

## 4 Diskussion

### 4.1 Lymphozyten von Mensch und Marmoset im Vergleich

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit den Immunsystemen von Mensch und Marmoset, sodass eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zwischen beiden Spezies bekannt sind. Zwei wesentliche Aspekte hierbei waren die prä- und postnatale Entwicklung des Immunsystems sowie altersspezifische Veränderungen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und monoklonaler Antikörper wurde beispielsweise die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren auf weißen Blutkörperchen von Menschen und Marmosets unterschiedlichen Alters analysiert, um so die Reifungs- und Differenzierungsprozesse des Immunsystems besser verstehen zu können (Neubert et al. 1995, 1998, 2002).

Das Immunsystem eines neugeborenen Menschen kann aufgrund mangelnden intrauterinen Kontaktes mit Antigenen der Umwelt als unreif bezeichnet werden. Beginnend mit der Neugeborenenphase wurden beim Menschen typische Veränderungen hinsichtlich der Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren auf Lymphozyten beobachtet (Abraham et al. 1994, Neubert et al. 1998, Neubert et al. 2002). Ein gut bekanntes Beispiel hierfür ist der frühe postnatale Anstieg des Prozentsatzes von Lymphozyten, welche den CD45R0-Rezeptor an ihrer Oberfläche tragen (memory-type cells) und der gleichzeitige Abfall der Zellen mit CD45RA-Rezeptoren (naive-type cells). Diese Veränderungen resultieren aus bestehenden Wechselwirkungen zwischen menschlichem Immunsystem und zahlreichen Antigenen der Umwelt. Zum Zeitpunkt der Geburt besitzt der Mensch circa 10% CD45R0<sup>+</sup> Lymphozyten, wohingegen diese Zahl bis zur Pubertät auf 50% ansteigt.

Ein weiteres Beispiel für postnatale Veränderungen der Expression von Oberflächenrezeptoren der Lymphozyten stellt die Upregulation von verschiedenen Integrinrezeptoren auf T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) dar. Diese ansteigende Expression bei zunehmendem Lebensalter wurde bei Zellen mit  $\beta_2$ -Integrinrezeptoren ( $\alpha$ -Untereinheiten CD11a<sup>high</sup>, LFA-1 $\alpha$ ;  $\beta$ -Untereinheit CD18) oder  $\beta_1$ -Integrinrezeptoren ( $\alpha$ -Untereinheit CD49d,  $\beta$ -Untereinheit CD29) auf der Zelloberfläche beobachtet. Die altersabhängigen Veränderungen waren jedoch nicht auf

CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen beschränkt, sondern wurden in gleicher Art und Weise auch bei CD8<sup>+</sup> Lymphozyten (Suppressor-/zytotoxische Zellen) beobachtet. So wurde auch ein Anstieg von CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen beim Menschen mit zunehmendem Alter beobachtet (Neubert et al. 2002).

Beim Marmoset wurden ähnliche Veränderungen beobachtet (Förster et al. 1997). Wie beim Menschen wurden sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Lymphozyten Veränderungen der Expression von Oberflächenrezeptoren beschrieben. Die Expression des CD45RA-Rezeptors sank mit zunehmendem Lebensalter der Tiere, ein CD45R0-Rezeptor konnte jedoch beim Marmoset mit Hilfe anti-humaner Antikörper nicht gefunden werden. CD29 wurde mit zunehmendem Alter vermehrt exprimiert, ebenso wie auch der Prozentsatz CD4<sup>+</sup>CD11a<sup>high</sup> Lymphozyten anstieg. Auch der durchschnittliche Prozentsatz der CD8<sup>+</sup> Zellen stieg kontinuierlich an, wohingegen im Unterschied zum Menschen ein Abfall der CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen (zytotoxische Zellen) zu beobachten war. Ein geringer Abfall des Prozentsatzes der B-Zellen (CD20<sup>+</sup>) wurde beim Marmoset gesehen, beim Menschen jedoch nicht. Bei beiden Spezies fanden sich im Rahmen der natürlichen Variabilität auch Individuen, bei denen der Prozentsatz bestimmter Lymphozyten-Subtypen während der gesamten postnatalen Entwicklung gering blieb, ohne mit dem Auftreten einer Krankheit assoziiert zu sein. Diese Variabilität muss bei der Beurteilung möglicher pathologischer Befunde berücksichtigt werden (Neubert et al. 2002).

