PBS (Fa. Sigma)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium mit 4,5 % (w/v) Glucose; pH 7,0 (Fa. Gibco)

ESGRO®-LIF	10 <sup>7</sup> Units/ml
FBS	Fötale Rinderserum (Fa. Gibco)
G418	100 mg/ml PBS (Fa. Gibco)
Ganciclovir (Cymeven)	400 mM in PBS (Fa. Syntex, Roche)
Gentamicin	10 mg/ml H <sub>2</sub> O (Fa. Gibco)
Interleukin-2 (recombinant)	100 µg/ml PBS / 0,1 % FBS (Fa. Sigma)
L-Glutamin	200 mM L-Glutamin in PBS (Fa. Gibco)
Medium-199	(Fa. Gibco)
Mitomycin C	1 mg/ml PBS (Fa. Sigma)
Na-Pyruvat	100 mM (Fa. Gibco)
nicht-essentielle Aminosäuren	100x in PBS (Fa. Gibco)
Penicillin/Streptomycin	10.000 U Penicillin / 10.000 U Streptomycin (Fa. Gibco)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium; pH 7,0 (Fa. Gibco)
Trypsin/EDTA	1x Trypsin/EDTA (Fa. ICN)
Staphylokokkus Enterotoxin A	100 µg/ml PBS (Fa. Sigma)
Staphylokokkus Enterotoxin B	100 µg/ml PBS (Fa. Sigma)

### 5.6.2 Kultur von ES-Zellen

Zur Herstellung heterozygoter Gfi-1 Nullallel ES-Zellen wurde die Linie R1 verwendet, die von A. Nagy (Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Kultivierung erfolgte in Cytoperm Brutschränken (Fa. Heraeus) bei 6,5 % CO<sub>2</sub>-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 min auf MEF-Zellen-freie Kulturschalen inkubiert und anschließend der Überstand mit den ES-Zellen abgenommen, um die MEF-Zellen abzutrennen.

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

### 5.6.3 Transfektion und Selektion von ES-Zellen

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden  $7,5 \times 10^6$  R1 ES-Zellen in 750  $\mu$ l PBS aufgenommen und 40  $\mu$ g linearisierte Vektor-DNA in 50  $\mu$ l PBS hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen Stromstoß von 250 V und 500  $\mu$ F 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 h nach der Elektroporation wurde das Medium gegen Selektionsmedium mit 250  $\mu$ g/ml G418 und 2  $\mu$ M 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 gelantinierte 24-Lochplatte aufgeteilt. Die 48-Lochplatte wurde nach zwei weiteren Tagen Kultur und Zugabe von 100  $\mu$ l Einfriermedium pro Vertiefung bei -80°C weggefroren (s. 5.7.4). 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.

#### 5.6.4 Herstellung von embryonalen Mausfibroblasten (MEF)

Trächtige C57/Bl6 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 min 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  $5 \times 10^6$  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 h mit Mitomycin C (0,01 mg/ml) behandelt, abtrypsiniert und auf entsprechende 90 mm Kulturschalen bzw. 96- und 24-Lochplatten ausplattiert.

#### 5.6.5 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.

#### 5.6.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zelllinien wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 U/min pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfriereröhrchen (Fa. Nunc) transferiert und in Qualifreezer Cyroiefrierbehälter (Fa. Nunc) bei -80°C weggefroren. Nach 24 h 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 abgetrennt und die Zellen in frischem Medium aufgenommen.

Einfriermedium	50 %	vollständiges Medium
	40 %	FBS
	10 %	DMSO

### 5.6.7 Isolation von T-Lymphozyten aus Organen

#### 5.7.7.1 Herstellen einer Einzelzellsuspension

Bei den Versuchen mit primären T-Zellen war es notwendig, zunächst die Zellen in Suspension zu bringen. Dazu wurden die entsprechenden Organe den Mäusen entnommen und zwischen zwei geschliffenen Objektträgern in kaltem PBS/1% FBS zerrieben. Zur Abtrennung von Organresten wurden die Zellen 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).

#### 5.6.7.2 Erythrozytenlyse

Vor der weiteren Aufreinigung von T-Zellen besonders aus der Milz 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 min 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.

### 5.6.7.3 Aufreinigung von peripheren T-Lymphozyten

Die Aufreinigung peripherer T-Zellen aus der Milz erfolgte über „Mouse T Cell Enrichment Columns“ der Fa. R&D Systems nach dem Protokoll des Herstellers. Diese Säulen basieren auf dem Prinzip der Negativselektion und sind mit Antikörpern gegen Oberflächenproteine aller kerntragenden Blutzellen mit Ausnahme von T-Zellen beladen. Die Qualität der Aufreinigung wurde stets mittels Durchflußzytometrie überprüft und lag durchschnittlich bei einer T-Zell Anreicherung von 80 % und 90 %.

### 5.6.8 Kultivierung von murinen Lymphozyten

Die Kultivierung primärer Lymphozytenkulturen erfolgte in Cytoperm Brutschränken (Fa. Heraeus) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre in sog. MTC-Medium. Alle Stimulationsexperimente mit Ausnahme der Thymidininkorporation wurden mit einer Zelldichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml MTC-Medium durchgeführt.

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

### 5.6.9 Mitogene Substanzen

Für die Stimulation von T-Zellen *in vitro* wurden die mitogenen Substanzen anti-CD3 Antikörper, anti-CD28-Antikörper, Concanavalin A, Staphylokokken Enterotoxin A und B 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 h bei 37°C inkubiert. Die im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die Endkonzentration des Mitogens.

#### 5.6.10 Bestimmung der Proliferationsrate durch Thymidineinbau

Zur Vorbereitung des Versuches wurden 96-Lochplatten mit verschiedenen mitogenen Substanzen beschichtet (s. 5.6.9). Alle Versuche fanden mit aufgereinigten T-Zellen der Milz (s. Kapitel 5.6.7) in Dreifachbestimmung statt. Die T-Zellen wurden mit einer Konzentration von 40.000 Zellen / 180 µl MTC-Medium und Vertiefung ausplattiert. 8 h vor den angegebenen Zeitpunkten wurde 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin pro Vertiefung in 10 µl MTC-Medium hinzugegeben, diese für 8 h inkubiert und die Zellen mit einem Cell Harvester (Fa. Wallac) geerntet, wobei die DNA der Zellen mit dem eingebauten radioaktivem <sup>3</sup>H-Thymidin auf Filterpapier immobilisiert wurde. Diese Filter wurden getrocknet und zusammen mit 10 ml Beta Plate Scint Szintillationsflüssigkeit (Fa. Wallac) in Plastikfolie eingeschweißt. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Ereignisse pro Minute mit Hilfe eines <sup>3</sup>H-Plate Reader Szintillationszähler (Fa. Wallac).

