

5 Ergebnisse – Teil 2 -

5.1 Bedeutung der Slfn-Proteine für die Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen

Die Mitglieder der ersten und zweiten Untergruppe der Slfn-Gen-Familie werden während der Thymozytenentwicklung und nach Aktivierung reifer, peripherer T-Zellen differentiell exprimiert (Schwarz et al., 1999). Die Mitglieder der Slfn-Gen-Familie der dritten Untergruppe könnten ebenfalls eine wichtige Funktion im Rahmen der T-Zellentwicklung und -aktivierung haben. Ein Hinweis darauf wäre eine differentielle Expression innerhalb der Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen. Um die Gen-Expression der neuen Slfn-Mitglieder (slfn5, slfn8, slfn9 und slfn10) im Kontext der T-Zellentwicklung und -aktivierung zu untersuchen, wurde die mRNA sowohl von Thymozyten, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befinden, als auch von aufgereinigten peripheren T-Zellen, die mit immobilisierten anti-CD3-Antikörpern und löslichen anti-CD28-Antikörpern nicht oder für 1-2 Tage stimuliert wurden, isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die umfassende Homologie zwischen den individuellen slfn-Genen machte es notwendig, eine spezifische semi-quantitative PCR mit normalisierten cDNA-Mengen durchzuführen und die spezifisch amplifizierten PCR-Produkte in Kombination mit einer ³²P-markierten Oligonukleotid-Probe zu detektieren. Der Vollständigkeit halber wurden auch slfn1, slfn2, slfn3 und slfn4 in den Expressionsanalysen mit einbezogen.

Ein differentielles Expressionsprofil wurde für slfn1 und slfn4 innerhalb der intrathymischen T-Zellentwicklung beobachtet. Während slfn1 im Zuge der positiven Selektion in CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen hochreguliert wurde, wurde die slfn4-Expression signifikant vermindert. Im Vergleich dazu variiert die Expression von slfn3, slfn5, slfn 8, slfn9 und slfn10 innerhalb der T-Zellentwicklung nur geringfügig. Im Gegensatz zu slfn1 ist slfn5 im DP (CD4⁺CD8⁺) T-Zellstadium hochreguliert, während in den anderen Stadien die relative Expression konstant bleibt. Die höchste Expression von slfn9 und slfn10 ist im DN-T-Zellstadium (CD4⁻CD8⁻) zu finden. Jedoch ist diese im Vergleich zu den anderen Phasen nur leicht erhöht. Die slfn8-Expression ist im Vergleich zu den anderen Slfn-Mitgliedern der dritten Untergruppen im DP-Stadium deutlich vermindert. Jedoch erhöht sich die Expression in den CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen wieder auf dem Niveau, wie es in den T-Zellen im DN3-Stadium gefunden wurde. Im Zuge der TZR- und CD28-vermittelten Stimulation erfolgt eine differentielle Expression der individuellen slfn-Gene im Vergleich zu den sich entwickelnden Thymozyten. Während slfn1, slfn2, slfn5 und slfn8 nach Aktivierung verstärkt exprimiert werden, ist das

Expressionsniveau von slfn3 und slfn10 relativ unverändert. Im Gegensatz dazu wird 48h nach Aktivierung eine erhöhte Expression von slfn4 und slfn9 beobachtet. Eine interessante Beobachtung ist, dass Gene wie slfn3 und slfn10, die während der T-Zellentwicklung kaum reguliert werden, auch keine Veränderungen in der Gen-Expression im Verlauf der T-Zellaktivierung zeigen (Abb.25).