Die Anzahl der weißen Blutzellen liegt beim Marmoset deutlich höher als beim Menschen und auch der prozentuale Anteil der Lymphozyten unter den Leukozyten ist mit 63% (Median) nahezu verdoppelt im Vergleich zum Menschen (33% Median). Dadurch sind auch die absoluten Zahlen der verschiedenen Lymphozyten-Subtypen erhöht. Deutlich erhöht ist beim Marmoset die Anzahl der B-Zellen und der CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen, wohingegen die Zahl der CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> zytotoxischen Zellen niedriger ist als beim Menschen.

Um Aussagen über die Übertragbarkeit der im Tierexperiment neugewonnenen Ergebnisse auf den Menschen treffen zu können, wurde in ausgedehnten Studien die Kreuzreaktivität zahlreicher anti-humaner monoklonaler Antikörper mit Epitopen auf Leukozyten des Marmosets getestet (Neubert et al. 1995, Neubert et al. 2002). Von den mehr als 170 verschiedenen

getesteten Antikörpern war bei 60% eine direkte Kreuzreaktivität beim Marmoset nachweisbar, andere gegen menschliche Epitope gerichtete Antikörper zeigten keinerlei Kreuzreaktivität bei den Tieren (CD45R0, CD3). Neubert und Mitarbeiter zogen aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung, dass ein geeignetes Studiendesign unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen beiden Spezies eine gute Übertragung der mit Marmosets gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen erlaubt (Neubert et al. 2002).

#### **4.2 Kreuzreaktivität antihumaner Antikörper zu Thymusgewebe unbehandelter Marmosets**

Um mögliche Effekte von Substanzen wie beispielsweise 2,3,7,8-TCDD auf Thymusepithelzellen von Mensch und Marmoset evaluieren zu können, sollte die Kreuzreaktivität antihumaner Antikörper ermittelt werden. Riecke und Mitarbeiter haben mittels Durchflusszytometrie die Kreuzreaktivität einer Vielzahl antihumaner Antikörper mit Thymusepithelzellen des Marmoset festgestellt (Riecke et al. 2000). Bei der hier vorliegenden Arbeit wurden Gefrierschnitte des Thymusgewebes von Mensch und Marmoset immunhistochemisch untersucht. Nahezu alle der hier untersuchten Antikörper zeigten eine Kreuzreaktivität mit dem Thymusepithel des Marmoset.

Betrachtet man die Antikörper der TE-Serie, so reagierten bei der hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung alle mit Ausnahme von TE-7 mit dem Thymusgewebe des Marmoset, wobei es zum Teil zu erheblichen Unterschieden im Reaktionsmuster von Mensch und Marmoset kam. TE-3 markierte, wie auch schon von McFarland und Mitarbeitern beschrieben, innerhalb des Thymus des Menschen ausschließlich kortikales Epithel (McFarland et al. 1984). Beim Marmoset hingegen wurden nur einzelne kortikale Zellen sowie der subkapsuläre Kortextbereich von diesem Antikörper markiert, die Thymusmedulla und Hassall'sche Körperchen waren im Gegensatz zum Menschen deutlich TE-3-positiv. Wie schon in der Einleitung beschrieben, gehen einige Autoren davon aus, dass beim Menschen TE-3<sup>+</sup> kortikales Thymusepithel endodermalen Ursprungs ist und TE-4<sup>+</sup> Thymusepithelzellen in der Medulla sowie im Bereich des SKK dem Ektoderm entstammen (McFarland et al.

1984, Haynes et al. 1990). Andere Autoren favorisieren jedoch die Hypothese, dass alle Thymusepithelzellen von einer einzigen Stammzelle abstammen (Giraud et al. 1989, Ritter und Palmer 1999). Beim Marmoset könnte das Vorliegen von TE-3<sup>+</sup> medullären und kortikalen Zellen möglicherweise für die gemeinsame Abstammung aller Thymusepithelzellen sprechen. Während der Embryonalentwicklung sind auch in der Thymusmedulla des Menschen TE-3<sup>+</sup> Zellen vorhanden, deren Zahl jedoch ab der 15. Schwangerschaftswoche bei gleichzeitigem Anstieg der TE-3<sup>+</sup> kortikalen Thymusepithelzellen kontinuierlich abfällt. Ab der 25. Schwangerschaftswoche sind beim Menschen keine TE-3<sup>+</sup> Zellen in der Thymusmedulla zu beobachten (McFarland et al. 1984).