#### 5.6.11 FTOC

Trächtige Mäuse aus Gfi-1<sup>+/-</sup> Verpaarungen wurden am Tag 13 *post coitum* getötet, die Embryonen isoliert und deren Thymusanlagen präpariert. Zuvor wurden Isopore Membran Filter (0,8 µm ATTP; Fa. Millipore) für 1 h auf der Oberfläche des FTOC-Mediums präinkubiert und anschließend die Thymi auf diese Filter gesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 5 % CO<sub>2</sub> und alle zwei Tage wurden die Filter samt Thymi auf die Oberfläche von frischem Medium gesetzt.

FTOC-Medium	95 % (v/v)	Medium-199
	5 % (v/v)	FBS
	1000 U	Penicillin / Streptomycin

## 5.7 Zellbiologische Arbeitsmethoden

### 5.7.1 Metaphaseplatten von ES-Zellen

ES-Zellen wurden zur Metaphasenarretierung mit 5 µg/ml Colcemid für 4 h kultiviert. Danach wurden die Zellen geerntet und in 10 ml 37°C-warmer 0,56 % (w/v) KCL-Lösung resuspendiert und 15 min quellen gelassen. Zur Fixierung wurde die Zellsuspension abzentrifugiert ( 10 min bei 900 rpm) und die Zellen in 10 ml eiskaltem Fixativ resuspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in einem kleineren Volumen Fixativ (ca. 200 µl) resuspendiert und die Zellsuspension auf Objektträger aufgetropft. Diese wurden für 24 h an der Luft getrocknet, bevor sie mit frisch angesetzter Giemsalösung für 5 min gefärbt wurden. Abschließend erfolgten zwei Waschschrte mit H<sub>2</sub>O, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch das Auszählen von mindestens 50 Karyogrammen.

Fixativ	75 % (v/v)	Methanol
	25 % (v/v)	Eisessig
Giemsalösung	4 ml	KaryoMax-Lösung (Fa. Gibco)
	60 ml	H <sub>2</sub> O dest.

### 5.7.2 Färbung nach Grünwald-Pappenheim

Zur Vorbereitung der Färbung von Suspensionszellen aus Knochenmark und Milz wurden die Zellen auf eine Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen / ml PBS / 5 % FBS eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge (Fa. Shandon Southern) wurden 100 µl dieser Zellsuspension bei 700 rpm und 5 minütiger Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht und für mindestens 2 h an der Luft getrocknet. Für Blutausrtriche wurde EDTA-Blut durch Herzpunktion mittels Monovetten (Fa. Sarstedt) gewonnen und ca. 20 µl pro Objektträger ausgestrichen. Anschließend wurden die Präparate für mehrere Stunden an der Luft getrocknet. Die Färbung und Fixierung erfolgte in einem Schritt durch Überschichten der Objektträger mit May-

Grünwaldlösung (Fa. Sigma) für 3 min, nachfolgend Zugabe der gleichen Menge an H<sub>2</sub>O und Inkubation für eine weitere Minute. Danach wurde die Lösung abgegossen und die Objektträger für 15 min in Giemsa-Lösung (s. 5.7.1) inkubiert. Nach Abspülen überschüssiger Färbelösung mit Wasser und Lufttrocknung, wurden die Präparate lichtmikroskopisch ausgewertet.

## 5.8 Durchflußzytometrie

### 5.8.1 Verwendete Antikörper

Die in der Durchflußzytometrie eingesetzten Antikörper wurden von den Firmen Immunotech (Krefeld), Medac (Wedel) und Pharmingen/BD (Hamburg) bezogen.

Bezeichnung	Markierung	Subtyp
CD3	FITC, TriColor	Hamster IgG
CD4	FITC, PE, TriColor	Ratte IgG2a
CD8	FITC, PE, TriColor	Ratte IgG2a
CD11c	FITC	Hamster IgG1
CD16/32	Biotin-konjugiert	Maus IgG2a
CD19	PE	Ratte IgG2a
CD25 (IL-2R )	PE	Ratte IgG1
CD40L	PE	Hamster IgG
CD44	FITC	Ratte IgG2b
CD45R (B220)	FITC	Ratte IgG2a
CD62L	PE	Ratte IgG2a
CD90 (Thy1.2)	PE	Maus IgG2b
CD95 (Fas)	FITC	Hamster IgG

CD95L (FasL)	Biotin-konjugiert	Maus IgG2b
CD117 (c-Kit)	PE	Ratte IgG2b
F4/80	PE	Ratte IgG2b
Gr-1	FITC	Ratte IgG2b
Mac-1	PE	Ratte IgG2b
Pan-NK (Dx5)	Biotin-konjugiert	Ratte IgM
TCR /	FITC	Hamster IgG
TCR /	PE	Hamster IgG
TER-119	Biotin-konjugiert	Ratte IgG2b
V 8	PE	Ratte IgG2a
V 4	PE	Ratte IgG2a
V 7	PE	Ratte IgG2b
V 8.2/8.3	PE	Maus IgG2a
V 10b	PE	Ratte IgG2b
V 11	PE	Ratte IgG2b
V 12b	PE	Ratte IgG2a

Als Sekundärkonjugat zu Detektion Biotin-konjugierter Antikörper wurden Streptavidin-PE Konjugate eingesetzt (Fa. Pharmingen/BD)

### 5.8.2 Darstellung von Oberflächenmarkern

Für die Analyse von Oberflächenproteinen auf Leukozyten mittels Durchflußzytometer wurden Einzelzellsuspensionen wie unter 5.6.6.1 beschrieben hergestellt und  $1 \times 10^6$  Zellen in 300  $\mu$ l PBS / 2% FBS aufgenommen und in 5 ml Polysteren Rundbodenröhrchen überführt. Entsprechende Mengen an Fluorochrom- oder Biotin-gekoppelter Antikörper (je nach Hersteller 1-5  $\mu$ l Antikörperlösung) wurden hinzugegeben und die Ansätze für 30 min 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 erfolgte unter Verwendung eines FACScan Calibur oder FACScan Advantage (beide 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.

