

1 Einleitung

1.1 Der Thymus des Menschen

1.1.1 Allgemeines

Der Thymus ist ein primäres lymphatisches Organ, dessen Bedeutung für ein funktionstüchtiges Immunsystem trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig bekannt ist.

Der Thymus des Menschen wird fortwährend von Veränderungen geprägt und bildet sich schließlich im Alter zurück (Kendall 1991, Kuper et al. 1992, Steinmann 1985). Das histologische Bild des Thymus bietet immer nur einen Ausschnitt dieses ständig fortschreitenden Prozesses (Schuurman et al. 1997).

1.1.2 Embryologie

Ein wesentlicher Unterschied zu anderen lymphatischen Organen besteht darin, dass das Grundgerüst des Thymus nicht von Bindegewebe, sondern von Epithel gebildet wird (Bockmann 1997). Die epithelialen Anteile des menschlichen Thymus entstammen endodermalen Zellen der dritten Schlundtasche sowie ektodermalen Zellen des dritten Kiemenbogens. Nur die Thymuskapsel, die Septen und die Gefäße sind mesodermalen Ursprungs (Weller 1933, Norris 1938, Auerbach 1960 und 1961, Cordier und Haumont 1980, Patten 1968).

Durch die enge räumliche Beziehung zwischen der dritten Schlundtasche und dem dritten Kiemenbogen zueinander kommt es etwa in der 4. Schwangerschaftswoche zur Herausbildung des Primordialthymus des Embryos (Weller 1933, Crouse et al. 1985). In der 7.-8. Schwangerschaftswoche wird der endodermale Anteil des Primordialthymus komplett vom ektodermalen Anteil umschlossen, und es erfolgt die Einwanderung der ersten T-Zellen-Vorläufer aus der fetalen Leber und dem Dottersack (Weller 1933, Crouse et al. 1985, Lobach

und Haynes 1987, Haynes 1984). Bis zu diesem Zeitpunkt bestehen beide Thymusanlagen ausschließlich aus Epithel.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird der embryonale Thymus von sogenannten ekto-mesenchymalen Zellen umgeben. Diese Zellen entstammen der Neuralleiste und sind somit auch ektodermalen Ursprungs (Bockman und Kirby 1984, Bockmann 1997, Le Douarin und Joutereau 1975, Benninghoff 1994). Sie bilden die Thymuskapsel, Blutgefäße und interlobuläre Septen innerhalb des Thymus (Weller 1933, Norris 1938, Cordier und Haumont 1980). Die Mesenchymzellen sind mitverantwortlich für die weitere Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen des Primordialthymus. Wie wichtig das Vorhandensein der Mesenchymzellen für die normale Thymusentwicklung ist, zeigt sich in Untersuchungen, bei denen im Tierversuch die Neuralleiste des Embryos entfernt wurde. Bei diesen Tieren war zum Teil kein Thymus vorhanden oder aber es kam nur zur Ausbildung eines reduzierten rudimentären Organes (Auerbach 1960, Bockman und Kirby 1984, 1985, 1989, Bockman 1997).

In der 9. Schwangerschaftswoche kommt es zur Anlagerung der rechten und linken Thymusanlage aneinander. Zur Verschmelzung dieser beiden Lobuli kommt es jedoch nicht (von Gaudecker 1986, Haynes 1990, Benninghoff 1994). Etwa zur gleichen Zeit bilden sich mesenchymale Septen, die die beiden Lobuli des fetalen Thymus in Pseudolobuli unterteilen. In der 14. Schwangerschaftswoche wird beim menschlichen Fetus die anatomische Strukturierung des Thymus in die zwei Hauptregionen Kortex und Medulla deutlich. Schon in der 17. Schwangerschaftswoche ist der Differenzierungsprozess von Rinde und Mark abgeschlossen (von Gaudecker 1986).

Lange Zeit war der genaue Verbleib der endodermalen bzw. ektodermalen Epithelzellen und deren Lokalisation im Thymus unklar. Erst durch die Entwicklung bestimmter monoklonaler Antikörper (TE-3, TE-4) konnte die These untermauert werden, dass die Epithelzellen des Kortex endodermalen Ursprungs sind. Die medullären Thymusepithelzellen und eine direkt unter der Thymuskapsel liegende kortikale Zellschicht (subkapsulärer Kortextbereich) entstammen dem Ektoderm (McFarland et al. 1984, Norris 1983, Cordier und Haumont 1980).

1.1.3 Anatomie und Histologie

Der Thymus wird aufgrund seiner frühen embryonalen Entwicklung vor den anderen lymphatischen Organen auch als primäres lymphatisches Organ bezeichnet. Das Organ besteht aus zwei ungleich großen Lappen und ist hinter dem Sternum im oberen vorderen Mediastinum zwischen oberem Sternumrand und dem Knorpel der 4. Rippe lokalisiert. Die Rückseite des Thymus liegt vor den großen Gefäßen und im distalen Abschnitt vor dem Herzbeutel.

Der Thymus wird von einer bindegewebigen Kapsel umschlossen, die sich in kurze Bindegewebssepten fortsetzt. Diese interlobulären Septen unterteilen die zwei Thymuslappen in miteinander verbundene Pseudolobuli und lassen so den strauchartigen Aufbau des Thymus entstehen. Des Weiteren gliedern sich die Lobuli in eine zellreiche Rinde, Kortex, und ein zellärmeres Mark, Medulla (Benninghoff 1994). Das Grundgerüst des Thymus besteht aus einem dichten Maschenwerk, welches von verzweigten epithelialen Zellen gebildet wird. Zwischen den verzweigten Epithelzellen befinden sich die in der Rinde dicht und im Mark locker angeordneten T-Lymphozyten, die sogenannten Thymozyten. Das enge Zusammenwirken von Thymusepithelzellen und Thymozyten ist von großer Bedeutung für die Thymopoese, die T-Zell-Reifung (Boyd et al. 1993).