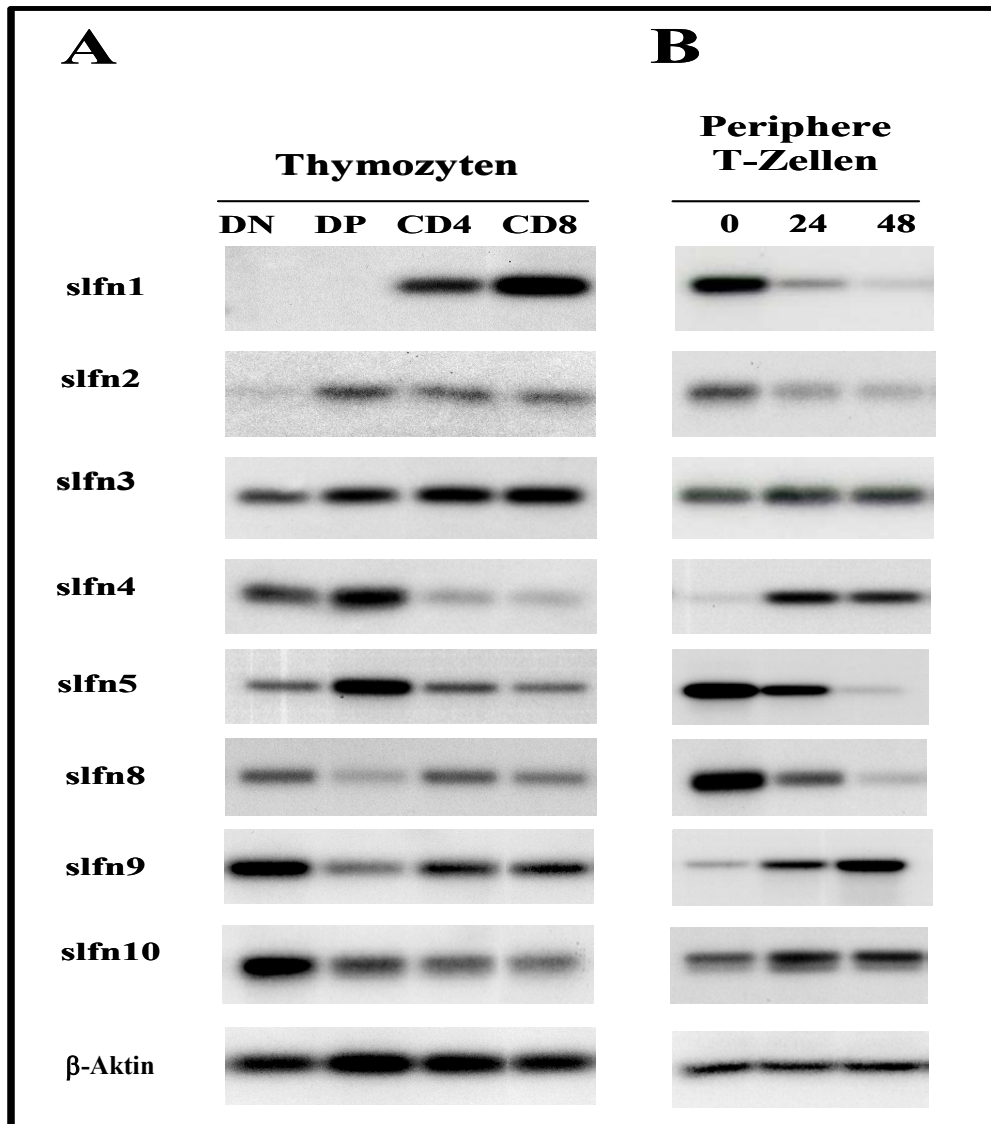


Abb. 25: Darstellung der differentiellen Expression von verschiedenen Slfn-Genen in Thymozyten und peripheren T-Zellen

Das relative Expressionsniveau der individuellen slfn-Gene wurde von Thymozyten und von aufgereinigten peripheren T-Zellen durch semi-quantitative RT-PCR-Analysen unter Verwendung von normalisierten cDNA-Proben bestimmt. Folgende Thymozytenpopulationen wurden aufgereinigt und analysiert: 1. unreife CD3⁺CD4⁺CD8⁻-Thymozyten (DN), 2. CD4⁺CD8⁻-Thymozyten (DP) und 3. reife CD4⁺ (CD4) und CD8⁺ (CD8)- Thymozyten. Aufgereinigte Lymphknoten-T-Zellen von C57BL/6-Mäusen wurden durch TZR/CD28-Stimulation für 1 und 2 Tagen (12, 24) oder nicht (0) aktiviert. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese separiert, gebロットet und durch Hybridisierung mit ³²P-markierte Oligonukleotid-Proben detektiert. Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jens Zerrahn bereitgestellt.