### 5.8.3 DNA-Färbung mittels Propidiumiodid

Zur Darstellung der verschiedenen Zellzyklusphasen oder apoptotischer Zellen wurden mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen mit Ethanol fixiert und für 30 min inkubiert oder bis zu mehreren Tage bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml PI-Lösung resuspendiert und für 30 min unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte direkt die Analyse unter zur Hilfenahme eines Durchflußzytometers. Sollten einzelne Subpopulationen getrennt analysiert werden, wurden die Proben zuerst mit FITC- oder TriColor-gekoppelten Antikörpern inkubiert (5.9.2), anschließend für 30 min mit Ethanol fixiert und mit PI gefärbt.

PI-Lösung	50 µg/ml	Propidiumiodid (PI)
	0,1 mg/ml	Rnase A
		in PBS

### 5.8.4 DNA-Färbung mittels Hoechst 33382

Die Darstellung der Zellzyklusphasen von nicht-fixierten Zellen erfolgte durch Anfärben der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33382 (Fa. Sigma). Dazu wurden zuerst, wie oben beschrieben, die Zellen mit entsprechenden Antikörpern markiert, gewaschen, in 500 µl PBS/1% FBS aufgenommen und nach Zugabe von 5 µl einer Stammlösung (1mg/ml) des DNA-Lebendfarbstoffes Hoechst 33382 für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

#### 5.8.5 CFSE-Färbung (Wells *et al.*, 1997)

Die Bestimmung der Mitoserate durch Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) beruht auf dem Prinzip, daß der Fluoreszenzfarbstoff sich bei der Teilung von Zellen auf beide Tochterzellen gleichmäßig verteilt und sich damit auch die Intensität des Farbstoffs halbiert. Einzelzellsuspensionen von Milz oder Lymphknoten wurden nach Erythrozytenlyse (s. 5.6.5.2) in 5 ml PBS aufgenommen und für 5 min mit 2,5 µl CFSE-Lösung (Fa. Molecular Probes; 10 mM in DMSO) bei RT inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges CFSE durch Zugabe von 10 ml MTC-Medium inaktiviert und Zellen wie beschrieben stimuliert und kultiviert. Zur Analyse wurden die Zellen nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit Thy1-PE Antikörpern gefärbt, um T-Zellen elektronisch auswählen zu können (s. 5.8.1). Nach Auswahl lebender, Thy1<sup>+</sup> Zellen wurden 20.000 Signale aufgenommen und deren CFSE-Intensität als Histogramm dargestellt.

#### 5.8.6 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 TriColor-gekoppelte Antikörper eingesetzt und die Zellen zusätzlich einmal mit CellWash gewaschen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbas A.K.**, Murphy K.M. und Sher A. (1996).  
Functional diversity of helper T lymphocytes.  
*Nature* **383**: 787-793.
- Akaishi H.**, Takeda K., Kaisho T., Shineha R., Satomi S., Takeda J. und Akira S. (1998). Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes.  
*Int. Immunol.* **10**: 1747-1751.
- Akashi K.**, Kondo M., Freedman-U. Jeffrey U., Murray R. und Weissman I.L. (1997).  
Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in Interleukin-7 receptor-deficient mice.  
*Cell* **89**: 1033-1041.
- Akashi K.**, Kondo M. und Weissman I.L. (1998).  
Two distinct pathways of positive selection for thymocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2486-2491.
- Akashi K.**, Reya T., Dalma-Weiszhausz D. und Weissman I.L. (2000a).  
Lymphoid precursors.  
*Curr. Opin. Immunol.* **12**: 144-150.
- Akashi K.**, Traver D., Miyamoto T. und Weissman I.L. (2000b).  
A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.  
*Science* **404**: 193-197.
- Akashi K.**, Richie L.I., Carr W.H. und Weissman I.L. (2000c).  
B lymphopoiesis in the thymus.  
*J. Immunol.* **164**: 5221-5226.
- Alberola-Ila J.**, Hogquist K.A., Swan K.A., Bevan M.J. und Perlmutter R.M. (1996).  
Positive und negative selection invoke distinct signaling pathways.  
*J. Exp. Med.* **184**: 9-18.
- Alexander W.S.** (1999).  
Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting.  
*Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **31**: 1027-1035.
- Ashwell J.D.**, Lu F.W. und Vacchio M.S. (2000).  
Glucocorticoids in T cell development and function.  
*Annu. Rev. Immunol.* **18**: 309-345.
- Ausubel F.M.**, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. und Struhl K. (1987).  
*Current Protocols in Molecular Biology*.  
Wiley Interscience.
- Ayala A.**, Herdon C.D., Lehman D.L., Ayala C.A. und Chaudry I.H. (1996).  
Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators.  
*Blood* **87**: 4261-4275.
- Baird A.M.**, Gerstein R.M. und Berg L.J. (1999).  
The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development.  
*Curr. Opin. Immunol.* **11**: 157-166.
- Bamford R.N.**, Grant A.J., Burton J.D., Peters C., Kurys G., Goldman C.K., Brennan J., Roessler E. und Waldmann T.A. (1994).  
The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4940-4944.

- Barrios L.**, Agustini M.I., Poletti O.H., Juaristi J. und Brandan N.C. (1998).  
Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on murine bone marrow and spleen erythropoiesis.  
*Acta. Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* **48**: 18-24.
- Barthlott T.**, Kohler H., Pircher H. und 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.
- Bell D.**, Young, J.W. und Banchereau J. (1999).  
Dendritic cells.  
*Adv. Immunol.* **72**: 255-324.
- Beutler B.A.**, Milsark I.W. und Cerami A. (1985).  
Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo.  
*J. Immunol.* **135**: 3972-3977.
- Bhandoola A.**, Cibotti R., Punt J.A., Granger L., Adams A.J., Sharrow S.O. und Singer A. (1999).  
Positive selection as a developmental progression initiated by TCR signals that fix TCR specificity prior to lineage commitment.  
*Immunity* **10**: 301-311.
- Blackburn C.C.**, Augustine C.L., Li R., Harvey R.P., Malin M.A., Boyd R.L., Miller J.F. und Morahan G. (1996).  
The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5742-5746.
- Borgulya P.**, Kishi H., Uematsu Y. und von Boehmer H. (1992).  
Exclusion and inclusion of  $\alpha$  and  $\beta$  T cell receptor alleles.  
*Cell* **69**: 529-537.
- Born W.**, Cady C., Jones-Carson J., Mukasa A., Lahn M. und O'Brien R. (1999). Immunoregulatory functions of gamma delta T cells.  
*Adv. Immunol.* **71**: 77-144.
- Bradford G.B.**, Williams B., Rossi R. und Bertonecello I. (1997).  
Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment.  
*Exp. Hematol.* **25**: 445-453.
- Brehélin M.**(1986).  
Immunity in invertebrates.  
*Springer Verlag*, Heidelberg
- Carlyle J.R.**, Michie A.M., Furlonger C., Nakano T., Lenardo M.J., Paige C.J. und Zuniga-Pflücker C.J. (1997).  
Identification of a novel developmental stage marking lineage commitment of progenitor thymocytes.  
*J. Exp. Med.* **186**: 173-182.
- Cheng A.M.** und Chan A.C. (1997).  
Protein tyrosine kinases in thymocyte development.  
*Curr. Opin. Immunol.* **9**: 528-533.
- Clements J.L.**, 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.
- Cleverley S**, Henning S. und Cantrell D. (1999).  
Inhibition of Rho at different stages of thymocyte development gives different perspectives on Rho function.  
*Curr. Biol.* **17**: 657-660.
- Cosgrove D.**, Gray D., Dierich A., Kaufman J., Lemeur M., Benoist C. und Mathis D. (1991). Mice lacking MHC class II molecules.  
*Cell* **66**: 1051-1066.