Innerhalb des Thymus finden sich neben Lymphozyten epitheliale und nichtepitheliale Komponenten.

Nichtepitheliale Komponenten

Zu den nichtepithelialen Zellen des Thymus zählen Makrophagen, dendritische (auch: interdigitierende) Zellen, Fibroblasten, B-Zellen und Killerzellen. Die Makrophagen sind im gesamten Thymus lokalisiert und verantwortlich für die Phagozytose (Boyd et al. 1993, Schuurmann et al. 1997). Auch dendritische Zellen finden sich innerhalb des gesamten Thymusgewebes, sind jedoch im Bereich der kortiko-medullären Grenze konzentriert

(Barclay und Mayrhofer 1981, Duijvestijn und Hoefsmit 1981, Janossy et al. 1980, Milicevic et al. 1987, van Ewijk et al. 1980). Vermutlich gelangen die dendritischen Zellen über die perivaskulären Räume von der Blutbahn in den Thymus und umgekehrt (von Gaudecker und Müller-Hermelink 1980). Makrophagen und dendritische Zellen bilden zusammen mit unreifen Thymozyten im Kortex des Thymus Rosetten oder Wirbel (Kyewski 1987, Kyewski et al. 1982, 1987, Nabarra und Papiernik 1988, Shortman et al. 1989, 1991a, 1991b) und sind vermutlich in die frühen Schritte der T-Zell-Entwicklung involviert (Kyewski et al. 1987) sowie für die negative Selektion der Lymphozyten verantwortlich (Jenkinson und Anderson 1995, van Ewijk et al. 1988, Volkmann et al. 1997, Ritter und Palmer 1999).

Die Fibroblasten hingegen wirken bei der positiven Selektion der Lymphozyten mit. Die Lymphozyten lernen so Antigene in Verbindung mit MHC-Proteinen erkennen (Anderson et al. 1997, Ritter und Palmer 1999).

Zelltyp	Phänotyp
Makrophagen	CD54 ⁺ , MHC-I ⁺ , MHC-II ⁺
dendritische (interdigitierende) Zellen	CD54 ⁺ , CD58 ⁺ , MHC-I ⁺ , MHC-II ⁺
Fibroblasten	CD54 ⁺
B-Zellen	MHC-I ⁺ , MHC-II ⁺

Tabelle 1.1: Nichtepitheliale Zellen im Thymus des Menschen (nach Boyd et al. 1993)

Epitheliale Komponenten

Anhand des Phänotyps lassen sich drei große Epithelklassen im Thymus des Menschen unterscheiden: subkapsuläres/subtrabekuläres/perivaskuläres (Typ 1-) Epithel, Kortex und Medulla. Van de Wijngaert und Mitarbeiter konnten anhand von ultrastrukturellen Zellmerkmalen und der Elektronendichte des Zellkernes und Zytoplasmas 6 Typen von Thymusepithelzellen des Menschen voneinander unterscheiden. Typ 1 umfasst die subkapsuläre

sowie perivaskuläre Zellschicht. Des Weiteren werden kortikale Thymusepithelzellen mit Zellfortsätzen in blasse (Typ 2), intermediäre (Typ 3) und dunkle (Typ 4) Zellen unterteilt. Als Typ 5-Zellen werden kleine undifferenzierte Zellen im Bereich der Thymusmedulla bezeichnet. Typ 6-Epithelzellen sind längliche sekretorische Zellen innerhalb der Medulla, die zum Teil die Hassall'schen Körperchen umgeben (van de Wijngaert et al. 1984) und die Thymushormone enthalten (von Gaudecker 1986). Diese Klassifizierung der Thymusepithelzellen gilt auch für andere Spezies, wie beispielsweise Ratten (De Waal et al. 1993a, Kendall 1988) oder Primaten wie den Marmoset (*Callithrix jacchus*) (Stolterfoht 1990). Vermutlich stellen die morphologisch unterschiedlichen Zelltypen eine Abfolge von verschiedenen Differenzierungsstadien der Thymusepithelzellen dar (van de Wijngaert et al. 1984, De Waal et al. 1993b, De Waal und Rademakers 1997). Die Typ 4-Epithelzellen entsprechen möglicherweise dem terminalen Differenzierungsstadium der kortikalen Epithelzellen (Boyd et al. 1993). Innerhalb der Thymusmedulla gilt dies für die Hassall'schen Körperchen (Nicolas et al. 1985, Savino und Dardenne 1988a, b).

Weitere Subtypen von Epithelzellen wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper identifiziert, welche in der CTES-Klassifikation (Cluster of thymic epithelial staining) zusammengefasst werden. Hierbei werden 9 Epithelgruppen voneinander unterschieden und zum Teil in weitere Untergruppen unterteilt (Ritter und Haynes 1987, Kampinga et al. 1990). Tabelle 1.2 auf Seite 6 gibt einen Überblick über die CTES-Klassifizierung.

Zwei besondere Zellformen innerhalb des menschlichen Thymus stellen die sogenannten Ammenzellen (thymic nurse cells, TNC) und die Hassall'schen Körperchen (HK) dar.