Der Antikörper TE-4 reagierte beim Menschen in ähnlicher Form wie beim Marmoset mit medullärem Thymusepithel. Der Unterschied zwischen beiden Spezies im Markierungsmuster dieses Antikörpers bestand darin, dass beim Menschen auch Epithel im subkapsulären Kortextbereich TE-4-positiv war, beim Marmoset dagegen nicht.

Auch bei den Differenzierungsmarkern TE-8, TE-15, TE-16 und TE-19 war eine Kreuzreaktivität erkennbar. TE-8 und TE-16 markieren Hassall'sche Körperchen unter Betonung der äußeren Schichten. Beim Menschen wurden die HK deutlich von TE-8 markiert und die typische Zwiebelschalenstruktur wurde gut sichtbar. Alle Schichten der HK wurden markiert, die äußeren Schichten wurden dabei besonders stark angefärbt. Andere Strukturen innerhalb des Thymus sind hier wie auch bei der Erstbeschreibung nicht von TE-8 markiert worden (Haynes 1984, Lobach et al. 1985). Die Intensität der Antikörpermarkierung mit TE-8 von Thymusgewebe des Marmoset war im Vergleich zum Menschen schwächer, bei einigen Präparaten waren keine TE-8-positiven Hassall'schen Körperchen beobachtet worden. Das Färbemuster war jedoch mit dem der menschlichen Präparate vergleichbar. Allerdings beschränkte sich die Antikörpermarkierung bei neugeborenen Marmosets nicht nur auf die HK, auch medulläre Thymusepithelzellen in naher Umgebung der HK wurden schwach von TE-8 markiert. Nur einige der untersuchten Thymuspräparate von Mensch und Marmoset waren TE-16-positiv, wobei die Färbung bei beiden Spezies ähnlich schwach ausgeprägt war. Wie von Haynes 1984 und Lobach und Mitarbeitern 1985 beschrieben, wurden bei den hier durchgeführten Untersuchungen bei Mensch und Marmoset die HK von TE-16 markiert. Außerdem fanden sich beim Marmoset schwach TE-16-positive Zellen innerhalb der Thymusmedulla,

die beim Menschen nicht beobachtet wurden. Der Antikörper TE-19 markierte bei beiden Spezies die Hassall'schen Körperchen, die Färbung war jeweils von starker Intensität. Im Gegensatz zur Erstbeschreibung (Haynes 1984, Lobach et al. 1985) wurde zusätzlich zur Anfärbung der HK durch TE-19 auch ein Netzwerk von medullären Thymusepithelzellen in deren unmittelbarer Umgebung von diesem Antikörper markiert. Diese Thymusepithelzellen umgaben die HK ringförmig und entsprachen möglicherweise den Typ 6-Epithelzellen (beim Menschen) bzw. den Typ 4-EZ (beim Marmoset). Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung mit TE-19 spricht also für die These, dass es sich bei den Hassall'schen Körperchen um ein Endstadium der Differenzierung medullärer Thymusepithelzellen handelt (Nicolas et al. 1985, Savino und Dardenne 1988a, Bodey et al. 2000). Der Antikörper TE-15 zeigte ein ähnliches Reaktionsmuster wie TE-19. Laut Beschreibung verschiedener Autoren (Haynes 1984, Lobach et al. 1985) markiert TE-15 ausschließlich granuläres Material innerhalb der HK. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen an Thymusgewebe von Mensch und Marmoset wurde ebenfalls die Markierung granulären Materials beobachtet. Allerdings waren im Gegensatz dazu auch Anteile der inneren und äußeren Schichten der HK sowie medulläre Thymusepithelzellen in unmittelbarer Umgebung bei beiden Spezies gleichermaßen TE-15-positiv. Wieder umgaben diese TE-15-positiven Zellen die HK ringförmig, allerdings war im Vergleich zur Markierung mit TE-19 eine geringere Anzahl dieser Zellen, die vermutlich Typ 6-EZ beim Menschen sowie Typ 4-EZ beim Marmoset entsprachen, TE-15<sup>+</sup>.