- Crespo P.**, Bustelo X.R., Aaronson D.S., Coso O.A., Lopez-Barahona M., Barbacid M. und Gutkind JS. (1996).  
Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav.  
*Oncogene* **13**: 455-460.
- Crompton T.**, Gilmour K.C. und Owen M.J. (1996).  
The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte.  
*Cell* **86**: 243-251.
- Dai C.H.**, Price J.O., Brunner T. und Krantz S.B. (1998).  
Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon gamma to produce erythroid cell apoptosis.  
*Blood* **91**: 1235-1242.
- Darnell J.E., Jr.** (1997).  
STATs and gene regulation.  
*Science* **277**: 1630-1635.
- Deftos M.L.** und Bevan M.J. (2000).  
Notch signaling in T cell development.  
*Curr. Opin. Immunol.* **12**: 166-172.
- de Haan G.**, Loeffler M. und Nijhof W. (1992).  
Long-term recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) treatment severely depresses murine marrow erythropoiesis without causing an anemia.  
*Exp. Hematol.* **20**: 600-604
- DeJarnette J.B.**, Sommers C.L., Huang K., et al (1998).  
Specific requirement for CD3epsilon in T cell development.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14909-14914.
- Dinarelli C.A.** (1996).  
Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock.  
*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **216**: 133-165.
- Di Santo J.P.** und Rodewald H.R. (1998).  
In vivo roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development  
*Curr. Opin. Immunol.* **10**: 196-207.
- Dudley E.C.**, Petri H.A.T., Shah L.M., Owen M.J. und Hayday A.C. (1994).  
T cell receptor chain gene rearrangement und selection during thymocyte development in adult mice.  
*Immunity* **1**: 83-93.
- Durum S.K.**, Candeias S., Nakajima H., Leonard W.J., Baird A.M., Berg L.J., Muegge K. (1998).  
Interleukin 7 receptor control of T cell receptor gamma gene rearrangement: role of receptor-associated chains and locus accessibility.  
*J. Exp. Med.* **188**: 2233-2241.
- Ellmeier W.**, Sawada S. und Littman D.R. (1999).  
The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development.  
*Annu. Rev. Immunol.* **17**: 523-554.
- Farber D.L.** (1998).  
Differential TCR signaling and the generation of memory T cells.  
*J. Immunol.* **160**: 535-539.
- Farrar M.A.**, Doerfler P. und Sauer K. (1998).  
Signal transduction pathways regulating the development of T cells.  
*Bioch. Biophys. Acta* **1377**: F35-F78.
- Fehling H.J.** und von Boehmer H. (1997).  
Early / T cell development in the thymus of normal und genetically altered mice.  
*Curr. Opin. Immunol.* **9**: 263-275.

- Fehling H.J.**, Gilfillan S. und Ceredig R. (1999).  
/ Lineage commitment in the thymus of normal and genetically manipulated mice.  
*Adv. Immunol.* **71**: 1-75.
- Fuchs**, B., Wagner, T., Rössel, N., Antoine, M., Beug, H. und Niessing, J. (1996).  
Structure und erythroid cell-restricted expression of a chicken cDNA encoding a novel zinc finger protein of the Cys + His class.  
*Gene* **195**: 277-284.
- Fung-Leung W.P.**, Schilham M.W., Rahemtulla A. Kundig T.M., Vollenweider M., Potter J. *et al.* (1991).  
CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells.  
*Cell* **65**: 443-449.
- Garcia-Ojeda M.E.**, Dejbakhsh-Jones S., Weissman I.L. und Strober S. (1998).  
An alternate pathway for T cell development supported by the bone marrow microenvironment: recapitulation of thymic maturation.  
*J. Exp. Med.* **187**: 1813-1823.
- Gärtner F.**, Alt F.W., Monroe R., Chu M., Sleckman B.P., Davidson L. und Swat W. (1999). Immature thymocytes employ distinct signaling pathways for allelic exclusion versus differentiation and expansion.  
*Immunity* **10**: 537-546.
- Germain R.N.** (1994).  
MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providin ligands for t lymphocyte activation.  
*Cell* **76**: 287-299.
- Gilks C.B.**, Bear S.E., Grimes H.L. und 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.
- Gilmore T.D.**, Koedood M., Piffat K.A. und White DW. (1996).  
Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer.  
*Oncogene* **13**: 1367-1378.
- Godfrey D.I.**, Kennedy J., Suda T. und 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 D.I.**, Kennedy J., Mombaerts P., Tonegawa S. und Zlotnik A. (1994).  
Onset of TCR gene rearrangement und role of TCR gene expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation.  
*J. Immunol.* **152**: 4783-4792.
- Grimes H.L.**, Chan T.O., Zweidler-McKay P.A., Tong B. und Tschlis P.N. (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 H.L.**, Gilks C.B., Chan T.O., Porter S. und Tschlis P.N. (1996b).  
The Gfi-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14569-14573.
- Grusby M.J.**, Auchincloss H.Jr., Lee R., Johnson R.S., Spencer J.P., Zijlstra M. *et al.* (1993). Mice lacking major histocompatibility complex class I und class II molecules.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3913-3917.
- Guidos C.J.**, Danska J.S., Fathman C.G. und Weissman I.L. (1990).  
T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages.  
*J. Exp. Med.* **172**: 835-845.