Als Ammenzellen werden Thymusepithelzellen im Bereich der äußeren Schichten des Kortex bezeichnet (Dipasquale und Tridente 1991, Ritter et al. 1981, van de Wijngaert et al. 1983). Seltener finden sich diese Zellen im Bereich der kortiko-medullären Grenze sowie in der Thymusmedulla (De Waal und Rademakers 1997, Brellinska und Warchol 1997). Diese Zellen sind sternförmig konfiguriert und umschließen mit ihren Fortsätzen etwa 10 bis 250 Thymozyten (Boyd et al. 1993). Es können drei Typen von TNCs voneinander unterschieden werden (Brellinska und Warchol 1997). Die Aufgabe der Ammenzellen im Thymus ist noch nicht vollständig geklärt, vermutlich sind sie in die T-Zell-Entwicklung im Thymus involviert

(Aguilar et al. 1994, De Waal et al. 1986, Dipasquale und Tridente 1991, Kyewski 1986, Lahoud et al. 1993).

CTES-Klasse	Spezifität
I	gesamtes Epithel
II	subkapsulär/perivaskulär, Medulla, Hassall'sche Körperchen
III	Kortex
IV	Medulla, Hassall'sche Körperchen
V	Hassall'sche Körperchen
VI	Typ 1-Epithel (subkapsulär/perivaskulär/subtrabekulär)
XX	Gemisch (subkapsulär, Kortex, Medulla)
Thymic nurse cells (Ammenzellen)	

Tabelle 1.2: CTES-Klassifizierung der Thymusepithelzellen des Menschen (modifiziert nach Boyd et al. 1993)

Die Hassall'schen Körperchen werden von sekretorischen Typ 6-Epithelzellen umgeben (van de Wijngaert et al. 1984), kennzeichnen sich durch einen zwiebelschalenartigen Aufbau und sind ausschließlich in der Thymusmedulla lokalisiert. Die äußeren Schichten der HK sind durch die Sekretion von Thymushormonen und Enzymen physiologisch aktiv. Je weiter die HK in ihrer Entwicklung fortschreiten, um so mehr Zelldetritus sammelt sich in den inneren Schichten an. Dieses nekrotische Material wird von ehemaligen Epithelzellen in der Peripherie der Hassall'schen Körperchen gebildet, deren Hormon- und Enzymproduktion erschöpft ist (Bodey et al. 2000). So stellen die Hassall'schen Körperchen vermutlich ein Endstadium der Differenzierung der medullären Thymusepithelzellen dar (Nicolas et al. 1985, Savino und Dardenne 1988a und b, Bodey et al. 2000).

Während der Thymusentwicklung erscheinen die HK an einem Zeitpunkt, an dem die Lymphopoese im Thymus schon eingesetzt hat und Kortex, Medulla und die kortikomedulläre Grenze im Stande sind, die negative und positive Selektion der T-Lymphozyten

während des Reifeprozesses zu unterstützen. Beim menschlichen Fetus wurde das erste sich entwickelnde HK am Ende des dritten Schwangerschaftsmonats entdeckt, wobei die größte Entwicklungsaktivität der HK zwischen dem 6. und 9. Schwangerschaftsmonat beobachtet wurde (Bodey et al. 1997). Über die Funktion der Hassall'schen Körperchen gibt es bislang ausschließlich Vermutungen. Ihre sekretorische Aktivität erlaubt die Schlussfolgerung, dass sie in die Entwicklung der Thymozyten einbezogen sind und somit ein wichtiges Element innerhalb des Thymus für die Thymopoese darstellen (Bodey et al. 2000).

Das Thymusstroma wird auch als Microenvironment bezeichnet. Alle Stromazellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die klassischen MHC I Proteine (HLA-A, B, C) exprimieren, wohingegen die klassischen MHC II Proteine (HLA-DP, DQ) ausschließlich von kortikalem Epithel, wenigen medullären und subkapsulären Epithelzellen, allen dendritischen Zellen und einigen Makrophagen präsentiert werden (Ritter und Crispe 1992, Rouse et al. 1982, von Gaudecker et al. 1997). Die Expression von MHC Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der T-Zellen.

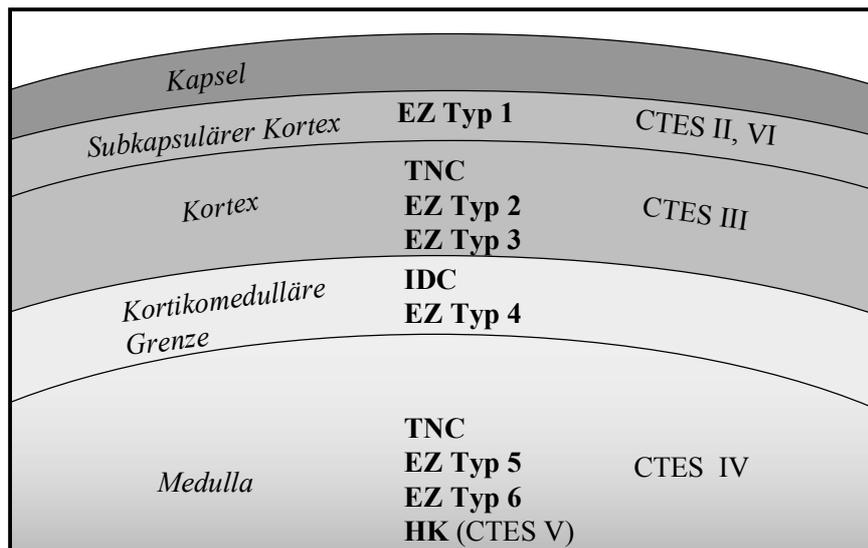


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Thymus des Menschen. *EZ=Epithelzellen, TNC=thymic nurse cell, IDC=interdigitating cell, HK=Hassall'sches Körperchen, CTES=Cluster of epithelial staining*

1.1.4 T-Zell-Entwicklung

Der Thymus spielt bei der T-Zell-Entwicklung eine entscheidende Rolle. Das Thymusstroma, das sogenannte „Microenvironment“, trägt sowohl durch direkte Zell-Zell-Kontakte als auch durch bestimmte Moleküle, wie Interleukine oder MHC Proteine, zur T-Zell-Entwicklung bei (Ritter und Crispe 1992, Boyd et al. 1993, Jenkinson und Anderson 1995, Anderson et al. 1996, Oosterwagel et al. 1997).

