

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung von Thymusgewebe des Menschen

##### 3.1.1 Versuchsaufbau

Das Thymusgewebe stammte von fünf Patienten unterschiedlichen Alters und wurde im Labor zu 5 µm dicken Gefrierschnitten verarbeitet. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Untersuchung der Gefrierschnitte, wie in Kapitel 2 (Material und Methoden) beschrieben.

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Thymusgewebeentnahme zwischen 4 Tagen und 74 Jahren alt. Vier der Patienten sind weiblichen, einer männlichen Geschlechts. Bei allen Untersuchungen erwies sich das Thymuspräparat des 74-jährigen Patienten immer als negativ. Grund dafür ist vermutlich, dass in dem vorhandenen Gewebestück kein Thymusrestgewebe mehr vorhanden war.

Tabelle 3.1 fasst Alter und Geschlecht der Patienten zusammen.

<b>Präparatbezeichnung</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>
H 1	4 Tage	weiblich
H 2	6 Monate	weiblich
H 3	10 Monate	weiblich
H 4	7 Jahre	weiblich
H 5	74 Jahre	männlich

**Tabelle 3.1** : Alter und Geschlecht der untersuchten Patienten

### 3.1.2 Immunhistochemische Untersuchung von Gefrierschnitten

#### 3.1.2.1 Verwendung nicht kommerziell erhältlicher primärer Antikörper

Einige Antikörper lassen sich nicht direkt im Handel erwerben. Erhältlich sind jedoch die Hybridomzelllinien, die diese Antikörper produzieren (siehe Kapitel 2, Material und Methoden). Es folgt eine Beschreibung der Ergebnisse, die bei der immunhistochemischen Untersuchung von Thymusgewebe des Menschen mit Hilfe dieser Antikörper erzielt wurden. Diese Ergebnisse werden in den Tabellen 3.2 (Seite 45), 3.3 (Seite 46) sowie 3.4 (Seite 47) zusammengefasst.

##### *3.1.2.1.1 Antikörper TE-3*

Der Antikörper TE-3 markiert ein intrazelluläres Antigen, welches im menschlichen Thymus in Thymusepithelzellen des gesamten Kortex zu finden ist. Medulläre Thymusepithelzellen besitzen dieses Antigen nicht (Haynes 1984, McFarland et al. 1984).

In vier von fünf untersuchten menschlichen Präparaten wurden der gesamte Thymuskortex sowie die subkapsuläre kortikale Zellschicht sehr deutlich von TE-3 markiert (siehe Tabelle 3.2 auf Seite 45 und Abb. 3.1 S. 33). Auch innerhalb der Thymusmedulla reagierten ganz vereinzelte Zellen mit dem Antikörper TE-3. Der überwiegende Anteil medullärer Zellen ließ sich jedoch vom Antikörper TE-3 nicht markieren, auch die Hassall'schen Körperchen zeigten sich beim Menschen TE-3-negativ. Die TE-3 markierten Zellen im Thymuskortex entsprechen den kortikalen Thymusepithelzellen mit Zellfortsätzen (Epithelzellen Typ 2-4 nach van de Wijngaert et al. 1984, CTES-Klasse III nach Boyd et al. 1993). Die Grenze zwischen Kortex und Medulla war in den Präparaten sehr deutlich erkennbar. Bei einigen Präparaten waren innerhalb der bindegewebigen Kapsel und Septen vereinzelt langgestreckte TE-3-positive Zellen zu erkennen, die vermutlich den von McFarland und Mitarbeitern beschriebenen makrophagenähnlichen Zellen entsprechen (McFarland et al. 1984). Die Intensität der Färbung mit TE-3 war bei Neugeborenen sehr stark und wurde mit zunehmendem Lebensalter schwächer, wobei sich das Färbemuster nicht veränderte.

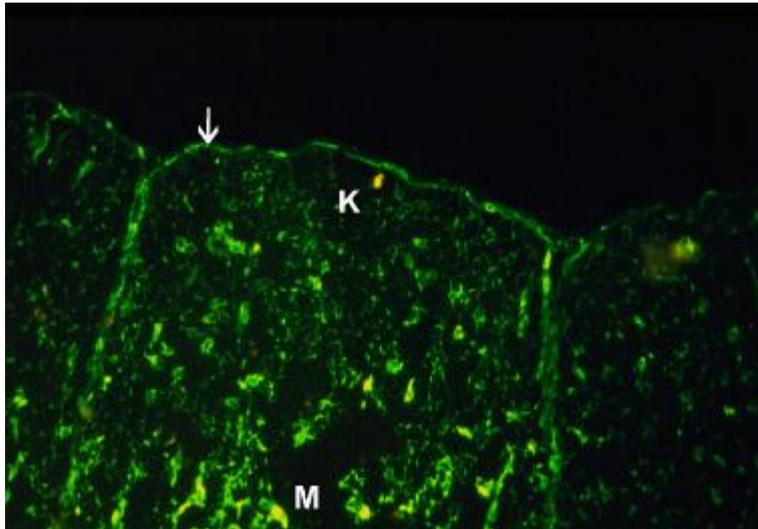
### *3.1.2.1.2 Antikörper TE-4*

Dieser Antikörper bindet ein Antigen im menschlichen Thymus, welches auf der Zelloberfläche endokriner Thymusepithelzellen im subkapsulären Kortex und in der Medulla lokalisiert ist (Haynes 1984, Haynes et al. 1984).

Bei den zwei untersuchten Thymuspräparaten vom Menschen wurden TE-4-positive Zellen im subkapsulären Kortex und in der Medulla beobachtet. Es zeigte sich bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TE-4-positiven menschlichen Thymi ein ähnliches Verteilungsmuster des Antikörpers wie von Haynes und Mitarbeitern beschrieben. Die TE-4-positiven Thymusepithelzellen in der Medulla waren klein und spindelförmig. Gut zu erkennen waren die Fortsätze dieser Zellen, die die Thymusepithelzellen miteinander verbinden und so das Zellnetzwerk des Thymus bilden. Die markierten Epithelzellen in der Thymusmedulla zählen zu den Typ 5-Epithelzellen, die Zellen im subkapsulären Kortex gehören zu den Typ 1-EZ. Innerhalb des Kortex ließen sich keine weiteren Zellen vom Antikörper TE-4 markieren. Ebenso fanden sich weder positive Hassall'sche Körperchen, noch waren bindegewebige Strukturen anfärbbar. Die Intensität der Färbung war bei allen untersuchten Thymi gleich stark ausgeprägt (Siehe Tabelle 3.2 S. 45 und 3.3 S. 46 sowie Abbildung 3.2 S. 33).

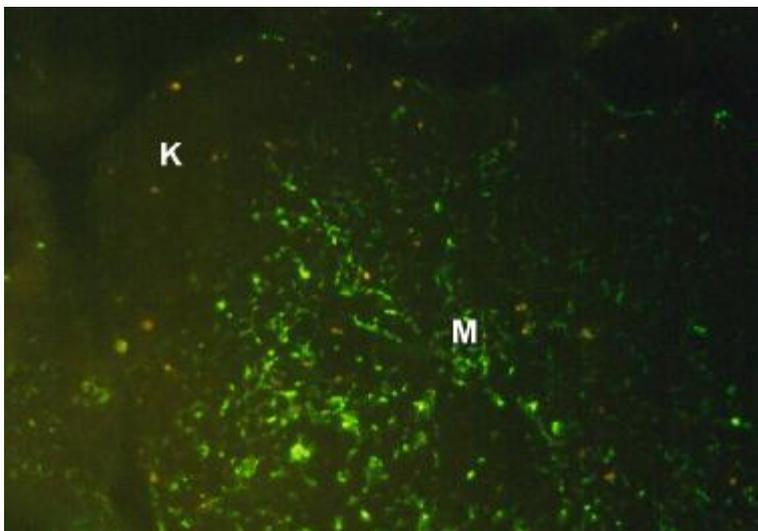
### *3.1.2.1.3 Antikörper TE-7*

TE-7 markiert im menschlichen Thymus fibröses Stroma mesodermaler Abstammung, Zellen innerhalb der Thymuskapsel und der interlobulären Septen sowie Fibroblasten (Haynes et al. 1984). Von den fünf hier untersuchten Thymuspräparaten vom Menschen erwiesen sich vier als eindeutig TE-7-positiv. Deutlich erkennbar waren die Anfärbung der Thymuskapsel und der bindegewebigen Septen durch den Antikörper (siehe Abbildung 3.3 Seite 33). Weiterhin waren durch TE-7 markierte Fibroblasten über den gesamten Thymus verteilt. Alle Präparate ähnelten sich deutlich hinsichtlich des Färbemusters sowie der starken Intensität der Färbung durch den Antikörper TE-7. Epitheliale Strukturen innerhalb des Thymus des Menschen markierte der Antikörper nicht.



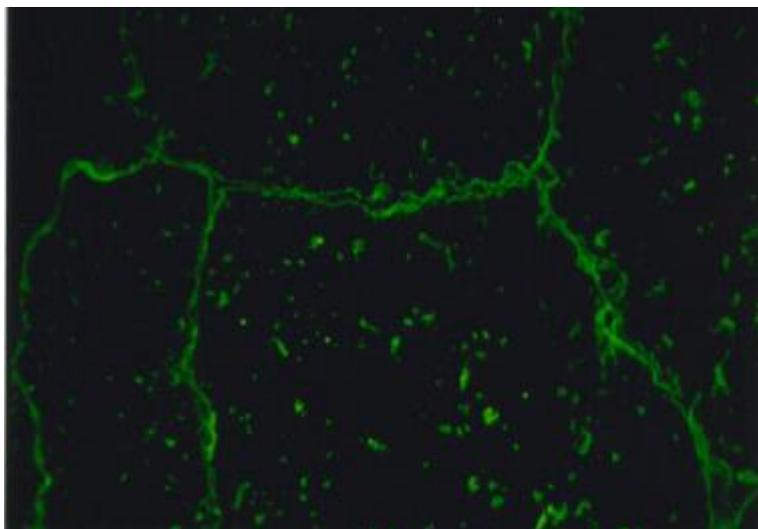
**Abbildung 3.1:**  
*Mensch, neugeboren,*  
*TE-3 (20 X)*

Deutlich erkennbar ist die Markierung kortikaler Thymusepithelzellen (K) einschließlich der subkortikalen Zellschicht (Pfeil). In der Medulla fanden sich nur vereinzelte TE-3<sup>+</sup> Zellen (M). Zum Vergleich siehe Abb. 3.13.



**Abbildung 3.2:**  
*Mensch, neugeboren,*  
*TE-4 (20 X)*

Die medullären Thymusepithelzellen (M) wurden deutlich von TE-4 markiert. Der Kortex (K) wurde nicht markiert.



**Abbildung 3.3:**  
*Mensch, neugeboren,*  
*TE-7 (20 X)*

TE-7 markiert Fibroblasten sowie Zellen innerhalb der Thymuskapsel und der interlobulären Septen beim Menschen. Mit Thymusgewebe des Marmoset reagierte TE-7 nicht.

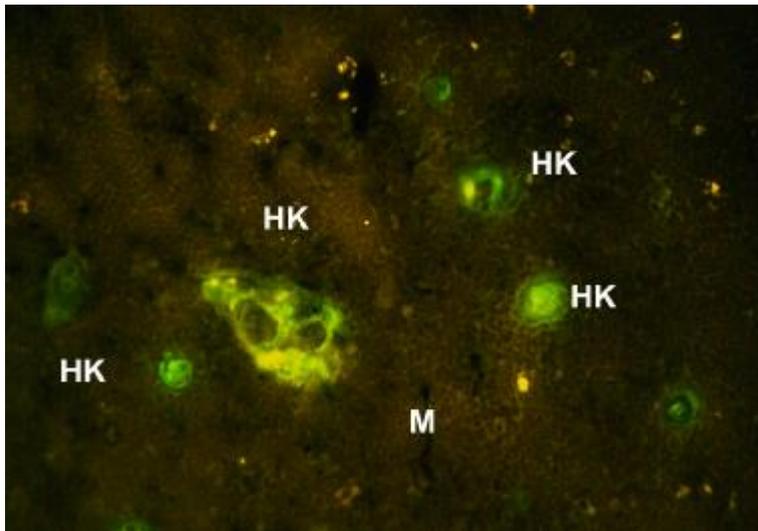
#### 3.1.2.1.4 Antikörper TE-8

TE-8 sowie die unten aufgeführten Antikörper TE-15, TE-16 und TE-19 sind Differenzierungsmarker und binden allesamt an Strukturen der Hassall'schen Körperchen. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Bindungsmuster voneinander. TE-8 markiert ausschließlich Hassall'sche Körperchen (Haynes 1984, Lobach et al. 1985).

Vier von fünf Thymuspräparaten des Menschen zeigten eine deutliche Markierung der Hassall'schen Körperchen in der Thymusmedulla durch TE-8 (CTES-Klasse V). Sowohl die äußeren, wie von Haynes 1984 beschrieben, als auch die inneren Schichten der Hassall'schen Körperchen wurden von TE-8 markiert. Auch die zahlreichen Granulae im Inneren der Hassall'schen Körperchen zeigten sich TE-8-positiv. Die typische Zwiebelschalenstruktur der Hassall'schen Körperchen wurde durch die Antikörpermarkierung sehr deutlich. Zellen in unmittelbarer Umgebung der HK (Epithelzellen Typ 6) reagierten nicht mit dem Antikörper TE-8.