- Guidos C.J.** (1996).  
Positive selection of CD4+ und CD8+ T cells.  
*Curr. Opin. Immunol.* **8**: 225-232.
- Haks M.C., Krimpenfort P., Borst J., Kruisbeek A.M.** (1998).  
The CD3gamma chain is essential for development of both the TCR  $\alpha$  and TCR  $\beta$  lineages. *EMBO J.* **17**: 1871-1882.
- Hermine O., Mayeux P., Titeux M., Mitjavila M.T., Casadevall N., Guichard J., Komatsu N., Suda T., Miura Y., Vainchenker W., et al.** (1992).  
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin act competitively to induce two different programs of differentiation in the human pluripotent cell line UT-7.  
*Blood* **80**: 3060-3069.
- Hernandez-Hoyos G., Sohn S.J., Rothenberg E.V. und Alberola-Ila J.** (2000).  
Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment.  
*Immunity* **12**: 313-322.
- Hoffmann E.S., Passoni L., Crompton T., Leu T.M.U., Schatz D.G., Koff A., Owen M.J. und Hayday A.C.** (1996).  
Productive T-cell receptor  $\alpha$ -chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle und clonality during development in vivo.  
*Genes. Dev.* **10**: 948-962.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. und Lacy, E.** (1994).  
Manipulating the Mouse Embryo.  
*Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Iritani B., Alberola-Ila J., Forbush K. und Perlmutter R.** (1999).  
Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors.  
*Immunity* **10**: 713-722.
- Irving B.A., Alt F.W. und Killeen N.** (1998).  
Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains.  
*Science* **280**: 905-908.
- Jackman J.K., Motto D.G., Sun Q., Tanemoto M., Turck C.W., Peltz G.A., Koretzky G.A. und Findell P.R.** (1995).  
Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells.  
*J Biol. Chem.* **270**: 7029-7032.
- Jacobs H., Krimpenfort P., Haks M., Allen J., Blom B., Demolliere C., Kruisbeek A., Spits H. und Berns A** (1999).  
PIM1 reconstitutes thymus cellularity in interleukin 7- and common gamma chain-mutant mice and permits thymocyte maturation in Rag- but not CD3gamma-deficient mice.  
*J. Exp. Med.* **190**: 1059-1068.
- Joyner A.L., Editor.** (1993).  
Gene Targeting.  
*Oxford University Press, New York*
- Junqueira, L.C. und Carneiro, J.** (1991).  
Histologie.  
*Springer Verlag, Berlin*
- Karsunky H.** (1996)  
Untersuchung zur Funktion und Expression des Zink-Finger Proteins Gfi-1 in murinen und humanen T-Lymphozyten.  
*Diplomarbeit, Philipps Universität Marburg*
- Katzav S., Sutherland M., Packham G., Yi T. und Weiss A.** (1994).  
The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav.  
*J. Biol. Chem.* **269**: 32579-32585.

- Kay A.B.** (1999).  
T cells in allergy and anergy.  
*Allergy* **54**: 29-30.
- Killeen N.** und **Littman D.R.** (1993).  
Helper T-cell development in the absence of CD4-p56lck association.  
*Nature* **364**: 729-732.
- King L.B., Tolosa E., Lenczowski J.M., Lu F., Lind E.F., Hunziker R., Petrie H.T. und Ashwell J.D.** (1999).  
A dominant-negative mutant of c-Jun inhibits cell cycle progression during the transition of CD4(-) CD8(-) to CD4(+)CD8(+) thymocytes.  
*Int. Immunol.* **11**: 1203-1216.
- Kisielow P., Bluthmann H., Staerz U.D., Steinmetz M. und von Boehmer H.** (1988).  
Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* **333**: 742-746.
- Kisielow P.** und **von Boehmer H.** (1995).  
Development and selection of T cells: facts and puzzles.  
*Adv. Immunol.* **58**: 87-209.
- Kondo M., Akashi H., Domen J., Sugamura K. und Weissman I.L.** (1997).  
Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cells development, in common gamma-chain-deficient mice.  
*Immunity* **7**: 155-162.
- Laemmli U.K.** (1970).  
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **227**: 680-682.
- Lagasse E.** und **Weissman I.L.** (1996).  
Flow cytometric identification of murine neutrophils und monocytes.  
*J. Immunol. Methods* **197**: 139-150.
- Lantz O.** und **Bendelac A.** (1994).  
An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans.  
*J. Exp. Med.* **180**: 1097-1106.
- Lee N.A., Loh D.Y. und Lacy E.** (1992).  
CD8 surface levels alter the fate of / T cell receptor-expressing thymocytes in transgenic mice.  
*J. Exp. Med.* **175**: 1013-1025.
- Legname G., Seddon B., Lovatt M., Tomlinson P., Sarner N., Tolaini M., Williams K., Norton T., Kioussis D. und Zamoyska R.** (2000).  
Inducible expression of a p56Lck transgene reveals a central role for Lck in the differentiation of CD4 SP thymocytes.  
*Immunity* **12**: 537-546.
- Lehrach H.** (1977).  
RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.  
*Biochemistry* **16**: 4743-4751.
- Leite de Moraes M.C., Hontebeyrie-Joskowicz M., Leboulenger F., Savino W., Dardenne M. und Lepault F.** (1991).  
Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in Trypanosoma cruzi-infected mice: relationship to stress.  
*Scand. J. Immunol.* **33**: 267-275.
- Levin S.D., Anderson S.J., Forbush K.A. und Perlmutter R.M.** (1993).  
A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis.  
*EMBO J.* **12**: 1671-1680.