Von allen Antikörpern der TE-Serie bestand nur bei TE-7 keine Kreuzreaktivität. Dieser Antikörper markiert beim Menschen die Thymuskapsel sowie im Thymus und in zahlreichen anderen Organen fibröses Stroma und Gefäße (Haynes et al. 1984). Beim Marmoset ließ sich das Bindegewebe nicht durch TE-7 nachweisen. Ein ähnliches Resultat ergab auch die durchflusszytometrische Untersuchung von Thymusepithelzellen des Marmosets, bei der keine TE-7-positiven Zellen beobachtet wurden (Riecke et al. 2000). Des Weiteren fanden sich nur wenige TE-8<sup>+</sup> und TE-16<sup>+</sup> Thymusepithelzellen bei der Durchflusszytometrie wie auch bei der immunhistochemischen Untersuchung des Marmosetthymus. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Antikörper für die Erkennung der weit fortgeschrittenen Differenzierungsstadien von Thymusepithelzellen beim Marmoset eher ungeeignet sind. TE-15 und TE-19 sind für die immunhistochemische Markierung von Hassall'schen Körperchen

geeignet, allerdings wurden diese Differenzierungsmarker bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Riecke und Mitarbeitern nur auf einer minimalen Zahl von Thymusepithelzellen des Marmoset nachweisgewiesen. Gleiches gilt auch für den Antikörper TE-4. TE-3<sup>+</sup> Zellen hingegen wurden sowohl bei der Immunhistochemie als auch bei der Durchflusszytometrie gesehen, wobei sich, wie oben beschrieben, die Färbung beim Marmoset nicht auf kortikales Thymusepithel beschränkte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die antihumanen Antikörper TE-3, TE-4, TE-15 und TE-19 für die immunhistochemische Untersuchung von Thymusgewebe des Marmoset aufgrund der vorhandenen Kreuzreaktivität sehr gut geeignet sind.

Bei den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurde neben TE-Antikörpern auch die Kreuzreaktivität verschiedener antihumaner CD-Antikörper mit Thymusgewebe des Marmoset getestet. Bis auf ein negatives Präparat waren alle untersuchten Thymuspräparate des Menschen CD29-positiv. Gleichmaßen reagierte CD29 auch mit allen Thymuspräparaten unbehandelte Marmosets. Die Intensität der Antikörpermarkierung war bei beiden Spezies ähnlich stark. Sowohl beim Menschen als auch beim Marmoset zeigten sich eine große Anzahl von Zellen des Thymus als schwach CD29<sup>+</sup>, wobei die Zellumrisse gut erkennbar waren. Diese Zellen waren beim Menschen etwas intensiver markiert wurden. Die  $\beta$ -Untereinheit der  $\beta_1$ -Integrine befindet sich also auf der Zellmembran vieler Zellen im Thymus von Mensch und Marmoset. Auffällig waren bei beiden Spezies intensiver CD29-markierte, über den gesamten Thymus verteilte Thymusepithelzellen sowie CD29<sup>+</sup> Hassallsche Körperchen. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Thymusepithelzellkulturen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Expression von CD29 auf nahezu allen TE-Zellen von Mensch (Ramarli et al. 1998) und Marmoset (>99%) (Riecke et al. 2000) festgestellt. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen, die bei der hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung der Gefrierschnitte gemacht wurden. Die Kreuzreaktivität von antihumanem CD29 besteht beim Marmoset nicht nur zum Thymusgewebe, auch periphere weiße Blutkörperchen exprimieren in großer Zahl dieses Epitop (Neubert et al. 1995).

Als weitere Vertreter der  $\alpha$ -Ketten der  $\beta_1$ -Integrin-Familie wurden hier CD49a, CD49b, CD49c und CD49e für die Untersuchung des Thymusgewebes verwendet. Beim unbehandelten Marmoset fanden sich in allen untersuchten Präparaten CD49a<sup>+</sup>, CD49b<sup>+</sup> sowie CD49c<sup>+</sup> Zellen. Auch beim Menschen wurde ein ähnliches Resultat beobachtet, allerdings zeigte sich ein Präparat als negativ bzw. fanden sich zwei negative Präparate bei der Anfärbung mit CD49b. Die  $\alpha_5$ -Kette der  $\beta_1$ -Integrine (CD49e) war beim Marmoset nur in zwei Präparaten und beim Menschen nur in einem Thymuspräparat nachzuweisen.