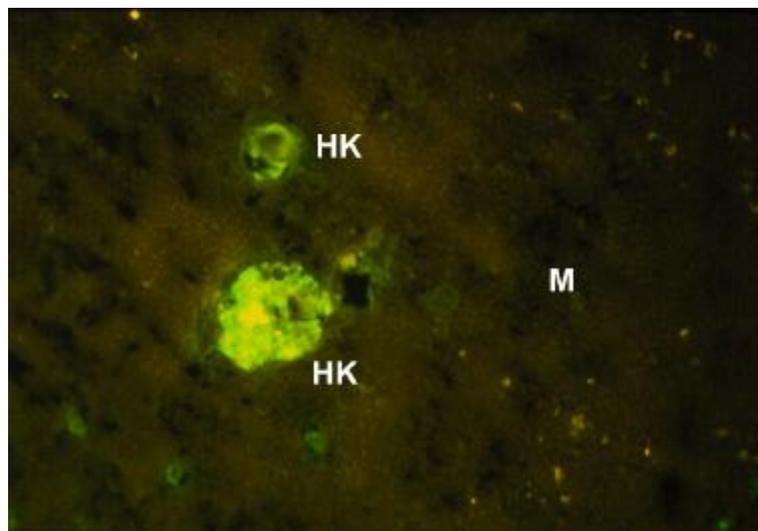
Bei Neugeborenen waren sehr viele kleine Hassall'sche Körperchen und nur wenige große, mit granulärem Material angefüllte HK zu beobachten. Auch bei den kleinen Hassall'schen Körperchen war die typische zwiebelschalenartige Struktur schon deutlich erkennbar. Es hatte den Anschein, als würde die Anzahl der großen, prall mit Granula gefüllten Hassall'schen Körperchen mit zunehmendem Alter des Menschen größer werden und die eher kleinen Hassall'schen Körperchen mit zunehmendem Lebensalter seltener zu beobachten sein. Allerdings ließ sich bei dieser Untersuchung keine Aussage über die absolute Zahl der Hassall'schen Körperchen treffen, da immer nur kleine Ausschnitte des gesamten Thymus zur Verfügung standen.

Es fanden sich keine weiteren Strukturen im Thymus, die sich durch den Antikörper TE-8 markieren ließen (siehe Tabelle 3.2 S. 45, Tabelle 3.3 S. 46 und Abbildung 3.4 und 3.5 auf der folgenden Seite). Die Intensität der Färbung war bei allen Schnitten ähnlich stark.

**Abbildung 3.4:**

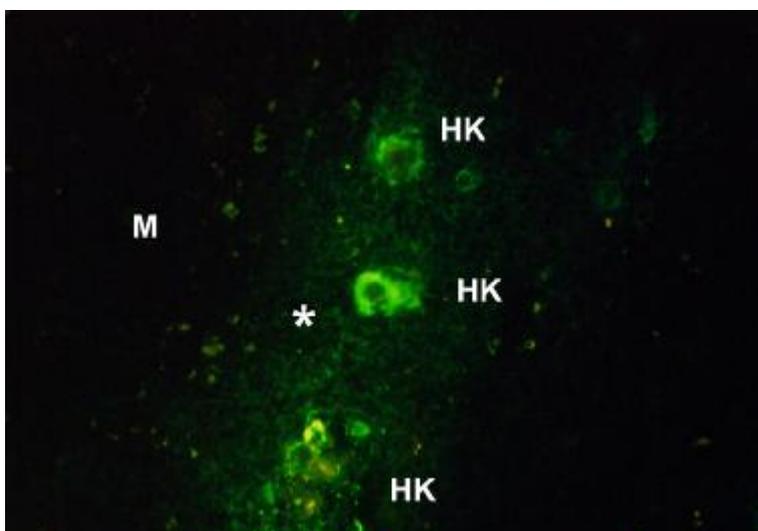
*Mensch, neugeboren,  
TE-8 (20 X)*

Anfärbung kleiner sowie großer, mit zahlreichen Granulae gefüllter HK innerhalb der Thymusmedulla (M). Die typische Zwiebelschalenstruktur ist gut erkennbar.

**Abbildung 3.5:**

*Mensch, 7 Jahre, TE-8  
(20 X)*

TE-8<sup>+</sup> Hasall'sche Körperchen (HK) innerhalb der Thymusmedulla (M).

**Abbildung 3.6:**

*Mensch, neugeboren,  
TE-15 (20 X)*

TE-15 markiert mehrere HK innerhalb der Medulla (M), wobei die inneren Strukturen betont werden. Ein Netzwerk von TE-Zellen in der Umgebung der HK (\*) wurde ebenfalls markiert.

#### *3.1.2.1.5 Antikörper TE-15*

Auch TE-15 gehört zu den Antikörpern, die spezifisch Strukturen der Hassall'schen Körperchen markieren. TE-15 reagiert bevorzugt mit granulärem Material im Inneren der HK (Haynes 1984, Lobach et al. 1985).

Bei den positiven menschlichen Thymuspräparaten waren die Hassall'schen Körperchen sehr deutlich von TE-15 in ähnlich starker Intensität markiert worden. Allerdings zeigte sich, dass TE-15 nicht nur mit granulären Strukturen in den Hassall'schen Körperchen reagierte, sondern auch in ihrer Gesamtheit angefärbt wurden. Darüber hinaus erwiesen sich auch die Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Hassall'schen Körperchen, die Typ 6-Epithelzellen, als deutlich TE-15-positiv.

Diese TE-15-markierten Zellen umschließen die Hassall'schen Körperchen wie ein Ring und bilden ein Netzwerk. Bei einem 10 Monate alten menschlichen Säugling schien die Zahl der TE-15 markierten Typ 6-EZ in der Umgebung der HK geringer zu sein als bei einem Neugeborenen. Die Vermutung, dass die Zahl der TE-15-positiven Zellen in der Umgebung der Hassall'schen Körperchen beim Menschen mit zunehmendem Alter abnimmt, sollte durch eine größere Zahl untersuchter Präparate weiter untermauert werden. Es fanden sich keine weiteren TE-15<sup>+</sup> Zellen in den Gefrierschnitten vom Menschen (siehe Abbildung 3.6 S. 35).

#### *3.1.2.1.6 Antikörper TE-16*

Beim Menschen reagiert der Differenzierungsmarker TE-16 nach Angaben früherer Publikationen mit allen zellulären Bestandteilen innerhalb der Hassall'schen Körperchen mit Betonung der Außenschichten (Haynes 1984, Lobach et al. 1985).

Das Antigen, welches sich durch den Antikörper TE-16 markieren lässt, fand sich nur in zwei von fünf untersuchten menschlichen Präparaten (siehe Tabelle 3.2 S. 45). In beiden TE-16<sup>+</sup> Thymuspräparaten war die Intensität der Färbung sehr gering. Die Anfärbung der Hassall'schen Körperchen war gut erkennbar, sowohl innere Strukturen als auch die äußeren

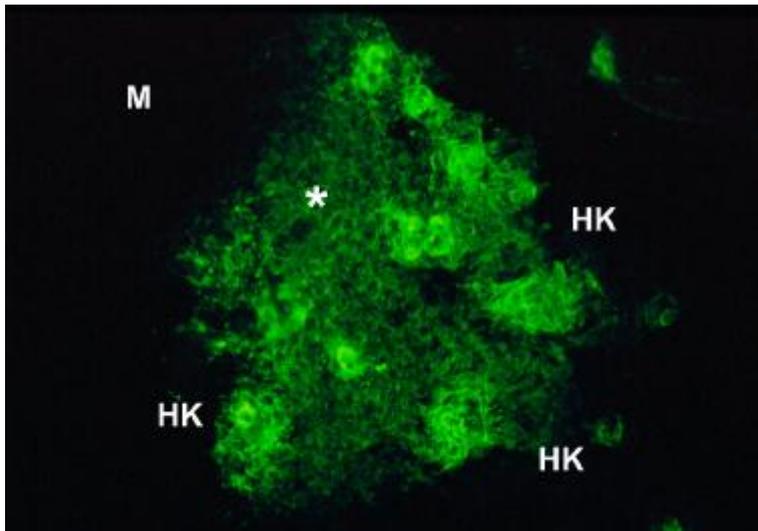
Schichten wurden durch den Antikörper markiert. Die markierten HK entsprechen der CTES-Klasse V, Typ 6-Epithelzellen in unmittelbarer Umgebung der HK reagierten nicht mit TE-16. Es fanden sich weder in Kortex und Medulla weitere TE-16-positive Zellen, noch waren bindegewebliche Strukturen angefärbt (siehe Tabelle 3.3 S. 46).

#### *3.1.2.1.7 Antikörper TE-19*

Hierbei handelt es sich wiederum um einen Differenzierungsmarker, der nach Angaben der Erstbeschreibung alle Bestandteile der Hassall'schen Körperchen, mit Betonung der Außenschichten, markiert (Haynes 1984).

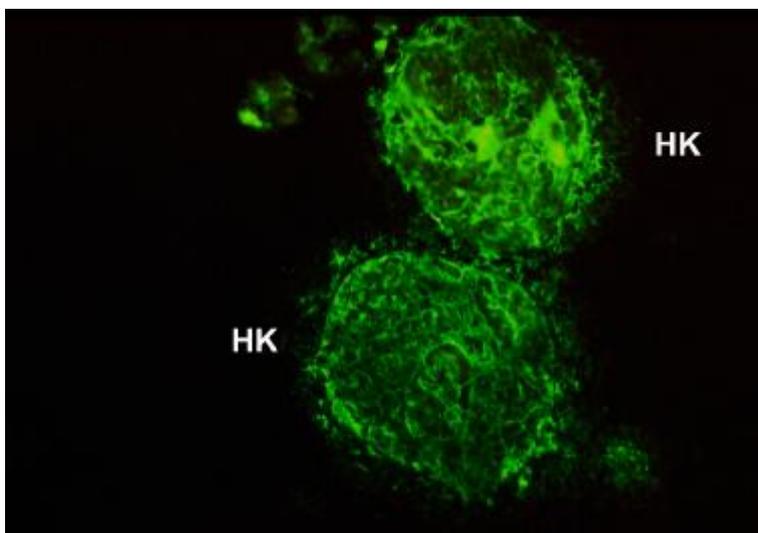
Die Behandlung der Thymusgefrierschnitte des Menschen mit dem Antikörper ergab eine Färbung von sehr starker Intensität, vier von fünf Präparaten waren deutlich TE-19-positiv (siehe Tabelle 3.2 S. 45). Es wurden die Hassall'schen Körperchen in ihrer Gesamtheit sehr deutlich markiert, wobei die charakteristische Zwiebelschalenstruktur sehr gut zu erkennen war. Interessanterweise reagierten auch eine Vielzahl von Zellen in der unmittelbaren Umgebung der HK (Typ 6-Epithelzellen) mit dem Antikörper. Es wurde beobachtet, dass die Zahl dieser Zellen sowohl mit zunehmender Größe der Hassall'schen Körperchen als auch mit zunehmendem Alter der Patienten abnahm. Um über diese Beobachtungen eine valide Aussage zu treffen, müssten jedoch noch weitere Individuen unterschiedlichen Alters untersucht werden.

Die Intensität der Färbung war bei allen TE-19-positiven Präparaten vergleichbar stark ausgeprägt. Weitere TE-19-positive zelluläre Strukturen innerhalb des Thymus wurden bei der hier vorliegenden Untersuchung nicht gefunden (siehe Tabelle 3.3 S. 46). Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Antikörpermarkierung mit TE-19.



**Abbildung 3.7:**  
*Mensch, neugeboren,*  
*TE-19 (20 X)*

Eine Gruppe von HK in der Medulla (M) wird stark von TE-19 markiert. Die Zwiebelschalenstrukturen sind gut erkennbar. Eine Vielzahl von Zellen in der Umgebung der HK (\*) reagierten ebenfalls mit dem Antikörper.



**Abbildung 3.8:**  
*Mensch, 7 Jahre, TE-19*  
*(20 X)*

Deutlich wurden hier zwei sehr große HK angefärbt. Sowohl die inneren Strukturen als auch die äußeren Schichten wurden markiert. Nur vereinzelte Zellen in der unmittelbaren Umgebung sind TE-19<sup>+</sup>.