- Lewis S.M.** (1994).  
The mechanisms of V(D)J joining: lessons from molecular immunological und comparative analyses.  
*Adv. Immunol.* **56**: 27-150.
- Linnekin D.** (1999).  
Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells.  
*Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **31**: 1053-1072.
- Lodolce J.P., Boone D.L., Chai S., Swain R.E., Dassopoulos T., Trettin S. und Ma A.** (1998).  
IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation.  
*Immunity* **9**: 669-676.
- Lucas B. und Germain R.N.** (1996).  
Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation.  
*Immunity* **5**: 461-477.
- Lundberg K. und Shortman K.** (1994).  
Small cortical thymocytes are subject to positive selection.  
*J. Exp. Med.* **179**: 1475-1483.
- Lundberg K., Heath W., Kontgen F., Carbone F.R. und Shortman K.** (1995).  
Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4+8int TCRint thymocytes into CD4-8+TCRhi thymocytes.  
*J. Exp. Med.* **181**: 1643-1651.
- Malissen B., Ardouin L., Lin S.Y., 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.
- Mallick C.A., Dudley E.C., Viney J.L., Owen M.J. und Hayday A.C.** (1993).  
Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: a critical role for the beta chain in development.  
*Cell* **73**: 513-519.
- Maraskovsky E., O'Reilly L.A., Teepe M., Corcoran L.M., Peschon J.J. und Strasser A.** (1997).  
Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor deficient mice but not in mutant rag-1<sup>-/-</sup> mice.  
*Cell* **89**: 1011-1019.
- Mariathasan S., Jones R.G. und Ohashi P.S.** (1999).  
Signals involved in thymocyte positive and negative selection.  
*Sem. Immunol.* **11**: 263-272.
- Marusic-Galesic S., Stephany D.A., Longo D.L. und Kruisbeek A.M.** (1988).  
Development of CD4-CD8+ cytotoxic T cells requires interactions with class I MHC determinants. *Nature* **333**: 180-183.
- Means R.T. Jr., Krantz S.B., Luna J., Marsters S.A. und Ashkenazi A.** (1994).  
Inhibition of murine erythroid colony formation in vitro by interferon gamma and correction by interferon receptor immunoadhesin.  
*Blood* **83**: 911-915
- Mombaerts P., Clarke A.R., Rudnicki M.A., Iacomini J., Itohara S., Lafaille J.J. et al.** (1992). Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages.  
*Nature* **360**: 225-231.
- Nagata S. und Golstein P.** (1995).  
The Fas Death Factor.  
*Science* **267**: 1449-1456.
- Nakajima H., Noguchi M. und Leonard W.J.** (2000).  
Role of the common cytokine receptor chain ( c ) in thymocyte selection.  
*Immunol. Today* **21**: 88-94.

- Nehls M.**, Kyewski B., Messerle M., Waldschütz R., Schuddekopf K, Smith A.J. und Boehm T. (1996).  
Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium.  
*Science* **272**: 886-889.
- Nelson B.H.** und Willerford D.M. (1998).  
Biology of the interleukin-2 receptor.  
*Adv. Immunol.* **70**: 1-81.
- Nossal G.J.V.** (1994).  
Negative selection of lymphocytes.  
*Cell* **76**: 229-239.
- Nutt S.L.**, Heavey B., Rolink A.G. und Busslinger M. (1999).  
Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5.  
*Nature* **401**: 556-562.
- Ohbo K.**, Suda T., Hashiyama M., Mantani A., Ikebe M., Miyakawa K., Moriyama M., Nakamura M., Katsuki M., Takahashi K., Yamamura K. und Sugamura K. (1996).  
Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain.  
*Blood* **87**: 956-967.
- Olszowy M.W.**, Leuchtman P.L., Veillette A. und Shaw A.S. (1995).  
Comparison of p56lck and p59fyn protein expression in thymocyte subsets, peripheral T cells, NK cells, and lymphoid cell lines.  
*J. Immunol.* **155**: 4236-4420.
- Orkin S.H.** (1995).  
Hematopoiesis: how does it happen?.  
*Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 870-877.
- Ozmen L.**, Pericin M., Hakimi J., Chizzonite R.A., Wysocka M., Trinchieri G., Gately M und Garotta G. (1994).  
Interleukin-12, interferon- $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$  are the key cytokines of generalized Schwartzman reaction.  
*J. Exp. Med.* **180**: 907-915.
- Pantelouris E.M.** (1971).  
Observations on the immunobiology of 'nude' mice.  
*Immunology* **20**: 247-252.
- Passoni L.**, Hoffman E.S., Kim S., Crompton T., Pao W. *et al.* (1997).  
Intrathymic  $\alpha$ -selection events in  $\beta$  cell development.  
*Immunity* **7**: 83-95.
- Peschon J.J.**, Morrissey P.J., Grabstein K.H. *et al.* (1994).  
Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor deficient mice  
*J. Exp. Med.* **180**: 1955-1960.
- Petrie H.A.T.**, Livak F., Burtrum D. und Mazel S. (1995)  
T cell receptor gene recombination patterns und mechanisms: cell death, rescue und T-cell production.  
*J. Exp. Med.* **182**: 121-127.
- Pivniouk V.**, Tsitsikov E., Swinton P., Rathbun G., Alt F.W. und Geha RS (1998).  
Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76.  
*Cell* **94**: 229-238.
- Punt J.A.**, Suzuki H., Granger L.G., Sharrow S.O. und Singer A. (1996).  
Lineage commitment in the thymus: only the most differentiated (TCR $\beta$ hi cl-2hi) subset of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes has selectively terminated CD4 or CD8 synthesis.  
*J. Exp. Med.* **184**: 2091-2099.
- Qian D.** und Weiss A. (1999).  
T-cell antigen receptor signal transduction.  
*Curr. Opin. Immunol.* **9**: 205-212.

- Rahemtulla A., Fung-Leung W.P., Schilham M.W., Kündig T.M., Sambhara S.R., Narendran A. Arabian A., Wakeham A. et al. (1991).**  
Normal development und function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4.  
*Nature* **353**: 180-184.
- Rinçon M., Whitmarsh A., Yang D.D., Weiss L., Derijard B, Jayaraj P. et al. (1998).**  
The JNK pathway regulates the in vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes.  
*J. Exp. Med.* **188**: 1817-1830.
- Robey E.A., Fowlkes B.J., Gordon J.W., Kioussis D., von Boehmer H., Ramsdell F. und Axel R. (1991).**  
Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage.  
*Cell* **64**: 99-107.
- Robey E.A., Ramsdell F. und Kioussis D. (1992).**  
The level of CD8 expression determine the outcome of thymic selection.  
*Cell* **69**: 1089-1096.
- Robey E. und Fowlkes B.J. (1994).**  
Selective events in T cell development.  
*Annu. Rev. Immunol.* **12**: 675-705.
- Robey E., Chang D., Itano A., Cado D., Alexunder H., Lans D., Weinmaster G., Salmon P. (1996).**  
An activated form of Notch influences the choice between CD4 und CD8 T cell lineages.  
*Cell* **87**: 483-492.
- Robey E. (1999).**  
Regulation of T cell fate by Notch.  
*Annu. Rev. Immunol.* **7**:283-295.
- Rödel B., Wagner T., Zörnig M., Niessing, J. und 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., Sharper F., Heinrich P., Shuai, K., Elsässer H.P. und Möröy T. (2000)**  
The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3.  
*zur Veröffentlichung eingereicht.*
- Rodewald H.R., Ogawa M., Haller C., Waskow C. und DiSanto J.P. (1997).**  
Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation.  
*Immunity* **6**: 265-72.
- Rudd C.E. (1996).**  
Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function.  
*Immunity* **4**: 527-534.
- Sadahira Y. und Mori M. (1999).**  
Role of macrophage in erythropoiesis.  
*Pathol. Int.* **49**: 841-848.
- Salmon P., Mong M., Kang X.J., Cado D. und Robey E. (1999).**  
The role of CD8 alpha' in the CD4 versus CD8 lineage choice.  
*J. Immunol.* **163**: 5312-5318.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989)**  
Molecular cloning.  
*CSH-Laboratory Press.*
- Sant'Angelo D.B., Lucas B., Waterbury P.G., Cohen B., Brabb T., Goverman J. et al. (1998).** A molecular map of T cell development.  
*Immunity* **9**: 179-186.