Die Färbemuster der innerhalb des Thymus durch die Antikörper CD49a, b und c markierten Strukturen ähnelten sich. Die Färbungen unterschieden sich vor allem in der Intensität der Antikörpermarkierung sowohl innerhalb als auch zwischen beiden Spezies. Die Markierung des Thymusgewebes mit CD49a war beim Menschen und beim Marmoset von vergleichbar schwacher Intensität. Bei beiden wurde eine schwache Markierung von einer großen Anzahl Zellen beobachtet, es besitzen also eine Vielzahl der Zellen im Thymus  $\alpha_1\beta_1$ -Integrinmoleküle. Stärker von CD49a markierte rundliche bis spindelförmige Thymusepithelzellen wurden im Bereich des subkapsulären Kortex sowie der Medulla gefunden. Auch die Hassall'schen Körperchen wurden bei Mensch und unbehandeltem Marmoset von CD49a markiert. In ähnlicher Weise wurden auch von den Antikörpern CD49b und CD49c eine Vielzahl von Zellen im Thymusgewebe von Mensch und Marmoset schwach markiert. Stark markierte Thymusepithelzellen fanden sich wiederum im SKK, in der Medulla (einschließlich HK) sowie ganz vereinzelt im Kortex. Die Intensität der Antikörpermarkierung mit CD49b ist bei Mensch und Marmoset ähnlich stark. CD49c markierte jedoch Thymusgewebe des Marmoset deutlich intensiver als menschliches Gewebe. Andere Autoren erzielten ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung menschlichen Thymusgewebes, allerdings wurden keine positiven Hassall'schen Körperchen beschrieben und es fanden sich keine CD49b<sup>+</sup> CD49c<sup>+</sup> medullären sowie keine CD49c<sup>+</sup> kortikalen Zellen (Crisa et al. 1996, Karaoz et al. 1996).

Die Anfärbung der Gefrierschnitte mit CD49e gelang nur in wenigen Präparaten. Beim Menschen war nur eines der untersuchten Präparate CD49e-positiv, wobei schwach CD49e<sup>+</sup> Zellen (und HK) nur in der Medulla beobachtet wurden. Beim Marmoset ähnelte das Färbemuster wieder dem der anderen untersuchten Integrine. Durchflusszytometrische Unter-

suchungen zeigten ebenso wie die hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen, dass sich Adhäsionsmoleküle der  $\beta_1$ -Integrin-Familie auf einer sehr großen Zahl von Thymuszellen bei Mensch und Marmoset befinden (Ramarli et al. 1998, Riecke et al. 2000). Es besteht also eine Kreuzreaktivität aller hier verwendeter Antikörper, die sich gegen menschliche  $\beta_1$ -Integrinrezeptoren (CD29, CD49a, b, c, e) richten, zu Epitopen von Thymuszellen des Marmoset. Diese Kreuzreaktivität besteht beim Marmoset auch zu weißen Blutkörperchen (Neubert et al. 1995).

Innerhalb des Thymus spielen die  $\beta_1$ -Integrine ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ) sowie andere Adhäsionsmoleküle (CD54, CD58) eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Thymozyten zu Thymusstromazellen und der extrazellulären Matrix (Savino et al. 1993, Volger et al. 1987, Singer et al. 1990, Utsumi et al. 1991). Auch bei der Differenzierung der Thymozyten innerhalb des Thymus sind die Integrine von großer Bedeutung (Schmeissner et al. 2001). Des Weiteren sind Integrine in die Kolonisation des Thymus durch Prothymozyten involviert (Shimizu et al. 1999). Die Interaktionen zwischen  $\alpha_4\beta_1$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptoren mit Fibronectin werden für die Induzierung der Thymozytenwanderung vom Kortex in die Medulla verantwortlich gemacht (Crisa et al. 1996). Die Bedeutung der übrigen auf Thymuszellen befindlichen  $\beta_1$ -Integrinrezeptoren ist bis heute noch nicht vollständig bekannt. Von den hier untersuchten Integrin-Ketten eignen sich CD29, CD49a, b und c aufgrund der Kreuzreaktivität zu Marmosetgewebe und der Intensität der Antikörpermarkierung gut zur immunhistochemischen Untersuchung von Gefrierschnitten des Thymus von Mensch und Marmoset. CD49e ist trotz bestehender Kreuzreaktivität eher ungeeignet für immunhistochemische Untersuchungen, da nur sehr wenige Präparate anfärbbar waren.

Weitere hier untersuchte Adhäsionsmoleküle sind CD61 ( $\beta_3$ -Integrin), CD54 (ICAM-1) und CD58 (LFA-3). Die  $\beta_3$ -Untereinheit ließ sich weder in Thymuspräparaten des Menschen noch des Marmosets immunhistochemisch nachweisen, alle untersuchten Präparate waren negativ. CD61 eignet sich nicht zur immunhistochemischen Untersuchung von Thymusgewebe. Auch bei der Durchflusszytometrie wurden nur wenige CD61<sup>+</sup> Thymusepithelzellen des Menschen gefunden, allerdings waren beim Marmoset 30% der TE positiv (Riecke et al. 2000).