Eine gegenläufige Regulation der Genexpression ist am Beispiel von *slfn1* und *slfn4* zu beobachten. Während in ruhenden naiven $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen die *slfn1*-Expression erhöht ist und diese im weiteren Verlauf der Stimulation vermindert wird, wird für *slfn4* der umgekehrte Effekt beobachtet. Ein interessantes Beispiel stellt die Gen-Regulation von *slfn9* dar. In den verschiedenen Phasen der intrathymischen T-Zellentwicklung sind kaum Veränderungen in der Gen-Expression zu beobachten. Im Verlauf der T-Zellstimulation wird *slfn9* hochreguliert. Zusammenfassend wird deutlich, dass die individuellen *slfn*-Gene während der T-Zellentwicklung und –aktivierung differentiell reguliert werden und daher spezifische Funktionen in distinkten Phasen der ontogenetischen Entwicklung und nach zellulärer Aktivierung übernehmen.

5.2 Generierung von Slfn-transgenen Mäusen

Durch Studien von Hedrick und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass eine frühe T-Zell-spezifische *Slfn1*-Expression zur Inhibition der T-Zellentwicklung im DN3-Stadium ($CD3^+ CD4^- CD8^- CD44^- CD25^+$) führt. Die Blockierung der intrathymischen T-Zell-Differenzierung bewirkt in Folge dessen eine signifikante Verminderung der thymischen Zellularität (Schwarz et al., 1999). Die Arretierung der Thymozyten im DN3-Stadium und die signifikante Verminderung der thymischen Zellularität durch die ektopische *Slfn1*-Expression könnten sich nachteilig auf die Aktivierung und das proliferative Wachstum von reifen naiven T-Zellen vor und nach TZR-vermittelter Stimulation auswirken.

Um ein besseres Verständnis für die physiologische Bedeutung der *Slfn*-Proteine in der T-Zellentwicklung und –aktivierung zu erzielen, wurden *Slfn1*-, *Slfn4*- und *Slfn8*-transgene Mauslinien generiert. Die Expression des jeweiligen Transgens wird durch eine hCD2-Lokuskontrollregion-Kassette vermittelt, die sich durch eine vorrangig T-Zell-spezifische Expression auszeichnet. Für die Generierung der *Slfn1*-, *Slfn4*- und *Slfn8*-transgenen Mäusen wurden die vollständigen Sequenzen der kodierenden cDNAs in die VA CD2-Kassette (mit CD2-Promotor und einer Lokuskontrollregion mit T-Zell-spezifischen Enhancer) kloniert. Nach dem Entfernen der prokaryontischen Vektorsequenz wurden die VA CD2-*Slfn1*-, VA CD2-*Slfn4*- und die VA CD2-*Slfn8*-Konstrukte in CBA x C57BL/6 F2 Embryos injiziert. Die Pronukleus-Injektion wurde von Frau Karin Bordasch durchgeführt. Transgene Mäuse wurden durch PCR-Analysen identifiziert. Dazu wurde die genomische DNA von einem Stück Mausschwanz nach einem Proteinase K-Verdau isoliert und durch Verwendung von transgen-spezifischen Oligonukleotid-Primern in einer PCR-Reaktion analysiert. Durch die PCR-Analysen konnten im Fall von *Slfn1* drei Mauslinien identifiziert werden, die das *Slfn1*-

Transgen in die Keimbahn inserierten. Die Expression des jeweiligen Transgens wurde entweder durch RT-PCR- oder durch Northern-Blot-Analysen nachgewiesen. Dazu wurde die mRNA entweder vom gesamten Thymus oder von aufgereinigten peripheren T-Zellen von den jeweiligen transgenen Mäusen isoliert. Im Anschluss wurde die mRNA entweder in cDNA umgeschrieben oder direkt für Northern-Blot-Analysen verwendet. Eine sehr hohe Slfn1-Expression wurde für die Slfn1-transgene Mauslinie 1 nachgewiesen, während Linie 10 ein moderates und Linie 17 ein hohes Expressionsniveau aufwiesen. Die nachfolgende Northern-Blot-Analyse zeigt vergleichend zur Wildtypkontrolle exemplarisch das Slfn1-Expressionsniveau der Slfn1-transgenen Mauslinie 10 vom Thymus und von aufgereinigten naiven peripheren T-Zellen (Abb. 26).