- Sebzda E.**, Mariathasan S., Ohteki T., Jones R.G., Bachmann M.F. und Ohashi P.S. (1999). Selection of the T cell repertoire.  
*Annu. Rev. Immunol.* **17**: 829-874.
- Schmidt T.**, Karsunky H., Gau E., Zevnik B., Elsässer H.P. und 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 H.P. und 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.
- Schmidt T.**, Körner K., Karsunky H., Korsmeyer S., Müller R. und Möröy T. (1999). The activity of the murine bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53.  
*Cell Death & Diff.* **6**: 873-882.
- Shinkai Y.**, Rathbun G., Lam K.-P. *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J recombination. *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.
- Southern E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.  
*J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Sugawara T.**, Moriguchi T., Nishida E. und Takahama Y. (1998). Differential roles of ERK und p38 MAP kinase pathways in positive und negative selection of T lymphocytes.  
*Immunity* **9**: 565-574.
- Suzuki H.**, Punt J.A., Granger L.G. und Singer A. (1995). Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cell lineages: a new perspective on thymic commitment und selection.  
*Immunity* **2**: 413-425.
- Swat W.**, von Boehmer H. und Kisielow P. (1994). Small CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>TCR<sup>low</sup> thymocytes contain precursors of mature T cells.  
*Eur. J. Immunol.* **24**: 1010-1012.
- Swat W.**, Shinkai Y., Cheng H.L., Davidson L. und Alt F.W. (1996). Activated Ras signals differentiation und expansion of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4683-468.
- Takeshita T.**, Asao H., Ohtani K., Ishii N., Kumaki S., Tanaka N., Munakata H., Nakamura M. und Sugamura K. (1992). Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor.  
*Science* **257**: 379-382.
- Tarakhovsky A.**, Kanner S.B., Hombach J., Ledbetter J.A., Muller W., Killeen N. und Rajewsky K. (1995). A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction und thymocyte selection.  
*Science* **269**: 535-537.
- Thomas P.S.** (1980). Hybridisation of denaturated RNA und small DNA fragments transferred to nitrocellulose.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 5201-5205.
- Tilbrook P.A.** und Klinken S.P. (1999). The erythropoietin receptor.  
*Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **31**: 1001-1005.

- Tong B.**, Grimes H.L., Yang T.Y., Bear S.E., Qin Z., Du K., El-Deiry W.S. und Tsichlis P.N. (1998). The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2462-2473.
- Tybulewicz V.L.**, Crawford C.E., Jackson P.K., Bronson R.T. und Mulligan R.C. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* **65**: 1153-1163.
- van Ewijk W.** (1991)  
T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 591-615.
- 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 L.A., McNeill T., Burdach S.E. und Murray R (1995).  
Lymphopenia in interleukin (IL-) 7 gene deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* **181**: 1519-1526.
- von Freeden-Jeffry U.**, Solvason N., Howard M. und Murray R. (1997).  
The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**: 147-54
- Wang C.Q.**, Udupa K.B. und Lipschitz D.A. (1995).  
Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *Cell. Physiol.* **162**: 134-138.
- Washburn T.**, Schweighoffer E., Gridley T., Chang D., Fowlkes B.J., Cado D. und Robey E. (1997).  
Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* **88**: 833-843.
- Weiss A.** (1993).  
T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* **73**: 209-212.
- Weiss A.** und Littman D.R. (1994).  
Signal transduction by lymphocyte antigen receptor. *Cell* **76**: 263-274.
- Weissman I.L.** (2000).  
Stem cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell* **100**: 157-168.
- Weissman I.L.** (1994).  
Developmental switches in the immune system. *Cell* **76**: 207-218.
- Wells A.D.**, Gudmundsdottir H. und Turka L.A. (1997)  
Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. *J. Clin. Invest.* **100**: 3173-3183
- Wallerford D.M.**, Swat W. und Alt F.W. (1996).  
Developmental regulation of V(D)J recombination und lymphocyte differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**: 603-609.

- Wu L.**, Scollay R., Egerton M., Pearse M., Spangrude G.J. und Shortman K. (1991).  
CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus.  
*Nature* **349**: 71-74.
- Ye S.K.**, Maki K., Kitamura T., Sunaga S., Akashi K., Domen J., Weissman I.L., Honjo T. und Ikuta K. (1999).  
Induction of germline transcription in the TCRgamma locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor.  
*Immunity* **11**: 213-223.
- Zijlstra M.**, Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H. und Jaenisch R. (1990).  
Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells.  
*Nature* **344**: 742-746.
- Zörnig M.**, Schmidt T., Karsunky H., Grzeschiczek A. und 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.
- Zuniga-Pflücker J.C.**, McCarthy S.A., Weston M., Longo D.L., Singer, A. und Kruisbeek A.M. (1989).  
Role of CD4 in thymocyte selection und maturation.  
*J. Exp. Med.* **169**: 2085-2096.
- Zweidler-Mckay P.A.**, Grimes H.L., Flubacher M.M. und Tschlis P.N. (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 Publikationsliste

Während der Promotionszeit Publikation folgender Fachartikel:

K. Haas, C. Johannes, C. Geisen, T. Schmidt, **H. Karsunky**, S. Blass-Kampmann, G. Obe und T. Möröy (1997).

Malignant transformation by cyclin E and Ha-ras correlates with resistance against cell death but requires functional Myc and CDK4.

*Oncogene* 15: 2615-2624

T. Schmidt, **H. Karsunky**, B. Rödel, B. Zevnik, H.P. Elsässer und T. Möröy (1998).

Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre T-cell differentiation steps associated with  $\alpha$  selection.

*EMBO Journal* 17: 5349-5359

T. Schmidt, **H. Karsunky**, B. Zevnik, H. P. Elsässer und T. Möröy (1998).

Zinc fingerprotein Gfi-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with Pim and Myc genes in T-cell lymphomagenesis.