### 3.1.2.2 Verwendung kommerziell erhältlicher primärer Antikörper

#### 3.1.2.2.1 CD29

Der Antikörper CD29 reagiert mit der  $\beta_1$ -Untereinheit der  $\beta_1$ -Integrine, einer Gruppe von Adhäsionsmolekülen. Von den insgesamt fünf immunhistochemisch untersuchten menschlichen Thymuspräparaten erwiesen sich vier als CD29-positiv (siehe Tabelle 3.2 S. 45). Die Intensität der Färbung war bei den neugeborenen Patienten sehr stark, zeigte sich jedoch auch bei den übrigen Präparaten als stark ausgeprägt. Sämtliche Zellen innerhalb des Thymus des

Menschen einschließlich der Thymozyten wurden durch CD29 markiert, wobei vor allem die Zellumrisse sehr deutlich visualisiert wurden. Allerdings reagierten bestimmte Zellen um ein Vielfaches stärker mit dem Antikörper CD29, die Intensität der Markierung war im Vergleich zur Gesamtheit der angefärbten Zellen deutlich stärker. Diese Zellen waren ebenfalls über den gesamten Thymus verteilt, fanden sich also im subkapsulären Bereich des Kortex, vereinzelt auch im Kortex und vor allem in der Medulla. Die stark CD29-markierten Zellen wiesen unterschiedliche Formen auf. Die im Bereich des subkapsulären Kortex angefärbte Zellschicht bestand aus flachen, strangförmig angeordneten Typ 1-Epithelzellen. Innerhalb von Kortex und Medulla waren die stark CD29-markierten Zellen klein und rundlich bis spindelförmig mit Zellfortsätzen, aber auch größere dendritische Zellen wurden markiert. Diese Zellen entsprechen vermutlich medullären sowie kortikalen Thymusepithelzellen und interdigitierenden Zellen. Möglicherweise sind auch Ammenzellen (TNC) markiert, wobei eindeutige Aussagen über die Zellart nur mit Hilfe der hier angewandten Lichtmikroskopie nicht getroffen werden konnten.

Auch auf der Außenschicht und im Inneren der Hassall'schen Körperchen ließ sich die  $\beta_1$ -Untereinheit der Integrine nachweisen. Die Thymuskapsel sowie die interlobulären Septen ließen sich nicht von dem Antikörper markieren und erwiesen sich so als einzige Strukturen im humanen Thymus, bei denen die  $\beta_1$ -Untereinheit nicht nachzuweisen war (siehe Tabelle 3.4 S. 47 und Abbildung 3.9 S. 41).

#### 3.1.2.2.2 CD49a

CD49a markiert die  $\alpha_1$ -Untereinheit der  $\alpha_1\beta_1$ -Integrine (VLA-1).

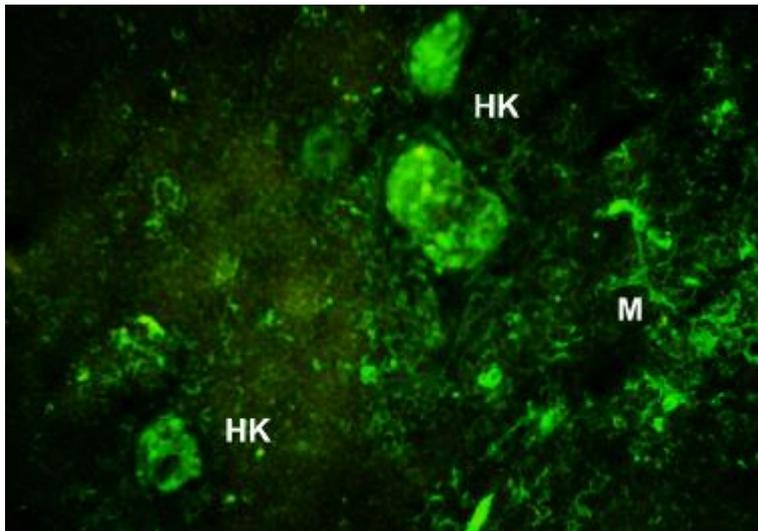
Von fünf untersuchten Präparaten erwiesen sich vier als CD49a-positiv, bei einem Präparat ließ sich die  $\alpha_1$ -Untereinheit immunhistochemisch nicht nachweisen (siehe Tabelle 3.2 S. 45 und Abbildung 3.10 S.41). Vor allem bei den Proben des Neugeborenen und der Säuglinge waren alle Zellen des Thymusgewebes einschließlich Thymozyten schwach CD49a-positiv. Weiterhin fanden sich beim Neugeborenen vor allem in der Thymusmedulla und im subkapsulären Kortexbereich sowie im Bereich der Zellschicht unterhalb der bindegewebigen

Septen stärker von CD49a markierte rundliche bis spindelförmige Thymusepithelzellen mit gut erkennbaren Zellfortsätzen. Bei den Säuglingen waren diese stärker CD49a-markierten Zellen außerdem auch im Kortex lokalisiert. Bei älteren Patienten fanden sich nur vereinzelte CD49a-positive Zellen in der Thymusmedulla und im subkapsulären Kortex. Des Weiteren wurden bei allen Patienten sowohl die äußeren als auch die inneren Schichten der Hassall'schen Körperchen sowie im Inneren gespeicherte Granulae vom Antikörper CD49a deutlich markiert.

Die Intensität der Antikörpermarkierung war insgesamt schwach ausgeprägt und nahm mit zunehmendem Alter der Patienten ab.

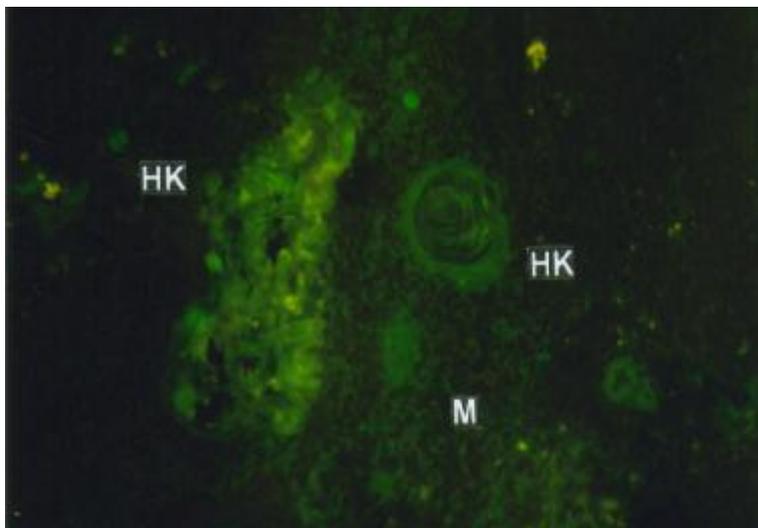
#### 3.1.2.2.3 CD49b

CD49b wird auch als VLA-2 bezeichnet und bindet die  $\alpha_2$ -Untereinheit der  $\alpha_2\beta_1$ -Integrine. Von den hier untersuchten Präparaten des Thymus des Menschen konnte bei drei Patienten das  $\alpha_2$ -Integrin immunhistochemisch nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.2 S. 45 und Abbildung 3.11 S. 41). Die Markierung mit dem Antikörper CD49b war bei dem Neugeborenen von starker Intensität, bei den älteren Patienten wurde die Intensität mit zunehmendem Alter geringer. Eine große Zahl von Thymuszellen sowohl in der Medulla als auch im Kortex schien schwach CD49b-positiv zu sein. Außerdem fanden sich in der Thymusmedulla und im Bereich des subkapsulären Kortex, vereinzelt auch im übrigen Kortex, stärker von CD49b markierte Thymusepithelzellen (siehe Tabelle 3.4 S. 47). Diese Zellen besaßen ein rundes bis spindelförmiges Aussehen mit Zellfortsätzen und ähnelten Thymusepithelzellen (Epithelzellen Typ 1 und 5) sowie dendritischen Zellen. Die Zellen waren über die gesamte Medulla verteilt und über Zellfortsätze miteinander verbunden. Im subkapsulären Kortextbereich waren sie strangförmig angeordnet. Weiterhin wurden die Hassall'schen Körperchen sowie längliche Zellen in ihrer direkten Umgebung, die vermutlich Typ 6-Epithelzellen entsprachen, von CD49b markiert. Sehr intensiv erfolgte vor allem die Markierung der äußeren Schichten der HK.



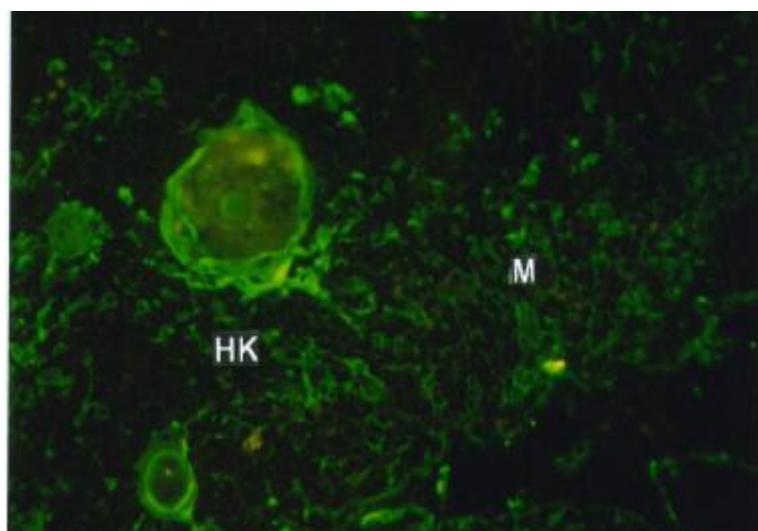
**Abbildung 3.9:**  
*Mensch, 7 Jahre, CD29*  
(20 X)

Eine Vielzahl von Zellen innerhalb des Thymus wurde schwach von CD29 markiert, in der Medulla (M) finden sich auch intensiv markierte Zellen. Auch die HK's reagierten mit dem Antikörper.



**Abbildung 3.10:**  
*Mensch, neugeboren,*  
*CD49a* (20 X)

Hassall'sche Körperchen (HK) wurden deutlich von CD49a markiert. Die CD49a<sup>+</sup> TE-Zellen in der Medulla (M) sind ebenfalls gut erkennbar.



**Abbildung 3.11:**  
*Mensch, neugeboren,*  
*CD49b* (20 X)

Die HK's reagierten mit CD49b, wobei die äußeren Schichten betont wurden. Außerdem reagierte ein Netzwerk von medullären Thymusepithelzellen (M) mit CD49b.

#### 3.1.2.2.4 CD49c

Der Antikörper CD49c richtet sich gegen die  $\alpha_3$ -Kette der Integrine. Fünf Thymuspräparate vom Menschen wurden untersucht. Die  $\alpha_3$ -Kette ließ sich mit Hilfe des Antikörpers CD49c bei vier Präparaten immunhistochemisch nachweisen (siehe Tabelle 3.2 S. 45). Auf sehr vielen Zellmembranen im Zellnetzwerk des Thymus war die  $\alpha_3$ -Integrinkette nachweisbar. So wurden eine Vielzahl von Parenchym- und Stromazellen des Thymus einschließlich der Thymozyten schwach vom Antikörper CD49c markiert. Im Bereich des subkapsulären Kortex und in der Thymusmedulla wurden außerdem stärker CD49c-positive Zellen beobachtet.

Im Bereich des subkapsulären Kortex wurde ein aus etwa ein bis zwei Zellschichten bestehender Streifen länglicher Thymusepithelzellen (Typ 1-EZ) unterhalb der Thymuskapsel beobachtet, der von CD49c markiert wurde. Die intensiv CD49c-markierten Zellen innerhalb der Thymusmedulla waren netzartig über die gesamte Medulla verteilt, besaßen ein rundliches oder auch sternförmiges Aussehen und waren über Zellfortsätze miteinander verbunden. Die Hassall'schen Körperchen wurden komplett von CD49c markiert. Sowohl die Außenschicht als auch das mit zahlreichen Granulae angefüllte Innere der Hassall'schen Körperchen sowie längliche Epithelzellen in der Umgebung (Typ 6 EZ) wurden ähnlich intensiv markiert. Die Intensität der Färbung erschien beim Neugeborenen besonders stark zu sein und nahm dann mit dem zunehmendem Alter der Patienten ab. Die hier beschriebene Lokalisation der CD49c-positiven Strukturen innerhalb des Thymus war jedoch bei allen Präparaten ähnlich.

#### 3.1.2.2.5 CD49e

Mit Hilfe des Antikörpers CD49e lässt sich die  $\alpha_5$ -Untereinheit der  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine visualisieren.

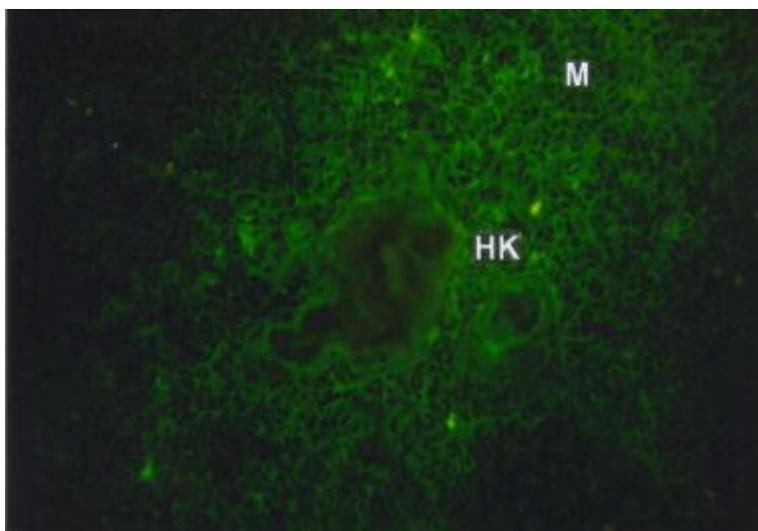
Es wurden fünf Thymuspräparate untersucht. Nur bei einem Patienten ließ sich die  $\alpha_5$ -Untereinheit mittels CD49e nachweisen, die anderen Präparate erwiesen sich als CD49e<sup>-</sup> (siehe Tabelle 3.2 S. 45). Im Thymusgefrierschnitt eines Säuglings fanden sich innerhalb der

Thymusmedulla viele schwach CD49e-positive Zellen, Kortex und SKK sowie Kapsel und Bindegewebe waren negativ. Ganz vereinzelt wurden in der Thymusmedulla stärker vom Antikörper markierte kleine Thymusepithelzellen beobachtet. Auch die Hassall'schen Körperchen (CTES V) reagierten mit CD49e, wobei vor allem die inneren Schichten markiert wurden. Die Intensität der Antikörpermarkierung war insgesamt schwach ausgeprägt.