Außerdem wurde die Kreuzreaktivität von antihumanem CD61 zu Leukozyten des Marmosets beobachtet (Neubert et al. 1995).

Drei von fünf Thymuspräparaten des Menschen sowie vier von sechs Marmosetpräparaten wiesen CD54-positive Zellen auf. Eine Vielzahl der Zellen im Thymus von Mensch und Marmoset wurde von CD54 schwach markiert, intensiver markierte Zellen wurden beim Marmoset in der Thymusmedulla und beim Menschen zusätzlich auch im Bereich des subkapsulären Kortex beobachtet. Auch Thymuskapsel und Bindegewebe war beim Marmoset schwach CD54<sup>+</sup>. Die Hassall'schen Körperchen wurden bei beiden Spezies von CD54 markiert. Die Antikörpermarkierung mit CD58 war beim Menschen bei drei von vier untersuchten Thymuspräparaten erfolgreich, beim Marmoset waren beide untersuchten Präparate positiv. Beim Menschen wurden eine Vielzahl von Zellen in Kortex und Medulla einschließlich der HK von CD58 angefärbt. Im Unterschied dazu wurden beim Marmoset kortikale Zellen nur schwach markiert, ansonsten ähneln sich die Färbemuster.

Auch andere Autoren kamen bei der Untersuchung menschlicher Thymusepithelzellen zu ähnlichen Resultaten. Sowohl der Thymuskortex einschließlich des SKK als auch medulläre Thymusepithelzellen und Hassall'sche Körperchen waren CD54<sup>+</sup> CD58<sup>+</sup> (Reza et al. 1994). Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden nur wenige CD54<sup>+</sup> TE-Zellen beim Menschen und vereinzelte positive Thymusepithelzellen des Marmoset nachgewiesen (Riecke et al. 2000). Auch wurden beim Marmoset nur wenige (1%) CD58<sup>+</sup> Thymusepithelzellen beobachtet, die Zahl der CD58-positiven Zellen des Menschen lag mit 68% deutlich höher. Kreuzreaktivität der antihumanen Antikörper CD54 und CD58 besteht auch zu peripheren weißen Blutkörperchen des Marmoset (Neubert et al. 1995). CD54 und CD58 sind wie auch die Integrine in die Entwicklung der Thymozyten involviert. Im Thymus wird über diese beiden Adhäsionsrezeptoren die Bindung von Thymozyten an Thymusepithelzellen vermittelt (Denning et al. 1987, Volger et al. 1987, Singer et al. 1990, Ritter und Palmer 1999).

### **4.3 Altersunterschiede bei der immunhistochemischen Untersuchung des Thymus von**

#### **Mensch und Marmoset**

Bei der hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung von Thymusgewebe des Menschen sowie unbehandelter Marmosets wurden neben der Kreuzreaktivität auch mögliche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Antikörpermarkierung bei verschiedenen Altersgruppen betrachtet. Hierbei wurden beim Menschen die Altersgruppen neugeboren (4 Tage), Säuglinge (6 und 10 Monate), juvenil (7 Jahre) und erwachsen (74 Jahre) und bei den unbehandelten Marmosets die Altersgruppen neugeboren (1-3 Tage), juvenil (10-12 Monate) und erwachsen (24 Monate) voneinander unterschieden (siehe auch Tabelle 3.1 Seite 30 und Tabelle 3.5 Seite 48).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Anfärbung menschlichen Thymusgewebes mit Antikörpern der TE-Serie fanden sich Altersunterschiede innerhalb der Spezies vor allem in der Intensität der Antikörpermarkierung und weniger im Färbemuster. Die Antikörpermarkierung mit TE-3 war sowohl bei allen Präparaten des Menschen als auch der unbehandelten Marmosets von ähnlich starker Intensität. Beim Menschen wurden nur bei Säuglingen die Thymuskapsel sowie bindegewebige Septen von TE-3 markiert, bei älteren Patienten nicht. Bei den unbehandelten Marmosets wurde beobachtet, dass die Anzahl der TE-3<sup>+</sup> Zellen im Thymuskortex mit zunehmendem Alter der Tiere geringer wurde. Bei neugeborenen Tieren und Säuglingen waren vereinzelte TE-3<sup>+</sup> Zellen im Kortex zu finden, bei erwachsenen Marmosets war der Kortex TE-3-negativ.