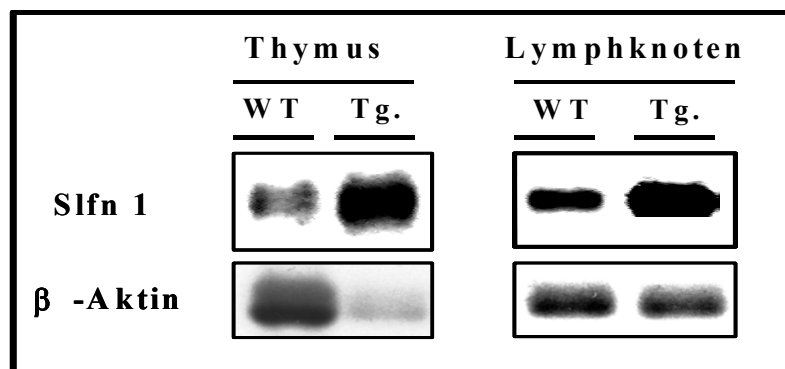


Abb. 26: Northern-Blot-Analysen zum Nachweis der transgenen Slfn1-Expression

Die RNA vom gesamten Thymus und von aufgereinigten peripheren Lymphknoten aus Wildtyp- (WT) und Slfn1-transgenen Mäusen (Tg.; Linie10) wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert, geblottet und durch Hybridisierung mit einer ³²P-markierten Probe, sowohl für slfn1 als auch für β-Aktin, detektiert. Für die Analysen wurden 10 µg der gesamten RNA von jedem Organ bzw. Zelltyp verwendet.

Die differentielle Quantifizierung des transgenen und des endogenen Slfn1-Expressionniveaus war nicht möglich, weil nur geringfügige Unterschiede in den Größen der exprimierten mRNAs bestanden. Dennoch ist die Gesamt-Expression von slfn1 im Thymus und in den peripheren T-Lymphozyten der transgenen Maus deutlich höher als in den nicht-transgenen Kontrollen. Die Expression in den aufgereinigten transgenen naiven peripheren T-Zellen ist gegenüber den Wildtyp-T-Zellen ca. um den Faktor 2-3 erhöht.

Die Northern-Blot-Analyse zeigte, dass das slfn1-Transgen in den peripheren naiven T-Zellen und in den Thymozyten von Slfn1-transgenen Mäusen exprimiert wird.

5.3 Analyse von Slfn1-transgenen Mauslinien

Im Rahmen der von Hedrick und Mitarbeitern durchgeführten Analysen an Slfn1-transgenen Mäusen wurde der Entwicklungs-inhibitorische Effekt von Slfn1 auf die intrathymische Thymozytendifferenzierung im DN3 Stadium nachgewiesen, der folglich zu einer signifikanten Verminderung der thymischen Zellularität führt (Schwarz et al., 1999). In den folgenden Analysen sollte überprüft werden, ob und wenn ja in welchem Masse die transgene Slfn1-Expression zu einer Kompression des T-Zellkompartiments führt. Dazu wurden zunächst die absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten von Wildtyp und CD2-Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 1 und Linie 10 und im Anschluss die relativen Anteile der verschiedenen T-Zellsubpopulationen in den jeweiligen lymphoiden Organen mittels FACS bestimmt.