#### 3.1.2.2.6 CD54

CD54 (ICAM-1) zählt zu den interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM).

Drei von fünf untersuchten Thymuspräparaten des Menschen waren CD54-positiv (siehe Tabelle 3.2 S. 45 und Abb.3.12). Das gesamte Thymusgewebe schien schwach CD54-positiv zu sein, das Adhäsionsmolekül ICAM-1 war vermutlich auf nahezu allen Zellen innerhalb des Thymus zu finden. Die Thymusmedulla wurde jedoch im Vergleich zum übrigen Gewebe stärker markiert. Sowohl die Hassall'schen Körperchen (CTES V) als auch die medullären Thymusepithelzellen (CTES IV, EZ Typ 5 und 6) und Thymozyten wiesen eine deutlich stärkere Fluoreszenz auf. Bei älteren Patienten nahm die Intensität der Antikörpermarkierung der Thymusmedulla zu, wohingegen kaum noch CD54-positive Zellen im Kortex beobachtet wurden. Kapsel und Bindegewebe wurden nicht von CD54 markiert (siehe Tabelle 3.4 S. 47).



**Abbildung 3.12:**  
*Mensch, neugeboren,  
CD54 (20 X)*

Deutlich markierte Zellen innerhalb der Thymusmedulla (M). In der Mitte des Bildes sind 2 CD54<sup>+</sup> HK's zu erkennen, wobei bei der Antikörpermarkierung vor allem die äußeren Schichten betont wurden.

### 3.1.2.2.7 CD58

CD58 (LFA-3) zählt zu einer Gruppe von Adhäsionsmolekülen, welche den Kontakt zwischen CD2-exprimierenden T-Lymphozyten und diversen anderen LFA-3-positiven Zellen vermitteln (Dustin und Springer 1999).

Drei von vier untersuchten Thymuspräparaten vom Menschen waren CD58-positiv. Eine Vielzahl von Zellen im Kortex und vor allem in der Medulla wurden markiert. Dazu zählen Zellen im Bereich des subkapsulären Kortex (Typ 1-EZ), kortikale und medulläre Thymusepithelzellen (EZ Typ 2-6), Thymozyten und Hassall'sche Körperchen. Kleinere, sehr intensiv gefärbte Zellen fielen innerhalb der Thymusmedulla auf. Sowohl die inneren als auch die äußeren Schichten der HK waren CD58-positiv. Viele der markierten medullären Zellen befanden sich in der Umgebung der Hassall'schen Körperchen.

Die Intensität der Antikörpermarkierung nahm mit zunehmendem Patientenalter zu.

### 3.1.2.2.8 CD61

CD61 markiert die  $\beta_3$ -Untereinheit der Integrine.

Bei allen fünf hier untersuchten Thymuspräparaten des Menschen ließ sich die  $\beta_3$ -Untereinheit mit Hilfe des Antikörpers CD61 nicht nachweisen (siehe Tabelle 3.2 S. 45).

In der Tabelle 3.2 werden alle Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen des Thymusgewebes vom Menschen zusammengefasst.

Präparat	Alter	Antikörper						
		<i>TE-3</i>	<i>TE-4</i>	<i>TE-7</i>	<i>TE-8</i>	<i>TE-15</i>	<i>TE-16</i>	<i>TE-19</i>
H1	4 Tage	+	+	+	+	+	-	+
H2	6 Monate	+	+	+	+	+	-	+
H3	10 Monate	+	/	+	+	/	+	+
H4	7 Jahre	+	/	+	+	/	+	+
H5	74 Jahre	-	/	-	-	/	-	-
<i>Anz. positiv/ Anz. gesamt</i>		4/5	2/2	4/5	4/5	2/2	2/5	4/5

Präparat	Alter	Antikörper							
		<i>CD29</i>	<i>CD49a</i>	<i>CD49b</i>	<i>CD49c</i>	<i>CD49e</i>	<i>CD54</i>	<i>CD58</i>	<i>CD61</i>
H1	4 Tage	+	+	+	+	-	+	+	-
H2	6 Monate	+	+	+	+	+	+	/	-
H3	10 Monate	+	+	+	+	-	-	+	-
H4	7 Jahre	+	+	-	+	-	+	+	-
H5	74 Jahre	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anz. positiv/ Anz. gesamt</i>		4/5	4/5	3/5	4/5	1/5	3/5	3/4	0/5

**Tabelle 3.2 :** Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchung von Thymusgewebe des Menschen

+ positive Färbung, - negative Färbung, / nicht untersucht

In den Tabellen 3.3 und 3.4 werden Lokalisation der antikörpermarkierten Strukturen im Thymus des Menschen sowie Intensität der jeweiligen Markierung unter Berücksichtigung der verschiedenen Altersgruppen der untersuchten Patienten dargestellt.

Thymusstrukturu	Altersgruppe	Antikörper						
		TE-3	TE-4	TE-7	TE-8	TE-15	TE-16	TE-19
<i>Kapsel und BW</i>	neugeboren	+	-	+	-	-	-	-
	Säuglinge	-	-	+	-	-	-	-
	juvenil	-	/	+	-	/	-	-
	erwachsen	-	/	-	-	/	-	-
<i>SKK</i>	neugeboren	+	+	-	-	-	-	-
	Säuglinge	+	+	-	-	-	-	-
	juvenil	+	/	-	-	/	-	-
	erwachsen	-	/	-	-	/	-	-
<i>Kortex</i>	neugeboren	+	-	-	-	-	-	-
	Säuglinge	+	-	-	-	-	-	-
	juvenil	+	/	-	-	/	-	-
	erwachsen	-	/	-	-	/	-	-
<i>Medulla</i>	neugeboren	-	+	-	-	-	-	-
	Säuglinge	-	+	-	-	-	-	-
	juvenil	-	/	-	-	/	-	-
	erwachsen	-	/	-	-	/	-	-
<i>HK</i>	neugeboren	-	-	-	+	+	-	+
	Säuglinge	-	-	-	+	+	(+)	+
	juvenil	-	/	-	+	/	(+)	+
	erwachsen	-	/	-	-	/	-	-

**Tabelle 3.3:** Lokalisierung und Intensität der Antikörpermarkierung mit TE-Antikörpern im Thymusgewebe des Menschen  
 + positive Färbung, (+) schwach positive Färbg., - negative Färbung, BW= Bindegewebe, SKK=subkapsulärer Kortex, HK=Hassall'sche Körperchen  
 / nicht untersucht

Thymusstrukt	Altersgruppe	Antikörper							
		CD29	CD49a	CD49b	CD49c	CD49e	CD54	CD58	CD61
<i>Kapsel und BW</i>	neugeboren	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
	Säuglinge	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
	juvenil	-	-	-	(+)	-	-	-	-
	erwachsen	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SKK</i>	neugeboren	+	+	+	+	-	(+)	+	-
	Säuglinge	+	+	+	+	-	(+)	+	-
	juvenil	+	(+)	-	+	-	(+)	+	-
	erwachsen	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kortex</i>	neugeboren	+	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+	-
	Säuglinge	+	+	(+)	(+)	-	(+)	+	-
	juvenil	+	-	-	-	-	(+)	+	-
	erwachsen	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Medulla</i>	neugeboren	+	+	+	+	-	+	+	-
	Säuglinge	+	+	+	+	(+)	+	+	-
	juvenil	+	(+)	-	(+)	-	+	+	-
	erwachsen	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>HK</i>	neugeboren	+	+	+	+	-	+	+	-
	Säuglinge	+	+	+	+	+	+	+	-
	juvenil	+	+	-	+	-	+	+	-
	erwachsen	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 3.4:** Lokalisierung und Intensität der Antikörpermarkierung mit CD-Antikörpern im Thymusgewebe des Menschen

+ positive Färbung, (+) schwach positive Färbg., - negative Färbung, BW= Bindegewebe, SKK=subkapsulärer Kortex, HK=Hassall'sche Körperchen

### 3.2 Untersuchung des Thymusgewebes unbehandelter Marmosets

#### 3.2.1 Versuchsaufbau

Das Thymusgewebe von sieben unbehandelten Tieren unterschiedlichen Alters wurde immunhistochemisch untersucht. Ähnlich wie bei der Untersuchung des menschlichen Thymusgewebes wurden sowohl im Handel erhältliche als auch nicht kommerziell erwerbliche primäre Antikörper benutzt. Das jüngste Tier war zum Zeitpunkt der Tötung einen Tag alt und das älteste Tier zwei Jahre. Zwei der sieben untersuchten Tiere waren männlichen Geschlechts. Tabelle 3.5 gibt Auskunft über Alter und Geschlecht der untersuchten Marmosets. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung wurden in den Tabellen 3.6 (Seite 61), 3.7 (Seite 62) und 3.8 (Seite 63) zusammengefasst.

Präparat	Alter	Geschlecht
M 1	2 Tage	männlich
M 2	3 Tage	männlich
M 3	1 Tag	weiblich
M 4	10 Monate	weiblich
M 5	10 Monate	weiblich
M 6	12 Monate	weiblich
M 7	24 Monate	weiblich

**Tabelle 3.5:** Alter und Geschlecht der untersuchten unbehandelten Marmosets

### 3.2.2 Immunhistochemische Untersuchung

#### 3.2.2.1 Verwendung nicht kommerziell erhältlicher primärer Antikörper

##### 3.2.2.1.1 Antikörper TE-3

Es wurden Gefrierschnitte von sieben unbehandelten Marmosetthymi mit dem Antikörper TE-3 inkubiert. Bei allen Präparaten ließ sich das durch TE-3 markierte intrazelluläre Antigen nachweisen (siehe Tabelle 3.6 S. 61). Auffällig war allerdings, dass in allen Präparaten die Thymusmedulla, und nicht, wie beim Menschen, der Kortex stark vom Antikörper TE-3 markiert wurde (siehe zum Vergleich Abb. 3.1 S. 33 und Abb. 3.13 S. 51). Es wurde eine Vielzahl kleiner, rundlicher bis spindelförmiger medullärer Thymusepithelzellen (EZ Typ 3 und 4 nach Stolterfoht 1990) angefärbt. Außerdem wurden auch größere, zum Teil makrophagenähnliche Zellen in der Thymusmedulla von TE-3 markiert, die möglicherweise dendritischen Zellen entsprechen. Viele der TE-3-positiven Zellen besaßen Zellausläufer bzw. Zellfortsätze. Die Anordnung der Zellen erfolgte zum Teil diffus über die gesamte Medulla verteilt, jedoch ließ sich auch eine strangförmige oder ringförmige Anordnung der TE-3<sup>+</sup> medullären Zellen erkennen. Auch die Hassall'schen Körperchen wurden vor allem an ihrer Außenschicht bei allen untersuchten Tieren vom Antikörper TE-3 markiert. Der subkapsuläre Bereich des Kortex war deutlich TE-3-positiv (Typ 1-EZ). Im übrigen Kortex fanden sich nur vereinzelte positive Zellen, wobei die Anzahl dieser Zellen mit zunehmendem Alter abnahm. Bei neugeborenen Tieren war die Zahl der angefärbten Zellen im Kortex am größten. Schon bei den 10 bis 12 Monate alten Tieren nahm diese deutlich ab und bei den adulten Tieren fanden sich nur selten vereinzelte TE-3-markierte kortikale Zellen im Thymus (siehe Tabelle 3.7 S. 62).

##### 3.2.2.1.2 Antikörper TE-4

Es wurden insgesamt die Thymi von fünf unbehandelten Marmosets untersucht (Tabelle 3.6 S. 61). Diese fünf Präparate zeigten sich alle TE-4-positiv. Wie beim Menschen wurden auch bei den untersuchten Marmosets durch den Antikörper die Thymusepithelzellen in der

Thymusmedulla deutlich markiert. Diese TE-4-positiven medullären Zellen (Typ 3-EZ) besaßen eine runde bis spindelförmige Konfiguration und waren durch Zellfortsätze miteinander verbunden. Die Hassall'schen Körperchen wurden nicht markiert, jedoch reagierten einige Zellen, die die HKs umgeben, mit TE-4 (vermutlich Typ 4-EZ).

Der Kortex, die Thymuskapsel und andere bindegewebige Strukturen wie die interlobulären Septen waren TE-4-negativ. Auch der subkapsuläre Bereich des Kortex wurde nicht vom Antikörper TE-4 markiert (siehe Tabelle 3.7 S. 62 und Abb. 3.14 S. 51).

#### *3.2.2.1.3 Antikörper TE-7*

Von den sieben untersuchten Thymuspräparaten der unbehandelten Marmosets erwies sich keines als TE-7-positiv, bindegewebige Strukturen und Fibroblasten ließen sich im Thymus der Marmosets nicht durch den Antikörper TE-7 nachweisen.