Die Antikörpermarkierung des Thymusgewebes mit TE-4, TE-15 und TE-19 war bei beiden Spezies von vergleichbarer Intensität. Das Färbemuster der Markierung der Präparate mit dem Antikörper TE-4 zeigte bei den verschiedenen Altersgruppen keine Unterschiede. Nur Thymuspräparate der Altersgruppen „neugeboren“ und „Säuglinge“ wurden beim Menschen mit TE-15 markiert, wobei keine Unterschiede im Färbemuster beobachtet wurden. Ältere Patienten konnten nicht untersucht werden. Im Gegensatz dazu wurden Präparate der Marmosets aller Altersstufen mit TE-15 markiert und untersucht. Hier zeigte sich, dass die Anzahl der TE-15-positiven Zellen in der Umgebung der Hassall'schen Körperchen (EZ

Typ 4) bei den neugeborenen Tieren am größten war und mit zunehmendem Alter geringer wurde. Dies wurde auch bei der Antikörpermarkierung mit TE-19 beobachtet. Sowohl beim Menschen als auch bei den unbehandelten Marmosets war die Anzahl der TE-19<sup>+</sup> Zellen in unmittelbarer Umgebung der HK (EZ Typ 6 beim Menschen bzw. EZ Typ 4 beim Marmoset) bei den Neugeborenen am größten und wurde mit zunehmendem Alter geringer. Diese Beobachtungen unterstützen möglicherweise die Hypothese, dass es sich bei den Hassall'schen Körperchen um ein Enddifferenzierungsstadium der medullären Thymusepithelzellen handelt (Nicolas et al. 1985, Savino und Dardenne 1988a, Bodey et al. 2000). Die Zellen, welche die HK's direkt umgeben (EZ Typ 6 bzw. 4), stellen somit eine Vorstufe in der Differenzierung dar.

Die Antikörpermarkierung mit TE-8 war bei beiden Spezies von geringer Intensität, wobei die Färbung beim Menschen etwas intensiver war als beim unbehandelten Marmoset. Bei beiden Spezies wurden die Hassall'schen Körperchen der Neugeborenen stärker von TE-8 markiert als die der älteren Patienten bzw. Tiere. Auch die Markierung mit TE-16 war von geringer Intensität. In einigen Thymuspräparaten von Mensch und Marmoset ließen sich keine TE-16<sup>+</sup> Zellen nachweisen. Beim Menschen waren die HK in Präparaten von juvenilen Patienten und Säuglingen TE-16-positiv, wobei keine Unterschiede hinsichtlich Intensität und Färbemuster erkennbar waren. Nur bei neugeborenen Marmosets fanden sich schwach TE-16<sup>+</sup> HK sowie vereinzelte medulläre TE-Zellen, bei allen anderen Altersgruppen fanden sich ausschließlich vereinzelte schwach TE-16-markierte medulläre Thymusepithelzellen.

TE-7-positive Zellen fanden sich im Thymus unbehandelter Marmosets nicht. Beim Menschen war die Markierung mit TE-7 bei allen Altersgruppen von ähnlich starker Intensität. Unterschiede im Färbemuster wurden nicht beobachtet.

Die Markierung menschlichen Thymusgewebes mit CD29 sowie CD49a, b, und c erfolgte in der Altersgruppe der Neugeborenen am intensivsten. Die Intensität der Antikörpermarkierung nahm in den anderen Altersgruppen immer weiter ab. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Antikörpermarkierung von Präparaten unbehandelter Marmosetthymi mit CD49c gefunden. Alle anderen oben erwähnten Antikörper markierten die Thymi der unterschiedlichen Altersgruppen mit jeweils vergleichbarer Intensität.