Nach Einwanderung der ersten undifferenzierten T-Vorläuferzellen aus Dottersack, fetaler Leber (siehe Kapitel 1.1.2 Seite 1) und später dem Knochenmark kommt es im Thymus zur Zellvermehrung sowie zur Differenzierung der T-Lymphozyten, die dabei die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd erlernen. Dieser Prozess wird als Selektion bezeichnet: bei der *positiven* Selektion werden den Lymphozyten Antigene in Verbindung mit MHC Proteinen präsentiert, wohingegen bei der *negativen* Selektion gegen körpereigenes Material gerichtete Lymphozyten eliminiert werden. Für die positive Selektion sind MHC II positive Epithelzellen, zum größten Teil kortikale Thymusepithelzellen, zuständig. Die negative Selektion der Thymozyten wird durch dendritische Zellen und durch medulläre Epithelzellen induziert (Jenkinson und Anderson 1995, van Ewijk et al. 1988, Volkmann et al. 1997, Anderson et al. 1997).

Die fortschreitende Differenzierung der T-Lymphozyten ist durch das Erscheinen bestimmter Oberflächenantigene gekennzeichnet. Abbildung 1.2 auf Seite 9 verdeutlicht die T-Zell-Differenzierung im Thymus. Nur die Prothymozyten oder T-Vorläuferzellen und frühe Thymozyten enthalten das Enzym Terminale Desoxy-Transferase (TdT) und sind CD4- und CD8-negativ. Die Zellen „durchwandern“ die einzelnen Schichten des Thymus und erfahren eine zunehmende Differenzierung, die sich in der Expression von Oberflächenantigenen widerspiegelt. Im Bereich der kortiko-medullären Grenze tragen die Thymozyten sowohl das CD4- als auch das CD8-Oberflächenantigen. Die reifen CD4-positiven T-Helferzellen und die CD8-positiven T-Zellen verlassen dann die Thymusmedulla und gelangen in die Blutbahn (Ritter und Palmer 1999, Benninghoff 1994).

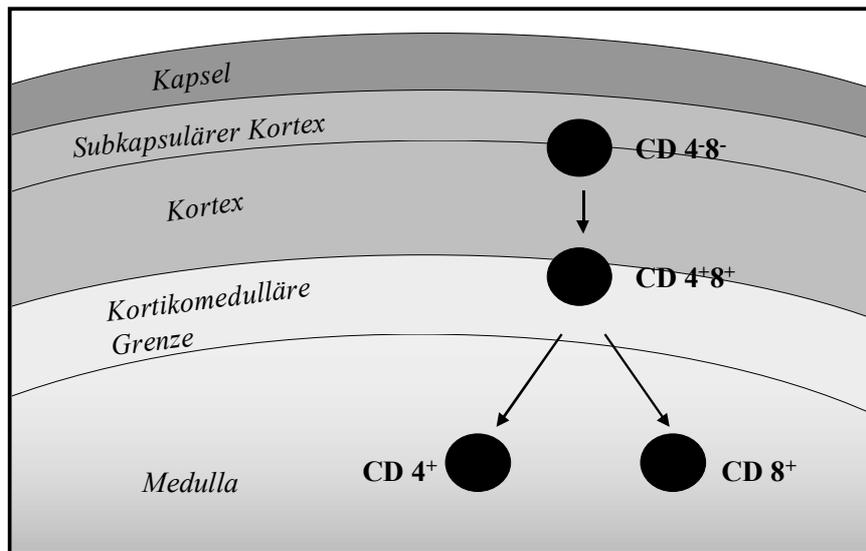


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der T-Zell-Entwicklung im Thymus (modifiziert nach Ritter und Palmer 1999)

1.1.5 Altersveränderungen des Thymus

Innerhalb des Thymus vollziehen sich degenerative Prozesse, die auch als Involution bezeichnet werden. Steinmann hat 1985 beschrieben, dass der menschliche Thymus nur in den ersten 6 Monaten nach der Geburt an Größe und Gewicht zunimmt und daraufhin schon degenerative Prozesse einsetzen, welche sich kontinuierlich während des gesamten Lebens fortsetzen. Dies widerlegt die weit verbreitete Ansicht, dass die Pubertät einen großen Einfluß auf den Thymus ausübe.

Die Volumina von perivaskulären Räumen, Bindegewebe und Hassall'schen Körperchen erreichen ihr Maximum während der Pubertät und sinken dann ab, was vermutlich auf hormonelle Einflüsse zurückzuführen ist (Steinmann 1985). Medulla und Kortex erreichen ihre maximalen Volumina im ersten Lebensjahr und nehmen danach stark ab. Um das 50. Lebensjahr ist eine Differenzierung zwischen Medulla und Kortex nahezu nicht mehr möglich. Einzig das Volumen der Gefäße bleibt während der Thymusinvolution annähernd konstant (Steinmann et al. 1985, Steinmann 1984). Fehlendes Thymusgewebe wird durch

vermehrte Einlagerung von Fettgewebe ersetzt, welches im Alter von 50 Jahren schon einen Anteil von mehr als 70% am Thymusvolumen ausmacht (Steinmann et al. 1985). Obwohl die Involution weiter fortschreitet, verbleibt ein funktionstüchtiger Rest Thymusgewebe (Steinmann 1985), der wahrscheinlich in Situationen mit erhöhtem Bedarf an T-Zellen vom Körper in jedem Lebensalter reaktiviert werden kann (Ritter und Palmer 1999).