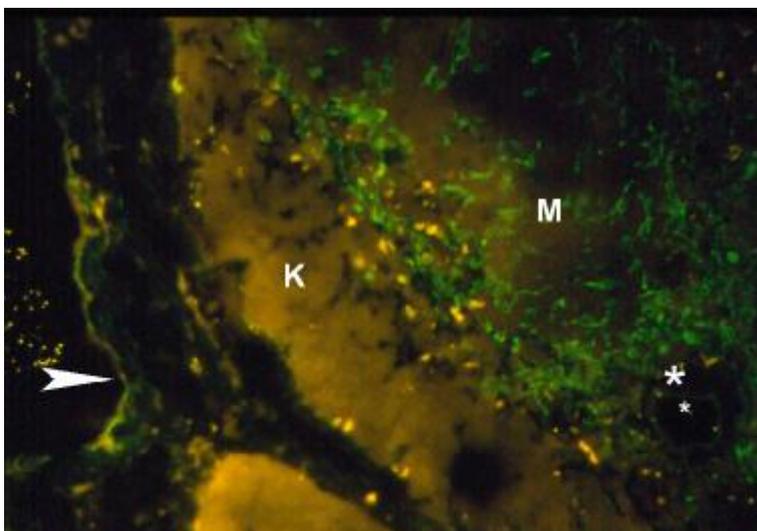
#### *3.2.2.1.4 Antikörper TE-8*

TE-8 zählt zu den Differenzierungsmarkern, die im menschlichen Thymus ausschließlich Hassall'sche Körperchen markieren. Insgesamt waren sechs Präparate unbehandelten Marmosets TE-8<sup>+</sup>. Fünf von sieben untersuchten Präparaten wiesen TE-8-markierte Hassall'sche Körperchen auf, wobei jedoch die Intensität dieser Färbungen relativ schwach war. Bei den neugeborenen Affen war die Markierung der HK durch den Antikörper am intensivsten. Die äußeren Schichten der HK wurden bei der Antikörpermarkierung betont gefärbt, aber auch die inneren Strukturen reagierten mit TE-8. Bei den neugeborenen Tieren wurden auch einige TE-8-positive Zellen in der Umgebung der Hassall'schen Körperchen beobachtet. Es fanden sich bei den Neugeborenen keine weiteren Strukturen im Thymus, die sich durch diesen Antikörper markieren ließen. Ein anderes Bild bot sich bei allen älteren Tieren. Hier gewann man den Eindruck, als seien auch vereinzelte medulläre Zellen schwach angefärbt. Der Kortex sowie das Bindegewebe erwiesen sich als negativ (siehe Tabelle 3.7 S. 62 und Abb. 3.15 S. 51).

**Abbildung 3.13:**

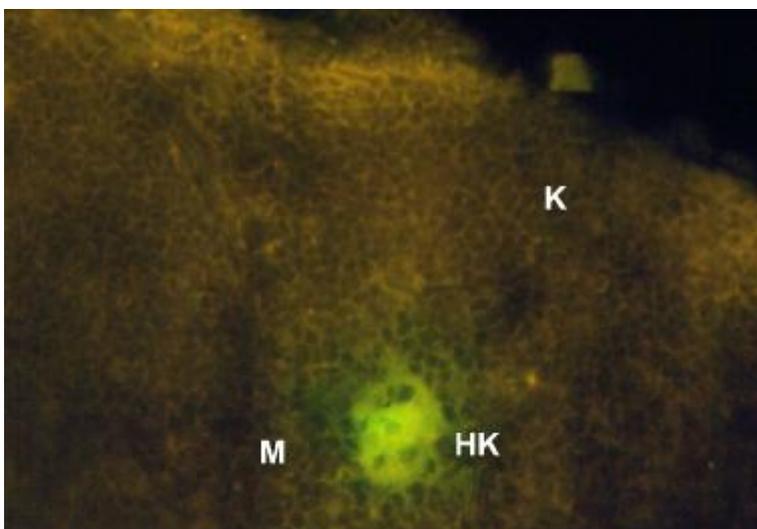
*Marmoset, unbehandelt,  
10 Monate, TE-3 (20 X)*

Im Gegensatz zum Menschen wurden hier vor allem medulläre Thymusepithelzellen (M) von TE-3 markiert und nur vereinzelt kortikale Zellen (K). Auch der subkortikale Kortex war TE-3<sup>+</sup>. Siehe zum Vergleich Abb. 3.1 S.33.

**Abbildung 3.14:**

*Marmoset, unbehandelt,  
10 Mon., TE-4 (20 X)*

Gut erkennbar die Markierung der medullären TE-Zellen durch TE-4 (M), kortikale Zellen (K) wurden nicht markiert. Die Pfeilspitze zeigt auf die Thymuskapsel, \* weist auf ein Gefäß.

**Abbildung 3.15:**

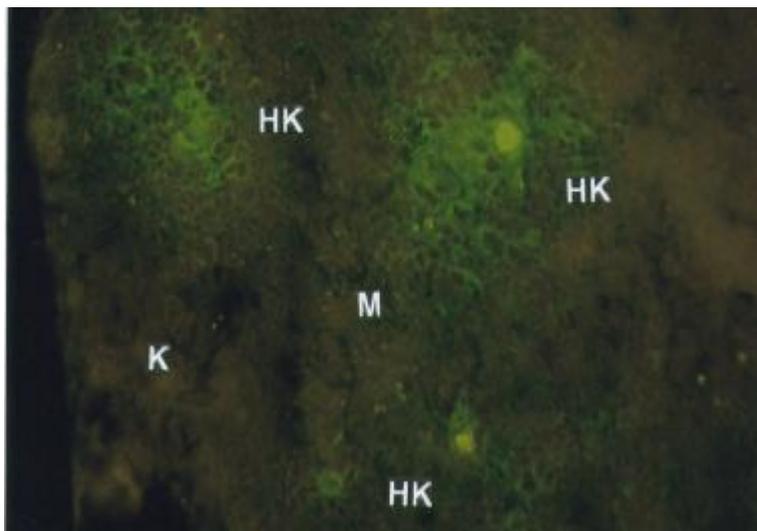
*Marmoset, unbehandelt,  
neugeboren, TE-8 (40 X)*

Markierung eines Hassall'schen Körperchens (HK) innerhalb der Thymusmedulla (M) durch den Antikörper TE-8. Sowohl die inneren als auch die äußeren Schichten reagierten mit TE-8. Kortikale Zellen (K) wurden nicht markiert.

### 3.2.2.1.6 Antikörper TE-15

Alle untersuchten Thymuspräparate waren TE-15-positiv. Ebenso wie beim Menschen wurden die Hassall'schen Körperchen durch den Antikörper TE-15 markiert. Es wurde jedoch nicht nur granuläres Material innerhalb der HK angefärbt, wie von Haynes und Mitarbeitern für den Thymus des Menschen beschrieben (Haynes 1984, Lobach et al. 1985). Auch die inneren und die äußeren Schichten der Hassall'schen Körperchen ließen sich durch den Antikörper markieren. Bemerkenswert war außerdem das Auftreten zahlreicher TE-15-positiver Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Hassall'schen Körperchen, die diese ringförmig umgaben und vermutlich den Typ 4-Epithelzellen des Marmoset (nach Stolterfoht 1990) entsprachen.

Die Intensität der Färbung insgesamt war bei allen untersuchten Marmosets stark ausgeprägt. Es fanden sich keine weiteren TE-15-positiven Strukturen im Thymusgewebe der hier untersuchten Präparate (siehe Tabelle 3.6 S. 61 und 3.7 S. 62).



**Abbildung 3.16:**  
*Marmoset, unbehandelt,  
neugeboren, TE-15 (20 X)*

Die HK in der Medulla (M) reagierten mit TE-15, wobei sowohl die äußeren als auch die inneren Schichten und Granulae markiert wurden. Außerdem wurden auch die Zellen in der Umgebung der HK vom Antikörper TE-15 markiert .

### *3.2.2.1.7 Antikörper TE-16*

Ähnlich wie bei TE-8 ergab die immunhistochemische Untersuchung der Thymusgefrierschnitte vom Marmoset mit dem Antikörper TE-16 eine Färbung von sehr geringer Intensität.

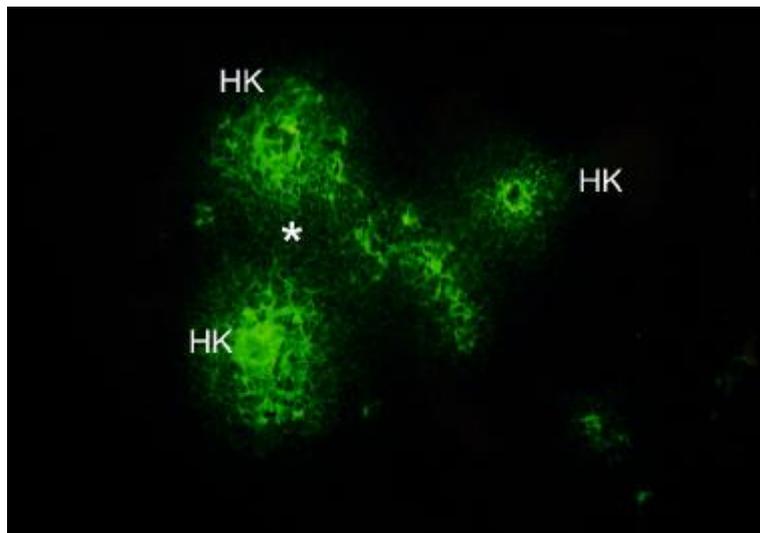
Von sieben untersuchten Thymuspräparaten waren drei Präparate TE-16-negativ. Nur bei den neugeborenen Tieren wurden schwach TE-16-markierte Hassall'sche Körperchen gefunden. Bei den neugeborenen Marmosets wurden außerdem sehr schwach TE-16-positiv Thymusepithelzellen in der Thymusmedulla beobachtet. Diese positiven medullären Zellen waren auch bei den älteren Tieren erkennbar. TE-16-markierte HK fanden sich jedoch bei den älteren Marmosets nicht. Andere zelluläre Thymusbestandteile reagierten nicht mit dem Antikörper (siehe Tabelle 3.6 S. 61 und 3.7 S. 62).

### *3.2.2.1.8 Antikörper TE-19*

Alle sieben untersuchten Marmosetthymi erwiesen sich als TE-19-positiv (siehe Tabelle 3.6 S. 61), wobei in allen Fällen eine Färbung von sehr starker Intensität beobachtet wurde.

TE-19 markierte bei allen Präparaten ausschließlich die Hassall'schen Körperchen sehr deutlich, und ähnlich wie beim Menschen war eine Vielzahl der Zellen, die die HK wie einen Ring umgaben, auch TE-19-positiv. Zu diesen Zellen zählten vermutlich sowohl medulläre Thymusepithelzellen (EZ Typ 3 und 4) als auch Thymozyten. Die inneren und äußeren Schichten der Hassall'schen Körperchen reagierten gleichermaßen intensiv mit dem Antikörper. Die Anzahl der TE-19-positiven Zellen um die Hassall'schen Körperchen herum schien auch bei den Marmosets mit zunehmendem Alter der Tiere abzunehmen. Aber wie bei der Untersuchung des Thymusgewebes des Menschen gilt auch hier die Einschränkung, dass zur Validierung dieser Vermutung die Untersuchung einer größeren Anzahl von Individuen erforderlich wäre.

Abbildung 3.17 auf der folgenden Seite verdeutlicht die Markierung von TE-19 beim Marmoset.



**Abbildung 3.17:**  
*Marmoset, unbehandelt,  
neugeboren, TE-19 (20 X)*

Eine Gruppe von Hassall'schen Körperchen (HK) innerhalb der Thymusmedulla (M) wurde von TE-19 markiert. Auch die Zellen in der Umgebung sind TE-19<sup>+</sup> (\*).

### 3.2.2.2 Verwendung kommerziell erhältlicher primärer Antikörper

#### 3.2.2.2.1 CD29

Die immunhistochemische Untersuchung mit CD29 wurde an Gefrierschnitten der Thymi von sieben unbehandelten Marmosets durchgeführt. Alle Präparate waren CD29-positiv (siehe Tabelle 3.6 S. 61). Eine Vielzahl der Zellen des Zellnetzwerk des Thymus wurde vom Antikörper CD29 schwach markiert. Intensiver markierte Zellen wurden vor allem im subkapsulären Kortex (Typ 1-EZ) und in der Thymusmedulla (EZ Typ 3 und 4) beobachtet. Im übrigen Kortex fanden sich nur selten einzelne dieser stark CD29-positiven Zellen. Auffällig war die strangförmige Anordnung der deutlich CD29-markierten Thymusepithelzellen innerhalb der Thymusmedulla.

Des weiteren reagierten auch die Hassall'schen Körperchen mit CD29, Thymuskapsel und andere bindegewebige Strukturen waren im Gegensatz dazu bei allen Präparaten negativ (siehe Tabelle 3.8 S. 63, Abbildungen 3.18 und 3.19 S. 57). Betont wurden durch die Färbung vor allem die äußeren Schichten der Hassall'schen Körperchen, allerdings wurden auch die Anfärbung der inneren Schichten sowie der Granulae beobachtet.