CD29 markierte menschliches Thymusgewebe sowie Präparate der Marmosets sehr intensiv, wobei im Vergleich die Intensität der Färbung beim Menschen etwas stärker war. Die Färbemuster unterschieden sich weder im Vergleich der beiden Spezies noch der Altersgruppen innerhalb einer Spezies voneinander. Die Markierung der Thymuszellen durch CD49a war bei Mensch und Marmoset vergleichsweise schwach. Beim neugeborenen Menschen fanden sich stark CD49a<sup>+</sup> Zellen einschließlich der Hassall'schen Körperchen in der Thymusmedulla und im SKK. Bei Säuglingen wurden die stark CD49a<sup>+</sup> Zellen zusätzlich auch im Kortex beobachtet, wohingegen bei den älteren Patienten nur noch vereinzelte stark CD49a-markierte Zellen im Bereich der Medulla und des SKK gefunden wurden. Auch Thymuskapsel und bindegewebige Septen wurden bei Säuglingen und Neugeborenen schwach von CD49a markiert. Auch die Antikörper CD49b und c zeigten ein ähnliches Reaktionsmuster. Beim neugeborenen Menschen wurde das Gewebe besonders intensiv markiert und mit zunehmendem Alter wurde die Intensität der Färbung schwächer. Beim Marmoset hingegen war die Antikörpermarkierung mit CD49b bei allen Altersgruppen von vergleichbarer Intensität, die Markierung mit CD49c war jedoch schwächer als beim Menschen, wobei bei den neugeborenen Tieren die Hassall'schen Körperchen am intensivsten markiert wurden. Da nur ein menschliches Thymuspräparat CD49e<sup>+</sup> war, konnten die unterschiedlichen Altersgruppen nicht miteinander verglichen werden. Zwei Marmosetpräparate reagierten mit CD49e, beide Markierungen unterschieden sich weder in der Intensität noch im Reaktionsmuster voneinander.

Die Markierung mit Antikörper CD54 war sowohl bei Mensch als auch Marmoset bei allen Altersgruppen von ähnlicher Intensität, wobei bei beiden Spezies mit zunehmendem Alter weniger schwach positive Zellen im Thymuskortex beobachtet wurden. Die Intensität der Markierung mit CD58 hingegen nahm beim Menschen mit zunehmendem Alter zu, beim Marmoset reagierten nur zwei Präparate mit dem Antikörper, bei denen vergleichbare Intensität und Reaktionsmuster beobachtet wurden. CD 61 markierte weder beim Menschen noch beim Marmoset Thymusgewebe.

#### **4.4 Vergleich der immunhistochemischen Untersuchung des Thymus 2,3,7,8-TCDD-behandelter mit unbehandelten Marmosets**

Da immunhistochemische Untersuchungen des Thymusgewebes TCDD-behandelter sowie unbehandelter Marmosets wie hier beschrieben erstmalig durchgeführt wurden, konnten die gewonnenen Ergebnisse nicht mit denen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der Untersuchung von Thymusgewebe behandelter und unbehandelter Tiere mit TE-Antikörpern miteinander, so wurden keine wesentlichen Unterschiede beobachtet. Die Antikörpermarkierung mit TE-3 ist bei beiden Gruppen von ähnlicher Intensität und unterscheidet sich auch im Reaktionsmuster nicht voneinander. Antikörper TE-7 markierte weder bei unbehandelten noch bei 2,3,7,8-TCDD-behandelten Marmosets Thymusstrukturen. Die Markierung mit TE-8 war bei den behandelten Tieren ähnlich, die Hassall'schen Körperchen wurden sehr schwach markiert. Im Gegensatz dazu fanden sich keine TE-16<sup>+</sup> HK's bei den behandelten Tieren (auch bei den unbehandelten Tieren fand sich nur ein Präparat mit TE-16<sup>+</sup> HK's). Antikörper TE-19 reagierte bei beiden Untersuchungsgruppen in ähnlich starker Intensität mit den Hassall'schen Körperchen sowie Zellen in deren unmittelbarer Umgebung.

Auch bei der Betrachtung der Antikörpermarkierungen durch CD-Antikörper gab es nur geringe Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppe sowie den unbehandelten Tieren auf. Die Reaktionsmuster der Antikörper CD29, CD49a, CD49b und CD49c waren bei beiden Marmosetgruppen von vergleichbarer Intensität und ähnlichem Reaktionsmuster. CD49e reagierte nicht mit dem Thymusgewebe der behandelten Tiere, aber auch in der Gruppe der unbehandelten Marmosets waren nur wenige Präparate CD49e<sup>+</sup>. Die Färbung mit CD54 unterschied sich dadurch, dass bei den behandelten Tieren schwach markierte Hassall'sche Körperchen beobachtet wurden, bei den unbehandelten Tieren wurden diese deutlicher von CD54 markiert. CD58<sup>+</sup> HK's wurden bei den behandelten Tieren nicht gefunden. CD61 markierte bei beiden Gruppen kein Thymusgewebe.

Insgesamt zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass bei der immunhistochemischen Untersuchung von Thymusgewebe keine eindeutigen Veränderungen durch die Behandlung der Marmosets mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin in einer Dosierung von 100 ng/kg KG zu beobachten waren. Tendenziell schien die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle nach der Behandlung im Bereich der Hassall'schen Körperchen abzunehmen (CD54) bzw. war auf diesen nicht mehr nachweisbar (CD58).