1.2 Die Bedeutung des Marmoset (*Callithrix jacchus*) als Versuchstier

Seit den 60er Jahren werden Primaten als Nichtnagetierspezies bei der Prüfung von Arzneimitteln, insbesondere für Untersuchungen des Arzneimittelmetabolismus, eingesetzt. Zu den verwendeten Spezies zählt auch der Neuweltaffe *Callithrix jacchus* (Schulz 2000).

Einer der wichtigsten Vorteile des Marmosetaffen gegenüber dem Nagetier als Versuchstier liegt in der hohen Vergleichbarkeit der Körpersysteme von Mensch und Marmoset, die aus der engen phylogenetischen Verwandtschaft beider Spezies resultiert (Neubert et al. 1988b). Des Weiteren sprechen jedoch auch die leichte Handhabbarkeit sowie eine gute Reproduktion bei der Zucht für den Einsatz des Marmosets.

Genauere Angaben über die Tierhaltung sind im Kapitel 2 (Material und Methoden) zusammengestellt.

1.3 Der Thymus des Marmoset (*Callithrix jacchus*)

Es gibt nur wenige Publikationen, die sich mit dem Thymus des Marmoset beschäftigen. Zur Thymusentwicklung gibt es kaum Literatur. Die folgenden Absätze nehmen Bezug auf die umfangreichste Zusammenstellung von Daten zu diesem Thema, der Dissertationsschrift von Stolterfoht (1990), der sich eingehend mit der Entwicklung des Thymus des Marmosets beschäftigt hat.

Beim Marmoset entsteht der Thymus aus den ventralen Anteilen der 3. und 4. Schlundtasche sowie des 2. und 3. Kiemenbogens. Am 60. Tag der Embryonalentwicklung verschmelzen endodermales Epithel der Schlundtaschen und ektodermales Epithel der Kiemenbögen miteinander und bilden den Primordialthymus.

Durch die Einstrahlung kollagener Fasern kommt es ab dem 62. Tag pränatal zur zunehmenden Septierung des Thymus, wobei die charakteristische Pseudolobulierung erst ab dem 82. Tag pränatal zu erkennen ist. Ab dem 91. Tag ist die typische Gliederung des Organes in Medulla und Kortex erkennbar und es werden erstmals Hassall'sche Körperchen beobachtet. Des Weiteren ist jetzt eine sichere lichtmikroskopische Differenzierung von vier unterschiedlichen Epithelzelltypen möglich. Dendritische Zellen und Ammenzellen werden ab dem Tag 100 beobachtet.

Es können beim Marmosetthymus vier verschiedene Epithelzelltypen voneinander unterschieden werden: Typ 1-Epithelzellen befinden sich im subkapsulären/subtrabekulären Kortex, Typ 2-Epithelzellen sind kortikale Zellen (wobei hier nicht wie beim Menschen eine weitere Unterteilung nach der Helligkeit des Zytoplasmas vorgenommen wurde), medulläre Thymusepithelzellen werden als Typ 3- sowie Typ 4-Zellen bezeichnet. Die Typ 4-Zellen bilden vermutlich, ähnlich wie die Typ 6-Epithelzellen beim Menschen, die Hassall'schen Körperchen.

Hassall'sche Körperchen sind auch beim Marmoset ausschließlich in der Thymusmedulla zu finden. Die Epithelzellen, welche die Hassall'schen Körperchen formatieren, weisen eine Vielzahl von Zytoplasma-Ausläufern auf, welche Kontakte zu den Thymozyten innerhalb der Medulla herstellen. Daraus lässt sich vermutlich schließen, dass die Hassall'schen Körperchen in die T-Zell-Entwicklung involviert sind.

Eine weitere Gruppe von Epithelzellen stellen die Ammenzellen (thymic nurse cells, TNC) dar. Beim Marmoset werden diese Zellen nur im Kortex beobachtet und weisen eine starke Ähnlichkeit mit Typ 2-Zellen auf. Die TNC besitzen Zellfortsätze, mit denen sie lymphozytäre Zellen umschließen.

Die dendritischen (interdigitierenden) Zellen zählen nicht zu den Epithelzellen, sondern entstammen der monozytär-phagozytierenden Zellreihe und sind beim Marmoset bevorzugt im Thymusmark lokalisiert. Auch diese Zellen besitzen Zellausläufer, mit denen sie wie die TNC Lymphozyten umschließen.

Die Thymi von Mensch und Marmoset weisen, unter Berücksichtigung einzelner Besonderheiten, eine sehr hohe Vergleichbarkeit auf (Stolterfoth 1990).

1.4 TE-Antikörper

TE-Antikörper sind monoklonale Antikörper, die zur Identifikation von Thymusepithelzellen entwickelt wurden.

Der Antikörper TE-3 richtet sich beim Menschen gegen ein intrazellulär gelegenes Antigen kortikaler Thymusepithelzellen. Dieser Antikörper ist nicht thymusspezifisch, auch in zahlreichen anderen Geweben, wie zum Beispiel dem Stratum basale der Haut, neuronalen Zellen des Gehirns oder den Hepatozyten der Leber, finden sich TE-3-positive Zellen. TE-3-positive Zellen lassen sich erst ab der 10. Schwangerschaftswoche, zu einem Zeitpunkt der vermehrten Einwanderung von lymphatischen Zellen, im humanen Thymus beobachten. Daher wird vermutet, dass das TE-3 Antigen eine epitheliale Zellfunktion bzw. ein Differenzierungsstadium darstellt, welches mit der Besiedelung des fetalen Thymus mit Lymphozytenvorstufen assoziiert und/oder durch diese induziert ist (McFarland et al. 1984).