#### 3.2.2.2.2 CD49a

Alle sieben untersuchten Marmosetthymi erwiesen sich als CD49a-positiv (Tabelle 3.6 S. 61). Es war zu beobachten, dass eine Vielzahl Parenchym- und Stromazellen des Thymus durch den Antikörper CD49a schwach markiert wurden. Dabei wurden die Zellumrisse sehr gut erkennbar. Stärker CD49a-positive Zellen waren bei allen Tieren mit Ausnahme der Neugeborenen in der Thymusmedulla (EZ Typ 3, 4) lokalisiert. Diese Thymusepithelzellen besaßen eine zum Teil rundliche Form mit Zellfortsätzen und waren strang- oder ringförmig angeordnet.

Auch im Bereich des subkapsulären Kortex sowie entlang der bindegewebigen Septen fanden sich diese CD49a-markierten Thymusepithelzellen (Typ 1-Epithelzellen). Bei den neugeborenen Tieren hingegen fanden sich nur ganz vereinzelt stärker CD49a-positive Zellen in der Medulla, im subkapsulären Kortexbereich waren sie nicht zu beobachten. Auch Kapsel und Bindegewebe wurden bei den neugeborenen Tieren nicht von CD49a angefärbt. Bei allen anderen Tieren zeigten diese Strukturen eine schwach positive Anfärbung.

Die Hassall'schen Körperchen reagierten in allen Präparaten mit dem Antikörper, sowohl die inneren als auch äußeren Schichten wurden markiert (siehe Tabelle 3.8 S. 63). Die Antikörpermarkierung war bei allen Präparaten insgesamt von relativ schwacher Intensität.

#### 3.2.2.2.3 CD49b

Sieben Marmosetthymi wurden untersucht. Bei jedem der unterschiedlichen Thymuspräparate konnte die  $\alpha_2$ -Integrinkette mit Hilfe des Antikörpers CD49b immunhistochemisch nachgewiesen werden. Wieder wurde eine große Zahl von Parenchym- und Stromazellen des Thymus schwach von CD49b markiert. Allerdings fielen im Bereich des subkapsulären Kortex und in der Thymusmedulla intensiver von CD49b markierte Zellen auf. Diese Zellen waren zum Teil rundlich oder spindelförmig konfiguriert, besaßen Zellfortsätze und zeigten eine strang- oder ringförmige Anordnung.

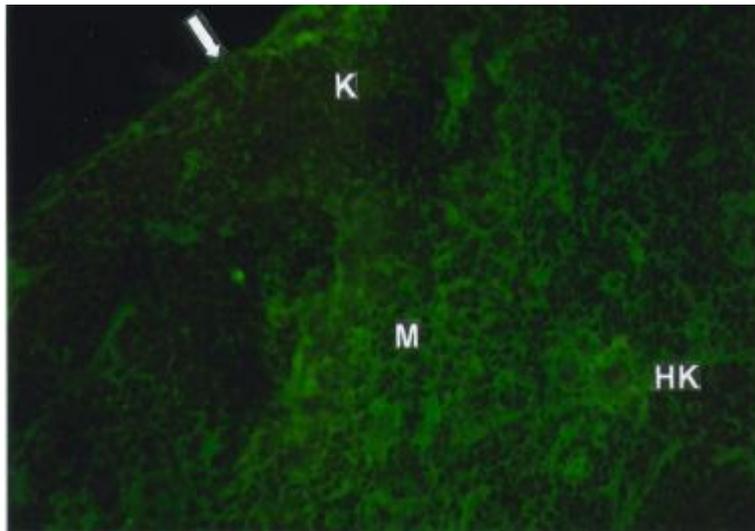
Bindegewebige Strukturen wie Thymuskapsel und Septen wurden bei allen Tieren außer den Neugeborenen schwach CD49b-markiert. Die Hassall'schen Körperchen zeigten in allen untersuchten Präparaten eine deutliche und intensive Markierung durch den Antikörper CD49b (siehe Abbildung 3.20 S. 57).

#### 3.2.2.2.4 CD49c

Die  $\alpha_3$ -Kette der Integrine ließ sich auf einer Vielzahl von Zellmembranen innerhalb des Thymus nachweisen. Alle sieben untersuchten Präparate waren mittels des Antikörpers CD49c anfärbbar (siehe Tabelle 3.6 S. 61, Abbildung 3.21 und 3.22 S. 58).

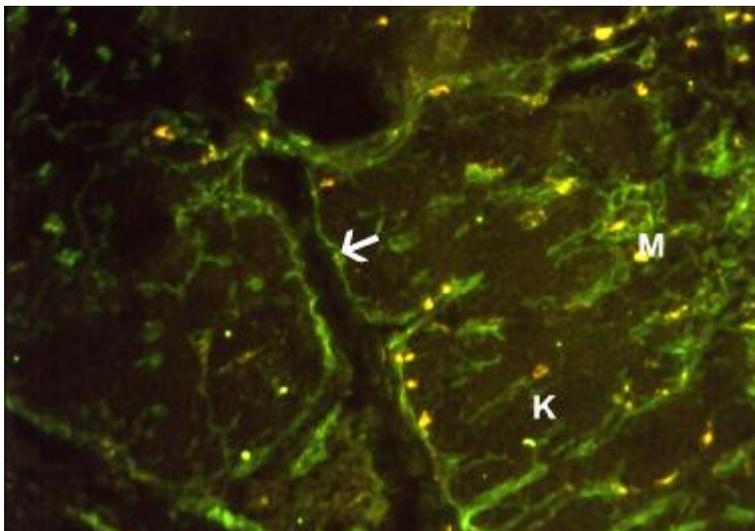
Sehr deutlich hob sich von den schwach CD49c-markierten und über den gesamten Thymus verteilten Zellen eine Vielzahl von sehr viel intensiver markierten Strukturen ab. Diese Zellen waren in der Thymusmedulla (Typ 1-EZ) und im Bereich des subkapsulären Kortex (EZ Typ 3 und 4) lokalisiert, zum Teil strangförmig angeordnet und über Zellfortsätze miteinander verbunden. Diese Stränge bestanden oft aus mehreren übereinander liegenden Zellschichten. Auffällig war außerdem, dass besonders um Gefäße herum mehrere Schichten von Zellen besonders intensiv markiert wurden.

Die Hassall'schen Körperchen waren vor allem bei den Neugeborenen intensiv CD49c<sup>+</sup>. Diese Intensität ließ sich bei den älteren unbehandelten Marmosets nicht mehr finden, die Hassall'schen Körperchen wurden hier nur schwach von CD49c markiert (siehe Tabelle 3.8 S. 63).

**Abbildung 3.18:**

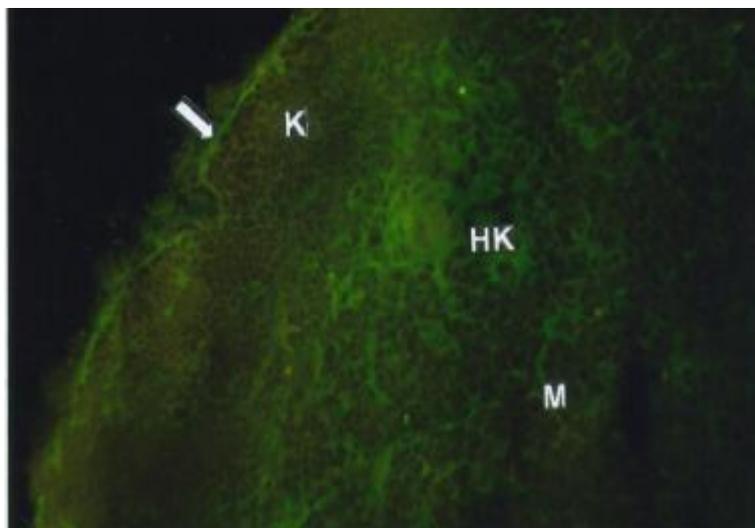
*Marmoset, unbehandelt,  
neugeboren, CD29 (20 X)*

Eine Vielzahl von Zellen innerhalb des Thymus reagierte mit CD29. Deutlich intensiver markierte TE-Zellen fanden sich im SKK (Pfeil) und in der Medulla (M) einschließlich der HK. Im Kortex (K) fanden sich schwach markierte Zellen.

**Abbildung 3.19:**

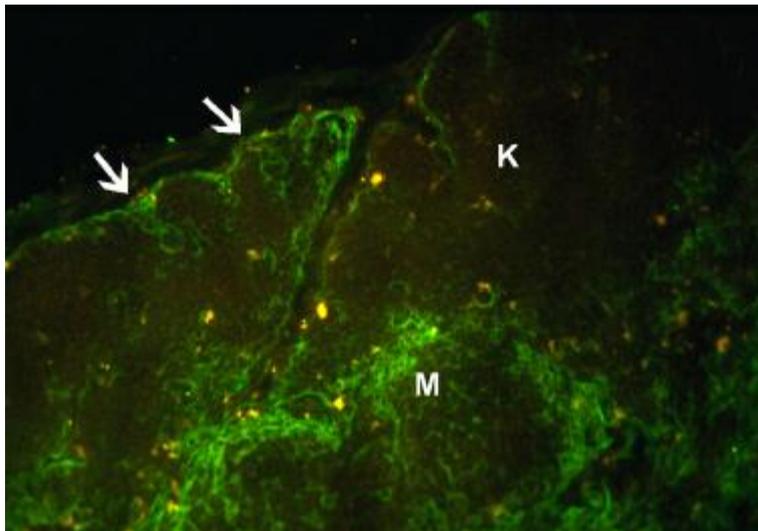
*Marmoset, unbehandelt,  
10 Monate, CD29 (20 X)*

Wie Abbildung 3.18, deutlich erkennbar die Markierung subkortikaler (Pfeil) und medullärer Zellen (M) im Thymus des Marmoset. Im Kortex (K) fanden sich vereinzelte markierte TE-Zellen.

**Abbildung 3.20:**

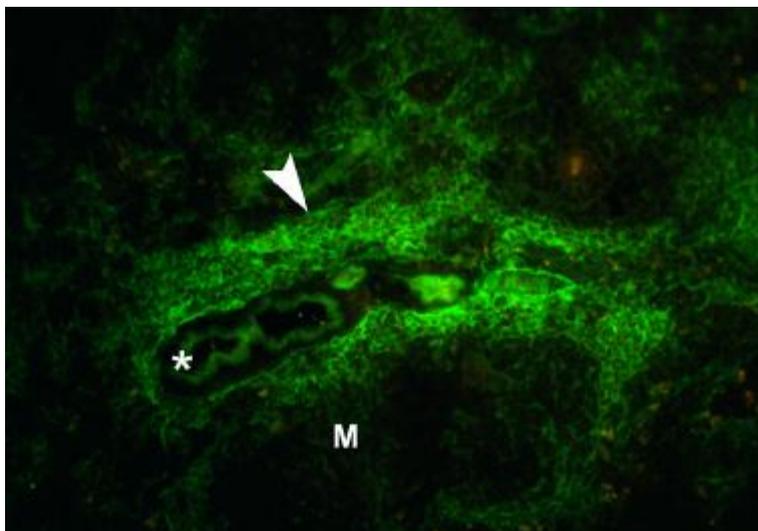
*Marmoset, unbehandelt,  
neugeboren, CD49b(20 X)*

CD49b markiert intensiv den subkortikalen Kortex (Pfeil) sowie die Thymusmedulla (M) mit HK. Im Kortex (K) fanden sich schwach markierte Zellen.



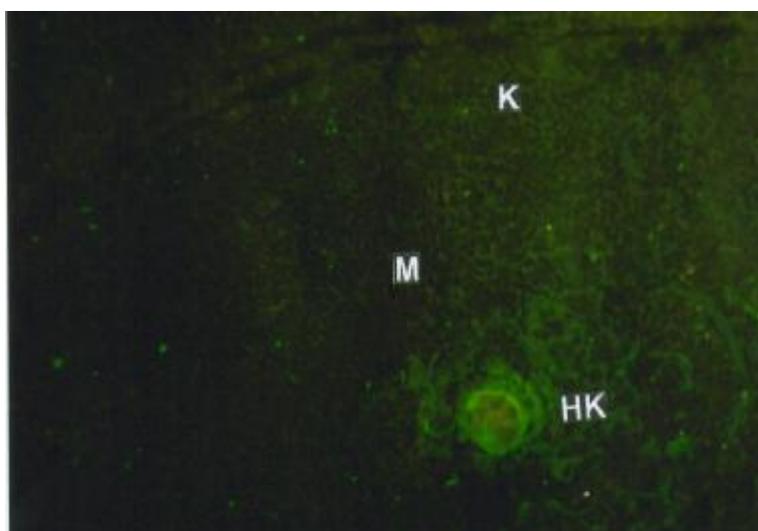
**Abbildung 3.21:**  
Marmoset, unbehandelt,  
10 Monate, CD49c(20 X)

Sowohl der subkortikale Kortex (Pfeil), der Kortex (K) als auch die Thymusmedulla (M) zeigten sich CD49c<sup>+</sup>.



**Abbildung 3.22:**  
Marmoset, unbehandelt,  
10 Monate, CD49c(20 X)

Auffällig war, dass auch die Gefäße (\*) umgebenden Zellschichten (Pfeilspitze) intensiv von CD49c markiert wurden.