*Oncogene* 17: 2661-2668

T. Schmidt, K. Körner, **H. Karsunky**, S. Korsmeyer, R. Müller und T. Möröy (1999).

The murine Bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53.

*Cell Death & Differentiation* 9: 873-882

**H. Karsunky**, C. Geisen, T. Schmidt, B. Zevnik, E. Gau und T. Möröy (1999).

Oncogenic potential of cyclin E in T-cell lymphomagenesis in transgenic mice: Evidence for cooperation between cyclin E and Ras but not Myc.

*Oncogene* 18: 7816-7825

M. Napirei, **H. Karsunky**, B. Zevnik, H. Stephan, H.G. Mannherz und T. Möröy (2000).

Features of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in Dnase 1 deficient mice.

*Nature Genetics* 25: 177-181

T. Möröy und **H. Karsunky** (2000).

Regulation of pre T-cell development

*Cellular & Molecular Life Sciences* 57: 957-975

T. Schmidt, **H. Karsunky**, B. Fraß, A., Denzel, W. Baum und T. Möröy (2000).

A novel protein – Fbf-1 – that binds to CD95/Apo-1/Fas and shows sequence similarity to trichohyalin and plectin.

*Biochimica et Biophysica Acta* 91447: 1-6

I. Leduc, **H. Karsunky**, N. Mathieu, T. Schmidt, C. Verthuy, P. Ferrier und T. Möröy (2000).  
The Pim-1 kinase stimulates maturation of TCR $\beta$  deficient T-cell progenitors: implications for  
the mechanism of Pim-1 action.

*International Immunology* 12: in Druck

B. Rödel, K. Tavassoli, **H. Karsunky**, T. Schmidt, F. Schaper, P. Heinrich, K. Shuai, H. P.  
Elsässer und T. Möröy (2000).

The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3-  
inhibitor PIAS3.

*zur Veröffentlichung eingereicht*

**H. Karsunky**, T. Schmidt, B. Zevnik und T. Möröy (2000).

Multiple disruptions in pre-T cell differentiation in mice deficient for the zinc finger protein  
Gfi-1.

*in Vorbereitung*

## 7.2 Lebenslauf

**Name:** Holger Karsunky

**Geburtsdatum:** 28.12.1971

**Geburtsort:** Attendorn

### Schulbildung:

1978-1982                      Gemeinschafts-Grundschule Neu-Listernohl

1982-1991                      Rivius-Gymnasium der Stadt Attendorn

### Universitätsausbildung:

ab WS 1991/92              Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg mit dem Hauptfach Molekularbiologie und den Nebenfächern Immunologie und Virologie

5/95 - 4/96                  Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg bzw. am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tarik Möröy. Thema der Diplomarbeit: „Untersuchung zur Funktion und Expression des Zink-Finger Proteins GFI-1 in humanen und murinen T-Lymphozyten“

4/96                              Abschluß des Studiums der Humanbiologie und Erlangung des akademischen Grades „Diplom-Humanbiologe“

ab 5/96                        Beginn der Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tarik Möröy. Thema der Arbeit: „Multiple Defekte der Hämatopoese und T-Zellentwicklung in *Gfi-1*-defizienten Mäusen“.

### Wissenschaftliche Beschäftigung:

5/96 – 6/98                  Stipendiat des Graduiertenkollegs „Zell- und Molekularbiologie normaler und maligner Zellsysteme“

seit 7/98                      Wiss. Angestellter am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Möröy

### 7.3 Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Tarik Möröy** gilt zunächst mein Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung in den letzten Jahren. Noch mehr habe ich Ihm für das freundschaftliche Verhältnis und die hitzigen Diskussionen über den Einfluß von Warp-Blasen auf das Raum-Zeitkontinuum in unserem Labor zu danken.

Bei Herrn **PD Dr. Hans-Peter Elsässer** möchte ich mich für die Anfertigung und Auswertung einer Vielzahl von histologischen Präparaten bedanken, die leider in dieser Arbeit nicht abgebildet werden konnten.

Herrn **Prof. Dr. Ulrich Dührsen** sei Dank gesagt für die große Hilfe bei der Anfertigung und Auszählung der Cytospins.

Bei **Herrn Dr. Klug** muß ich mich für die Unterstützung und große Hilfsbereitschaft bei der Blutanalyse bedanken.

Ein ganz großer Dank gilt allen Tierpflegern, besonders **Thomas Civela** und **Petra Plessow**, bei denen meine Mäuse stets in guten Händen waren.

Allen **Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Möröy** gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und nette Atmosphäre im Labor. Besonders **Eva Gau** und **Inge Spratte** möchte ich für die Mausanalysen danken, sowie für die ordnende Kraft in unserem chaotischen Laboralltag. Herrn **Dr. Branko Zevnik** gilt mein Dank für die Super-Injektionen und die Hilfe bei allen Maus-technischen Fragen. Namentlich erwähnt werden muß natürlich unsere Quoten-Chemikerin **Beate Fraß**, die nicht nur für eine ständige Geräuschkulisse sorgte, sondern vor allem stets hilfsbereit und großzügig zur Seite stand (bis zur letzten Minute). Ebenso gilt mein ganz besonderer Dank **Christoph (Batterie) Geisen** für unvergessene Squash-Stunden und eine verlässliche Freundschaft.

**Markus Napirei** gilt ebenfalls mein besonderer Dank für die glorreiche Zusammenarbeit und unvergessene Höhepunkte der Ruhrpott-Kultur.

Einen super-großen Dank gibt es für den einzig wahren **Suuuper-Schmidt**. Von einer tollen Zusammenarbeit, über Migräne-Notdienste, bis hin zu einer tiefen Freundschaft habe ich Ihm sehr viel zu Verdanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei **Ines Mende** bedanken, die das letzte Jahr in Essen durch Ihre Liebe und Verständnis erträglicher gemacht hat.

Mein größter Dank gilt aber meinen **Eltern** und **Geschwistern**, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte und die mir mit Ihrer Liebe immer zur Seite standen.

## 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 „Multiple Defekte der Hämatopoese und T-Zellentwicklung in Gfi-1 defizienten Mäusen“ zuzuorden ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Holger Karsunky befürworte.

Essen, den 7.06.2000

(Prof. Dr. Tarik Möröy)

Erklärung:

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

Essen, den 7.06.2000

(Holger Karsunky)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zur 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 7.06.2000

(Holger Karsunky)