Ein Oberflächenantigen medullären endokrinen Epithels sowie die subkapsuläre Zellschicht des Kortex werden vom Antikörper TE-4 markiert, wohingegen TE-7 mit der Thymuskapsel, den Septen sowie Fibroblasten reagiert. Auch diese beiden Antikörper sind nicht thymusspezifisch: TE-4 reagiert nicht mit anderen endokrinen Epithelzellen, aber dafür mit basalen Keratinozyten des squamösen Epithels von Haut, Tonsillen, Ösophagus und Konjunktiven; TE-7 markiert bei einer Vielzahl von menschlichen Geweben fibröses Stroma (Haynes et al. 1984).

Antikörper	Spezifität
TE-3	kortikales Thymusepithel, intrazellulär
TE-4	medulläres endokrines Thymusepithel
TE-7	Thymuskapsel, Septen, Fibroblasten
TE-8	Hassall'sche Körperchen, Außenschicht
TE-15	Hassall'sche Körperchen, Granula
TE-16	Hassall'sche Körperchen, Außenschicht
TE-19	Hassall'sche Körperchen, Außenschicht

Tabelle 1.3: Monoklonale Antikörper zur Identifizierung von humanen Thymusepithelzellen

Oberflächenantigene der Hassall'schen Körperchen werden von den Antikörpern TE-8, TE-15, TE-16 und TE-19 identifiziert. Die Reaktionsmuster dieser monoklonalen Antikörper unterscheiden sich voneinander. TE-8, TE-16 und TE-19 markieren alle Zellen innerhalb der Hassall'schen Körperchen mit Betonung der Außenschichten, TE-15 reagiert jedoch nur mit granulärem Material in den HK-Wirbeln (Haynes 1984). TE-8 und TE-15 reagieren außerdem mit dem Stratum granulosum sowie dem Stratum corneum der Haut (Singer et al. 1985).

Untersuchungen der Entwicklungsgeschichte des Thymus haben gezeigt, dass TE-4⁺ TE-7⁻ medulläre und subkapsuläre Thymusepithelzellen zu TE-8⁺ TE-15⁺ TE-4⁻ Hassall'schen Körperchen in der Thymusmedulla heranreifen (Haynes 1984). Auch in der Haut werden die Strukturen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad von den Antikörpern TE-4, TE-8 und TE-15 markiert (Singer et al. 1985), wie die Abbildung 1.3 verdeutlicht.

Antikörper	TE-4	TE-8	TE-15
Thymus	subkapsuläres und medulläres TE	HK, Außenschichten	HK, Granula
Haut	Stratum basale	Stratum granulosum	Stratum corneum

Differenzierungsgrad

Abbildung 1.3: Reaktionsmuster der TE-Antikörper in Thymus und Haut des Menschen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad
TE=Thymusepithel, HK=Hassall'sche Körperchen

1.5 Integrine

Integrine gelten als bedeutende, auf vielen Zelloberflächen vorkommende Adhäsionsrezeptoren, die sowohl während der Entwicklung als auch im erwachsenen Organismus eine sehr wichtige Rolle bei der Vermittlung von Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix sowie Zell-Zell-Interaktionen spielen (Hynes 1987, 1992). Zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle zählen außer den Integrinen auch die Selektine und andere Moleküle aus der Immunglobulin-Superfamilie (Pardi et al. 1992, Bevilacqua 1993).

Die Integrine setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen. Heute kennt man 8 verschiedene α -Untereinheiten sowie 16 β -Untereinheiten, die mindestens 22 (bekannte) unterschiedliche Heterodimere beim Menschen bilden können. Sie erkennen eine Vielzahl von Liganden, unter anderem Proteine der extrazellulären Matrix, Zelloberflächenproteine sowie Plasmaproteine (Albelda und Buck 1990, Hynes 1992, Hemler 1999). Die Abbildung 1.4 auf der folgenden Seite zeigt die schematische Darstellung eines Integrinrezeptors.

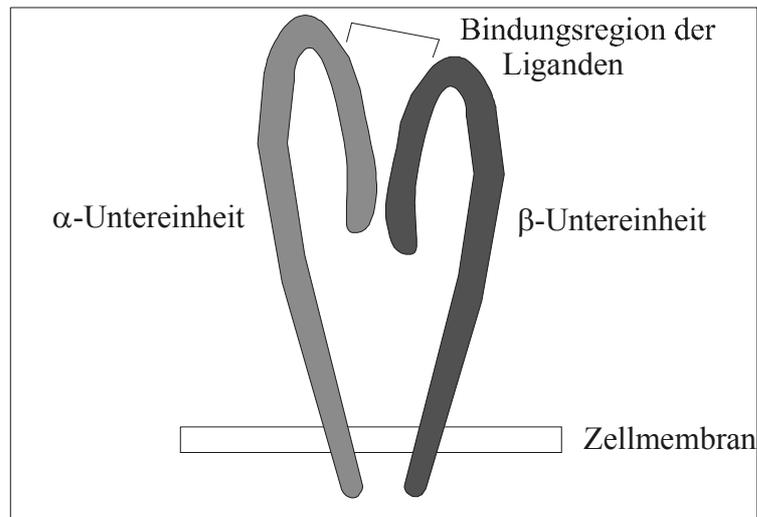


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines Integrinrezeptors

Integrin	alte Bezeichnung	CD-Nummer	Ligand
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1	CD49aCD29	Kollagen, Laminin
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2	CD49bCD29	Kollagen, Laminin
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3	CD49cCD29	Fibronektin, Kollagen, Laminin
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4	CD49dCD29	Fibronektin, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5	CD49eCD29	Fibronektin
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6	CD49fCD29	Laminin, Fertilin