**Abbildung 3.23:**  
Marmoset, unbehandelt,  
neugeboren, CD49e(20 X)

Die Antikörpermarkierung mit CD49e war von geringer Intensität. Hier wurden wenige medulläre TE-Zellen (M) sowie ein Hassall'sches Körperchen (HK) markiert. Auch im Kortex wurden vereinzelt schwach markierte Zellen beobachtet (K).

#### 3.2.2.2.5 CD49e

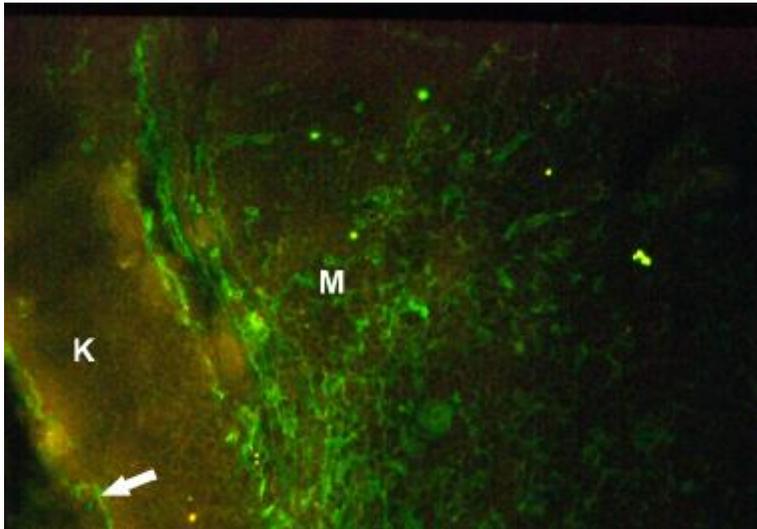
Nur zwei von sieben untersuchten Thymuspräparaten der unbehandelten Marmosets waren CD49e-positiv. Die Intensität der Färbung war bei dem 10 Monate alten Marmoset stärker als bei einem neugeborenen Tier, die Färbemuster waren bei beiden Präparaten ähnlich. Intensiv von CD49e markierte Zellen waren in der Thymusmedulla und im Bereich des subkapsulären Kortex zu beobachten. Diese Thymusepithelzellen entsprachen vermutlich den Typ 3- und Typ 4-Epithelzellen in der Medulla sowie Typ 1-EZ im subkapsulären Kortex. Auch die Hassall'schen Körperchen waren deutlich CD49e-positiv, vor allem die äußeren Schichten wurden hierbei betont (siehe Abbildung 3.23 vorherige Seite). Innerhalb des Kortex fanden sich schwach markierte Zellen. Kapsel und Bindegewebe wurden nicht von CD49e markiert.

#### 3.2.2.2.6 CD54

Sechs Thymuspräparate unbehandelter Marmosets wurden untersucht, vier waren CD54-positiv. Eine Vielzahl von Zellen innerhalb des Thymus wurde schwach von CD54 markiert. Intensiver markierte Zellen fanden sich im subkapsulären Kortex (EZ Typ 1) und innerhalb der Thymusmedulla. Hier wurden sowohl Thymusepithelzellen angefärbt, die über Zellfortsätze miteinander verbunden waren, als auch Hassall'sche Körperchen (siehe Abbildung 3.24 folgende Seite). Auch Kapsel und Bindegewebe wurden schwach von CD54 markiert. Die Intensität der Färbung nahm mit zunehmendem Alter der Individuen zu und die Zahl der im Kortex schwach markierten Zellen nahm ab.

#### 3.2.2.2.7 CD58

Die zwei untersuchten Thymuspräparate wurden von CD58 markiert (siehe Tabelle 3.6 S. 61). Hierbei wurden vor allem medulläre Thymusepithelzellen, die strangförmig angeordnet waren, markiert. Auch die Hassall'schen Körperchen waren CD58-positiv. Im Kortex fanden sich schwach positive Zellen, der SKK hingegen wurde intensiver von CD58 markiert. Kapsel und Bindegewebe zeigten sich negativ (Tabelle 3.8 S. 63).



**Abbildung 3.24:**  
*Marmoset, unbehandelt,  
neugeboren, CD54 (20 X)*

Der subkortikale Kortex (Pfeil) und medulläre TE-Zellen (M) reagierten mit CD54.

#### 3.2.2.2.8 CD61

Von den sechs untersuchten unbehandelten Marmosetthymi war kein Präparat CD61-positiv.

Tabelle 3.6 fasst die immunhistochemischen Untersuchungen des Thymusgewebes unbehandelter Marmosets zusammen. Die Tabellen 3.7 und 3.8 auf den folgenden Seiten geben Auskunft über Lokalisation und Intensität der jeweiligen Antikörpermarkierungen des Thymusgewebes der unbehandelten Tiere.

Präparat	Alter	Antikörper						
		TE-3	TE-4	TE-7	TE-8	TE-15	TE-16	TE-19
M1	2 Tage	+	+	-	+	+	+	+
M2	3 Tage	+	+	-	+	+	+	+
M3	1 Tag	+	+	-	+	+	-	+
M4	10 Monate	+	+	-	+	+	-	+
M5	10 Monate	+	+	-	-	+	-	+
M6	12 Monate	+	/	-	+	/	+	+
M7	24 Monate	+	/	-	+	/	+	+
<i>Anz. positiv/ Anz. gesamt</i>		7/7	5/5	0/7	6/7	5/5	4/7	7/7

Präparat	Alter	CD29	CD49a	CD49b	CD49c	CD49e	CD54	CD58	CD61
		M1	2 Tage	+	+	+	+	-	/
M2	3 Tage	+	+	+	+	+	+	/	-
M3	1 Tag	+	+	+	+	-	+	/	-
M4	10 Monate	+	+	+	+	+	+	/	-
M5	10 Monate	+	+	+	+	-	+	/	-
M6	12 Monate	+	+	+	+	-	-	+	-
M7	24 Monate	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>Anz. positiv/ Anz. gesamt</i>		7/7	7/7	7/7	7/7	2/7	4/6	2/2	0/6

**Tabelle 3.6 :** Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchungen des Thymusgewebes unbehandelter Marmosets mit primären Antikörpern  
+ *positive Färbung*, - *negative Färbung*, / *nicht untersucht*

Thymusstruktur	Altersgruppe	Antikörper						
		TE3	TE4	TE7	TE8	TE15	TE16	TE19
<i>Kapsel und BW</i>	neugeboren	+	-	-	-	-	-	-
	juvenil	+	-	-	-	-	-	-
	erwachsen	+	/	-	-	/	-	-
<i>SKK</i>	neugeboren	+	-	-	-	-	-	-
	juvenil	+	-	-	-	-	-	-
	erwachsen	+	/	-	-	/	-	-
<i>Kortex</i>	neugeboren	(+)	-	-	-	-	-	-
	juvenil	(+)	-	-	-	-	-	-
	erwachsen	-	/	-	-	/	-	-
<i>Medulla</i>	neugeboren	+	+	-	(+)	-	(+)	-
	juvenil	+	+	-	(+)	-	(+)	-
	erwachsen	+	/	-	-	/	(+)	-
<i>HK</i>	neugeboren	+	-	-	+	+	+	+
	juvenil	+	-	-	+	+	-	+
	erwachsen	+	/	-	+	+	-	+

**Tabelle 3.7:** Lokalisierung und Intensität der Antikörpermarkierung mit TE-Antikörpern im Thymusgewebe unbehandelter Marmosets  
+ positive Färbung, (+) schwach positive Färbg., - negative Färbung, BW= Bindegewebe, SKK=subkapsulärer Kortex, HK=Hassall'sche Körperchen, / nicht untersucht

Thymusstruktur		Altersgruppe							
		CD29	CD49a	CD49b	CD49c	CD49e	CD54	CD58	CD61
<i>Kapsel und BW</i>	neugeboren	-	-	-	(+)	-	(+)	/	-
	juvenil	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-
	erwachsen	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
<i>SKK</i>	neugeboren	+	-	+	+	+	+	/	-
	juvenil	+	+	+	+	+	+	+	-
	erwachsen	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>Kortex</i>	neugeboren	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	/	-
	juvenil	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-
	erwachsen	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	-
<i>Medulla</i>	neugeboren	+	+	+	+	+	+	/	-
	juvenil	+	+	+	+	+	+	+	-
	erwachsen	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>HK</i>	neugeboren	+	+	+	+	+	+	/	-
	juvenil	+	+	+	+	+	+	+	-
	erwachsen	+	+	+	+	-	-	+	-

**Tabelle 3.8:** Lokalisierung und Intensität der Antikörpermarkierung mit CD-Antikörpern im Thymusgewebe unbehandelter Marmosets

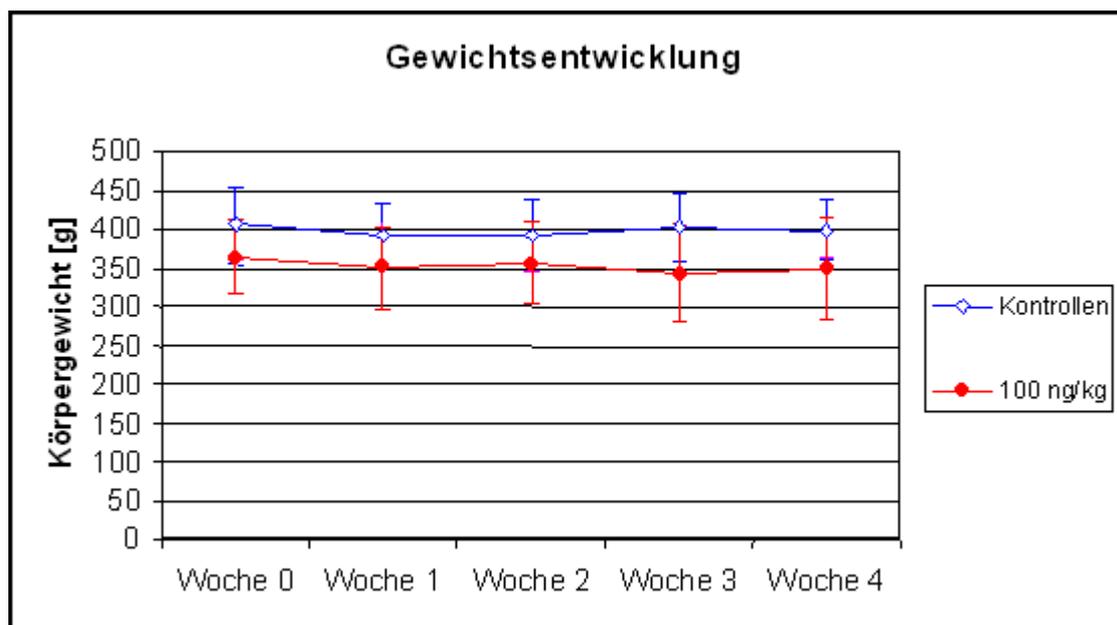
+ positive Färbung, (+) schwach positive Färbg., - negative Färbung, BW= Bindegewebe, SKK=subkapsulärer Kortex, HK=Hassall'sche Körperchen, / nicht untersucht

### 3.3 Untersuchung TCDD-behandelter Marmosets

#### 3.3.1 Körpergewichte und relative Thymusgewichte

Wie im Kapitel 2 (Material und Methoden) beschrieben, wurden die Tiere mit je einer TCDD-Dosis behandelt. Die hier untersuchten Marmosets erhielten eine Dosis von 100 ng TCDD pro kg Körpergewicht.

Die Tiere einschließlich der Kontrollgruppe wurden vor der Behandlung sowie nach der ersten, zweiten, dritten und vierten Woche nach Behandlung gewogen. In der Abbildung 3.25 ist zu erkennen, dass sich die Körpergewichte aller Tiere weder zu Beginn noch gegen Ende der Versuchsreihen signifikant voneinander unterschieden. Auch während der fünfwöchigen Beobachtungszeit kam es nicht zu signifikanten Änderungen der Körpergewichte.



**Abbildung 3.25:** Entwicklung der Körpergewichte der TCDD-behandelten Marmosets sowie der Kontrollen

### 3.3.2 Immunhistochemische Untersuchung des Thymusgewebes 2,3,7,8-TCDD-behandelter Marmosets

#### 3.3.2.1 Versuchsaufbau

Die Marmosets wurden wie in Kapitel 2 (Material und Methoden) beschrieben jeweils mit einer TCDD-Dosis von 100 ng/kg KG behandelt. Anschließend wurden die Thymi von drei der mit TCDD behandelten Marmosets immunhistochemisch untersucht.