Tabelle 1.4: Auswahl der β_1 -Integrine mit CD-Nummer und Ligand (nach Hynes 1992, Hemler 1999)

Untersuchungen haben gezeigt, dass Integrine in den Prozess der Kolonisation des Thymus durch T-Vorläufer-Zellen und in deren weitere Entwicklung involviert sind (Shimizu et al. 1999). Bei der Differenzierung der Thymozyten in vivo spielen Integrine eine Schlüsselrolle (Schmeissner et al. 2001). Die Thymozyten exprimieren je nach Differenzierungsgrad unterschiedliche Adhäsionsrezeptoren. Alle Thymozyten weisen das $\alpha_4\beta_1$ -Integrin auf, welches am stärksten von den $CD4^+CD8^-$ unreifen Thymozyten exprimiert wird und mit zunehmendem

Differenzierungsgrad weniger häufig anzutreffen ist. Auch andere β_1 -Integrine ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$) werden von der Mehrzahl der Thymozyten exprimiert. Die stärkste Expression findet sich bei den doppelnegativen Lymphozyten, fällt bei den $CD4^+CD8^+$ Zellen ab und nimmt bei den einzelpositiven reifen $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen wieder zu (Shimizu et al. 1999, Mojciak et al. 1995).

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass die extrazelluläre Matrix die Adhäsion von Thymozyten zu Thymusstromazellen über Integrinrezeptoren vermittelt. So induziert beispielsweise die Interaktion der Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ mit Fibronektin die zur Reifung notwendige Wanderung der Thymozyten vom Kortex in die Medulla (Crisa et al. 1996) und Interaktionen zwischen Laminin und $\alpha_6\beta_1$ unterstützen das Überleben unreifer $CD4^+CD8^+$ T-Lymphozyten im Thymus (Iwao et al. 2000). Fibronektin, Laminin und Kollagen bilden ein sehr kräftiges Netzwerk innerhalb der Thymusmedulla, der Kortex dagegen wird von sehr feinen Fasern durchzogen. Diese Komponenten der extrazellulären Matrix werden von Zellen des Thymus-Microenvironment produziert, die auch für die T-Zell-Reifung verantwortlich sind (Savino et al. 2000).

Auch bei der Differenzierung und Ausrichtung des Thymusstroma scheinen die Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle zu spielen. Für das subkapsuläre Epithel ($\alpha_1\beta_1^+$, $\alpha_2\beta_1^+$, $\alpha_3\beta_1^+$, $\alpha_6\beta_1^+$) gilt, dass die Interaktionen zwischen Integrin $\alpha_2\beta_1$ und dessen Ligand Laminin verantwortlich für die sekretorischen Funktionen dieser Epithelzellen sind (Karaoz et al. 1996, Streuli et al. 1991, Virtanen et al. 1996). Wechselwirkungen zwischen Integrinen und Kollagen des kortikalen Epithels ($\alpha_1\beta_1^+$, $\alpha_2\beta_1^+$) sind teilweise für die morphologische Differenzierung dieser Zellen verantwortlich (Ritter und Palmer 1999).

1.6 Immuntoxizität von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)

Die Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-para-dioxin (2,3,7,8-p-TCDD) weist unter den sogenannten Dioxinen die höchste Toxizität auf. Der Begriff Dioxine bezeichnet ein Sechsringsystem mit 2 Sauerstoffatomen. Neben den 2,3,7,8-substituierten Verbindungen existieren weitere polychlorierte Dibenzo-p-dioxine (PCDD) und Dibenzofurane (PCDF) mit ähnlicher Toxizität sowie polybromierte (PBDD, PBDF) und gemischt chloriert-bromierte Isomere.

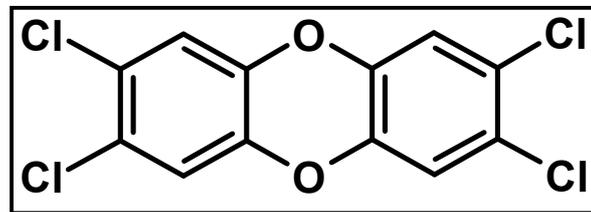


Abbildung 1.5: Strukturformel 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin

Die Dioxine werden unter anderem bei der Herstellung von 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (Entlaubungsmittel im Vietnamkrieg, „agent orange“) und Hexachlorophen (Hautdesinfektionsmittel) freigesetzt oder entstehen bei thermischen Prozessen wie zum Beispiel der Müllverbrennung. Der Benzinzusatz Dichlorethan ist für die Entstehung von Dioxinen in Autoabgasen verantwortlich.

Der Wirkmechanismus von TCDD und anderen polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen ist nicht vollständig geklärt. Eine anerkannte Hypothese besagt, dass TCDD an einem Rezeptor (Ah-Rezeptor, aromatic hydrocarbon) im Zytosol der Zelle bindet. Dieser Induktor-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und bindet dort an spezifische DNA-Sequenzen, den sogenannten „dioxin responsive elements“ (DRE). Die Transkription der DRE-enthaltenden Gene führt zur Produktion von Proteinen, die wiederum die Enzyminduktion in der Leber veranlassen (Holsapple et al. 1991a, b, Landers und Bunce 1991, Okey et al. 1994). Hierbei handelt es sich um die Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme (FME), die zu den Cytochrom P 450-Systemen gehören. Sowohl beim Menschen als auch

beim Marmoset werden durch 2,3,7,8-TCDD die Cytochrome P 450 CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 induziert (Schulz 2000).

Die Wirkungen von TCDD auf den Organismus von Säugetieren sind vielfältig und reichen von Hautschädigungen über systemische Wirkungen bis hin zu neurologischen und psychiatrischen Störungen sowie Karzinogenität (Abel 1987). Auch die immuntoxischen Wirkungen von TCDD sind in zahlreichen Studien beschrieben.