Präparat	Alter (Wochen)	Geschlecht	TCDD-Dosis (ng/kg KG)	Versuchsende in Wochen nach Behandlung
1	55	männlich	100	4
2	62	männlich	100	2
3	63	männlich	100	4

**Tabelle 3.9:** Übersicht über Alter, Geschlecht und Behandlung der Marmosets, deren Thymi immunhistochemisch untersucht wurden

#### 3.3.2.2 Verwendung nicht kommerziell erhältlicher primärer Antikörper

##### 3.3.2.2.1 TE-3

Die Intensität der Gewebemarkierung mit TE-3 war bei den drei untersuchten Marmosets, die mit TCDD behandelt wurden, sehr ähnlich. Die Zellschichten des subkapsulären Kortexbereiches (EZ Typ 1) waren TE-3-positiv. Im übrigen Kortex wiesen nur ganz vereinzelte, eher rundlich geformte Thymusepithelzellen eine Markierung mit TE-3 auf. Im Gegensatz dazu zeigten sich sehr viele medulläre Zellen (EZ Typ 3 und 4) TE-3-positiv. Diese Zellen unterschieden sich in ihrer Form voneinander. Zum Teil fanden sich kleine runde bis spindelförmige oder langgestreckte Zellen, die vermutlich den Thymusepithelzellen entsprachen. Größere TE-3-positive Zellen innerhalb der Thymusmedulla ähnelten

Makrophagen. Auch die Hassall'schen Körperchen im Thymusgewebe aller untersuchten TCDD-behandelten Marmosets erwiesen sich als TE-3-positiv. Dabei kam es vor allem zur Markierung der Außenschicht der Hassall'schen Körperchen durch den Antikörper TE-3. Kapsel und Bindegewebe wurden nicht markiert (siehe Tabelle 3.11 S.71 und Abbildung 3.29 S. 67).

#### 3.3.2.2.2 TE-7

In keinem der drei untersuchten Thymuspräparate der mit TCDD behandelten Marmosets ließen sich TE-7-positive Zellen nachweisen.

#### 3.3.2.2.3 TE-8

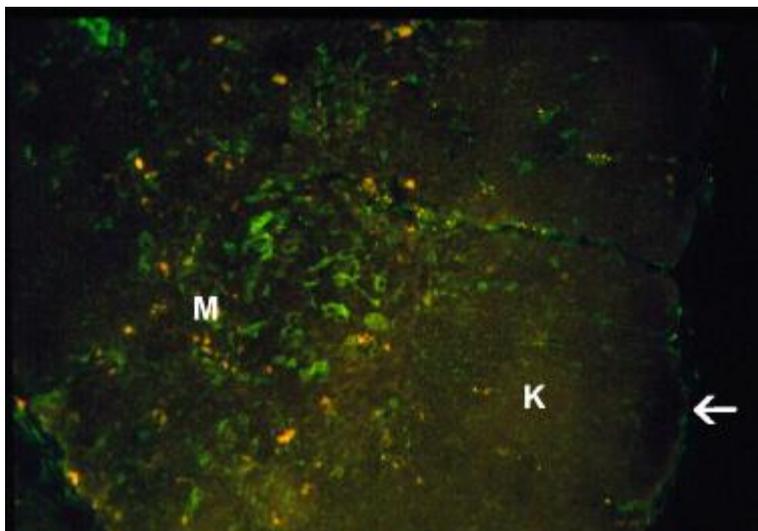
In einem der drei untersuchten Thymuspräparate der behandelten Tiere fanden sich weder TE-8-positive Hassall'sche Körperchen noch waren andere Strukturen des Thymus durch den Antikörper markiert worden. Zwei Präparate zeigten eine sehr schwache Markierung der Hassall'schen Körperchen mit TE-8. Hierbei wurden sowohl die äußeren Schichten als auch die inneren Strukturen der Hassall'schen Körperchen markiert. Zusätzlich zur Anfärbung der Hassall'schen Körperchen kam es auch zur schwachen Markierung einzelner medullärer Zellen durch den Antikörper TE-8. Einige dieser Zellen befanden sich in unmittelbarer Nähe der Hassall'schen Körperchen (EZ Typ 4), andere waren über die gesamte Medulla (EZ Typ 3) verteilt. Weitere TE-8-positive Thymusstrukturen wurden nicht gefunden.

#### 3.3.2.2.4 TE-16

Keines der drei untersuchten Thymuspräparate der behandelten Marmosets wies TE-16-markierte Hassall'sche Körperchen auf. Allerdings fanden sich sehr schwach TE-16-positive medulläre Thymusepithelzellen. Auch die Thymuskapsel bzw. die Septen waren schwach positiv. Andere Strukturen ließen sich nicht von diesem Antikörper markieren.

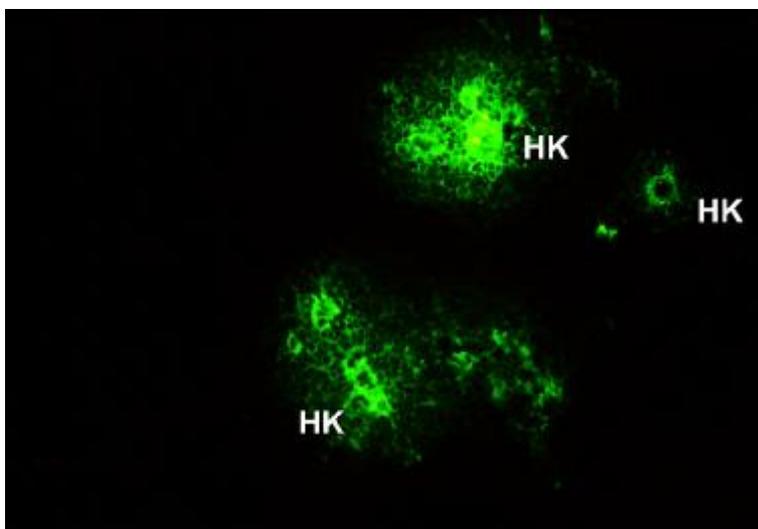
### 3.3.2.2.5 TE-19

Die drei untersuchten Thymi der TCDD-behandelten Marmosets zeigten eine sehr intensive Markierung der Hassall'schen Körperchen durch den Antikörper TE-19. Des Weiteren war eine Vielzahl von Thymusepithelzellen, welche die Hassall'schen Körperchen wie einen Ring umsäumen, TE-19-positiv (EZ Typ 4). Vor allem die äußeren Schichten der Hassall'schen Körperchen reagierten mit TE-19, aber auch innere Strukturen ließen sich durch den Differenzierungsmarker anfärben. Die Intensität der Immunmarkierung war bei allen Präparaten gleich stark ausgeprägt. Andere Thymusstrukturen markierte TE-19 nicht.



**Abbildung 3.29:**  
Marmoset, TCDD-behandelt, 15 Monate, TE-3 (20 X)

Im Gegensatz zum Menschen wurden hier vor allem medulläre Thymusepithelzellen (M) von TE-3 markiert und nur vereinzelt kortikale Zellen (K). Der subkortikale Bereich war TE-3<sup>+</sup> (Pfeil) (Vergleich Abb. 3.1 und 3.13).



**Abbildung 3.30:**  
Marmoset, TCDD-behandelt, 15 Monate, TE-19 (20 X)

Die Hassall'schen Körperchen (HK) wurden von TE-19 markiert. Auch die Zellen in der Umgebung sind TE-19<sup>+</sup> (\*) (Vergleich Abb.3.7, 3.8 und 3.17).

### *3.3.2.3 Verwendung im Handel erhältlicher primärer Antikörper*

#### *3.3.2.3.1 CD29*

Bei dieser Immunmarkierung waren eine Vielzahl von Thymuszellen schwach vom Antikörper CD29 markiert worden. Auffällig war im Gegensatz dazu eine Vielzahl von spindelförmigen oder runden vielgestaltigen Thymusepithelzellen, die stärker CD29-positiv waren und sich somit von den schwach CD29-markierten Zellen hervorhoben. Diese Zellen waren vor allem im Bereich des subkapsulären Kortex (EZ Typ 1), vereinzelt im übrigen Kortex (EZ Typ 2) und in ihrer Mehrzahl in der Thymusmedulla (EZ Typ 3, 4) lokalisiert und strangförmig angeordnet. Die Hassall'schen Körperchen waren entweder sehr schwach CD29-positiv oder aber nicht von diesem Antikörper markiert worden. Bindegewebige Septen sowie die Thymuskapsel reagierten nicht mit CD29.

#### *3.3.2.3.2 CD49a*

Bei allen drei untersuchten Thymuspräparaten der mit TCDD behandelten Marmosets zeigte sich eine in Intensität und Färbemuster vergleichbare Markierung mit dem Antikörper CD49a. Insgesamt war die Intensität der Antikörpermarkierung schwach ausgeprägt. Eine Vielzahl der netzartig angeordneten Thymuszellen war schwach CD49a-positiv. Im subkapsulären Kortexbereich bzw. entlang der interlobulären Septen und in der Medulla (EZ Typ 1, 3, 4) waren einige Thymusepithelzellen deutlich stärker markiert worden. Bei zwei Präparaten fanden sich außerdem CD49a-markierte Hassall'sche Körperchen, wobei hier vor allem die äußeren Schichten betont wurden.

#### *3.3.2.3.3 CD49b*

Eine Vielzahl der Zellen des Thymuszellnetzwerkes wurde durch den Antikörper CD49b schwach markiert. Auffällig war eine große Anzahl von stärker CD49b-positiven Zellen, die in der Thymusmedulla (EZ Typ 3, 4) und im Bereich des subkapsulären Kortex (EZ Typ 1)

lokalisiert waren. Diese Zellen waren entweder einzeln über die gesamte Medulla verteilt oder strangförmig angeordnet und über Fortsätze miteinander verbunden. Auch die Hassall'schen Körperchen wurden intensiver von CD49b markiert. Bindegewebige Strukturen wie Kapsel und Septen waren ebenfalls CD49b-positiv.

#### 3.3.2.3.4 CD49c

Vor allem im Bereich des subkapsulären Kortex und in der Thymusmedulla wurden CD49c<sup>+</sup> Zellen beobachtet. Thymusepithelzellen im Bereich der kortiko-medullären Grenze wurden besonders intensiv markiert. Im Thymuskortex fanden sich nur vereinzelte CD49c-positive Zellen. Bei allen drei Thymuspräparaten TCDD-behandelter Marmosets fanden sich auch angefärbte Hassall'sche Körperchen sowie von CD49c markierte bindegewebige Strukturen. Die Intensität der Färbung war bei allen Präparaten ähnlich stark.

#### 3.3.2.3.5 CD49e

Keines der drei hier untersuchten Thymuspräparate TCDD-behandelter Marmosets war CD49e-positiv.

#### 3.3.2.3.6 CD54

Innerhalb des Thymus wurden bei allen drei untersuchten Präparaten eine Vielzahl von Zellen schwach vom Antikörper CD54 markiert. Deutlich intensiver markierte Zellen fanden sich im subkapsulären Kortex (EZ Typ 1) und in der Thymusmedulla (EZ Typ 3, 4). Nur einzelne Hassall'sche Körperchen wurden markiert, wobei die Intensität der Antikörpermarkierung schwach war. Auch Bindegewebe war schwach CD54-positiv.

## 3.3.2.3.7 CD58

Von drei untersuchten Thymuspräparaten waren zwei CD58-positiv. Eine Vielzahl von Zellen war hierbei im Thymus schwach markiert worden, vereinzelt wurden im SKK und in der Medulla intensiver markierte Thymusepithelzellen beobachtet. CD58-positive Hassall'sche Körperchen wurden nicht gefunden, auch Kapsel und Septen wurden nicht markiert.

## 3.3.2.3.8 CD61

Die drei hier untersuchten Marmosetthymi waren CD61-negativ.

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von Thymusgewebe TCDD-behandelter Marmosets.

Präparat	Alter	Antikörper				
		TE-3	TE-7	TE-8	TE-16	TE-19
B1	55 Wo	+	-	+	+	+
B2	62 Wo	+	-	-	+	+
B3	63 Wo	+	-	+	+	+
<i>Anz. positiv/ Anz. gesamt</i>		3/3	0/3	2/3	3/3	3/3

Präparat	Alter	CD29	CD49a	CD49b	CD49c	CD49e	CD54	CD58	CD61
		B1	55 Wo	+	+	+	+	-	+
B2	62 Wo	+	+	+	+	-	+	+	-
B3	63 Wo	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Anz. positiv/ Anz. gesamt</i>		3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3	0/3

**Tabelle 3.10 :** Zusammenfassung der immunhistochemischen Untersuchungen des Thymusgewebes TCDD-behandelter Marmosets mit primären Antikörpern

Thymusstruktur	Antikörper				
	TE3	TE7	TE8	TE16	TE19
<i>Kapsel und BW</i>	-	-	-	(+)	-
<i>SKK</i>	+	-	-	-	-
<i>Kortex</i>	(+)	-	-	-	-
<i>Medulla</i>	+	-	(+)	(+)	-
<i>HK</i>	+	-	(+)	-	+

**Tabelle 3.11:** Lokalisierung und Intensität der Antikörpermarkierung mit TE-Antikörpern im Thymusgewebe TCDD-behandelter Marmosets. + *positive Färbung*, (+) *schwach positive Färbg.*, - *negative Färbung*, *BW*=Bindegewebe, *SKK*=subkapsulärer Kortex, *HK*=Hassall'sche Körperchen

Thymusstruktur	Antikörper							
	CD29	CD49a	CD49b	CD49c	CD49e	CD54	CD58	CD61
<i>Kapsel und BW</i>	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-
<i>SKK</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Kortex</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-
<i>Medulla</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>HK</i>	+	+	+	+	-	(+)	-	-

**Tabelle 3.12:** Lokalisierung und Intensität der Antikörpermarkierung mit CD-Antikörpern im Thymusgewebe TCDD-behandelter Marmosets. + *positive Färbung*, (+) *schwach positive Färbung*, - *negative Färbung*, *BW*=Bindegewebe, *SKK*=subkapsulärer Kortex, *HK*=Hassall'sche Körperchen