Schon lange ist bekannt, dass bereits eine geringe Dioxin-Exposition zu Thymusatrophie und Immunsuppression führen kann (Esser 1994, De Waal et al. 1997). Als mögliche Angriffspunkte für die TCDD-induzierte Thymustoxizität gelten sowohl epitheliale und lymphozytäre Komponenten des Thymus als auch die Vorstufen der Lymphozyten (Schuurman et al. 1991, De Heer et al. 1994).

Über den Mechanismus der immuntoxischen Wirkungen besteht jedoch noch immer keine Klarheit. Eine Hypothese besagt, dass die Prothymozyten aus Knochenmark und fetaler Leber schon vor der Kolonisation des Thymus durch TCDD geschädigt werden (Fine et al. 1989, Silverstone et al. 1999). Andere Arbeitsgruppen gelangten zu der Erkenntnis, dass TCDD die Reifung der Thymozyten innerhalb des Thymus behindert, wobei die doppelt positiven Lymphozyten ($CD4^+ CD8^+$) besonders empfindlich reagierten (Kerkvliet und Brauner 1990, Kamath et al. 1998, 1999).

Greenlee und Mitarbeiter favorisieren die Theorie, dass die für die T-Zell-Entwicklung essenziellen Thymusepithelzellen den primären Angriffspunkt für Dioxine und dioxinähnliche Stoffe darstellen. Für diese These sprechen Ähnlichkeiten zwischen Epithelzellen von Haut und Thymus und die Tatsache, dass sowohl Haut als auch Thymus Manifestationsorte der Dioxinwirkung darstellen (Greenlee et al. 1985, Singer et al. 1985).

Untersuchungen haben ergeben, dass die Konzentrationen von Dioxinen und Furanen im Thymus des Menschen (Riecke et al. 1999) geringer sind als die in Fettgewebe und Muttermilch gemessenen Konzentrationen (Schechter et al. 1996). Die Anteile der einzelnen Kongenere am Toxizitätsäquivalent sind in Abbildung 1.6 dargestellt. Das Kongenerenmuster

ähnelt deutlich demjenigen des Körperfettes (Mathar et al. 1998), es findet also keine spezifische Anreicherung bestimmter Stoffe statt. Ebenso wie im Körperfett kumulieren Dioxine im Laufe des Lebens auch innerhalb des Thymus (Riecke et al. 1999).

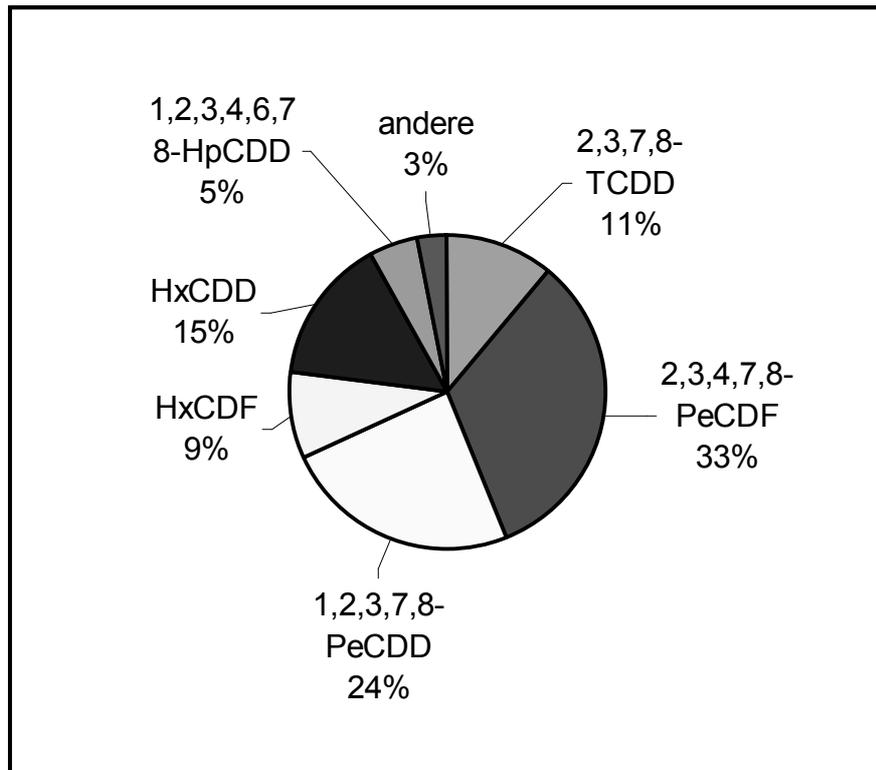


Abbildung 1.6: Anteil der Dioxin- und Furankongenere am gesamten Toxizitätsäquivalent im Thymus des Menschen (nach Riecke et al. 1999)

1.7 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit war die immunhistochemische Untersuchung von Thymusgewebe des Menschen, unbehandelter sowie 2,3,7,8-TCDD-behandelter Marmosets (*Callithrix jacchus*) mit folgenden Fragestellungen:

- Besteht eine Kreuzreaktivität spezifischer Antikörper gegen Komponenten des Thymusepithels zwischen Mensch und Marmoset (*Callithrix jacchus*)?
- Existieren Altersunterschiede innerhalb sowie zwischen beiden Spezies hinsichtlich der Ausprägung des Reaktionsmusters und der Intensität der Antikörpermarkierung?
- Sind Unterschiede bei der immunhistochemischen Untersuchung des Thymusgewebes TCDD-behandelter Marmosets im Vergleich mit unbehandelten Marmosets zu beobachten?