Bereits bei Entnahme der primären und sekundären lymphoiden Organe konnten deutliche Unterschiede in den Organgrößen festgestellt werden. Die Thymi, die Milzen und die Lymphknoten von beiden Slfn1-transgenen Mauslinien sind im Vergleich zu den nicht transgenen Kontrollen signifikant kleiner und weisen daher auch deutlich geringere absolute Zellzahlen auf (Abb. 27).

	absolute Zellzahlen		
	Wildtyp ($\times 10^6$) n = 13	CD2-Slfn 1L10 ($\times 10^6$) n = 7	CD2-Slfn 1L1 ($\times 10^6$) n = 7
Thymus	124 \pm 31	17,7 \pm 4,7	3,8 \pm 1,7
Milz	83,5 \pm 14,4	31,7 \pm 6	8,3 \pm 1,6
Lymphknoten	25,1 \pm 8,1	12,3 \pm 3,6	2,2 \pm 0,7

Abb. 27: Darstellung der absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten von Wildtyp- und CD2-Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 1 und 10

Die absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten wurden von 13 (n=13) Wildtyp- und jeweils 7 (n=7) CD2-Slfn1-transgenen Mäusen bestimmt. Unter Verwendung von Trypan-Blau wurde zwischen toten und lebenden Lymphozyten unterschieden. Die Tabelle zeigt die Gesamtzahl der lebenden Zellen in den jeweiligen Organen.

Dabei ist eine direkte Korrelation zwischen dem *slfn1*-Expressionsniveau und der verminderten Zellularität der lymphoiden Organe zu erkennen. Die absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten der transgenen Linie 1, die eine sehr hohe *Slfn1*-Expression aufweisen, sind im Vergleich zur transgenen Mauslinie 10, die ein moderates *Slfn1*-Expressionsniveau hat, deutlich niedriger. Vergleichend zur Wildtypkontrolle sind die absoluten Zellzahlen in den Thymi der *Slfn1*-transgenen Mauslinie 10 ca. um den Faktor 7 und im Fall der Linie 1 sogar um das 33fache reduziert. In den Milzen und den Lymphknoten der *Slfn1*-transgenen Mäuse sind die absoluten Zellzahlen vergleichend zur Wildtypkontrolle um den Faktor 2,6 (Milz, Linie 10) und 10 (Milz, Linie 1) bzw. um das 2fache (Lymphknoten, Linie 10) und 11fache (Lymphknoten, Linie 1) reduziert (Abb. 27).

Aufgrund der signifikant geringeren absoluten Zellzahl ist anzunehmen, dass das *Slfn1*-Transgen die Entwicklung der Thymozyten in einer bestimmten Phase der T-Zelldifferenzierung inhibiert. Basierend auf der Expression der beiden Korezeptoren, CD4 und CD8, wird im Thymus zwischen den vier distinkten Thymozytensubpopulationen, CD4⁻CD8⁻; CD4⁺CD8⁺; CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺, unterschieden, die spezifische Entwicklungsstadien der Thymozyten repräsentieren. Durch die transgene *Slfn1*-Expression könnte die Thymozytenentwicklung in einer der vier Differenzierungsstadien blockiert sein und dadurch die verringerte Thymozytenzahl im Thymus verursachen.

Zur Überprüfung, ob die transgene *Slfn1*-Expression die intrathymische T-Zelldifferenzierung in einer der vier Entwicklungsstadien inhibiert, wurden die relativen Anteile von CD4⁺-, CD8⁺-, CD4⁺CD8⁺- und CD4⁻CD8⁻-Thymozyten in den beiden transgenen Mauslinien vergleichend zur Wildtyp-Kontrolle bestimmt. Dazu wurden die Thymi aus den entsprechenden Mauslinien isoliert und die relativen Anteile der individuellen Thymozytenpopulationen nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern mittels FACS-Analysen bestimmt.

Die FACS-Analysen zeigen, dass der prozentuale Anteil von CD4⁺CD8⁺-T-Zellen in den transgenen Linien signifikant vermindert ist, während die relativen Anteile der CD4⁻CD8⁻-Zellen deutlich zunehmen. Besonders im Thymus der *Slfn1*-transgenen Mauslinie 1 ist eine deutliche Akkumulation der Vorläufer-T-Zellen im CD4⁻CD8⁻-T-Zellstadium zu erkennen (Abb. 28).

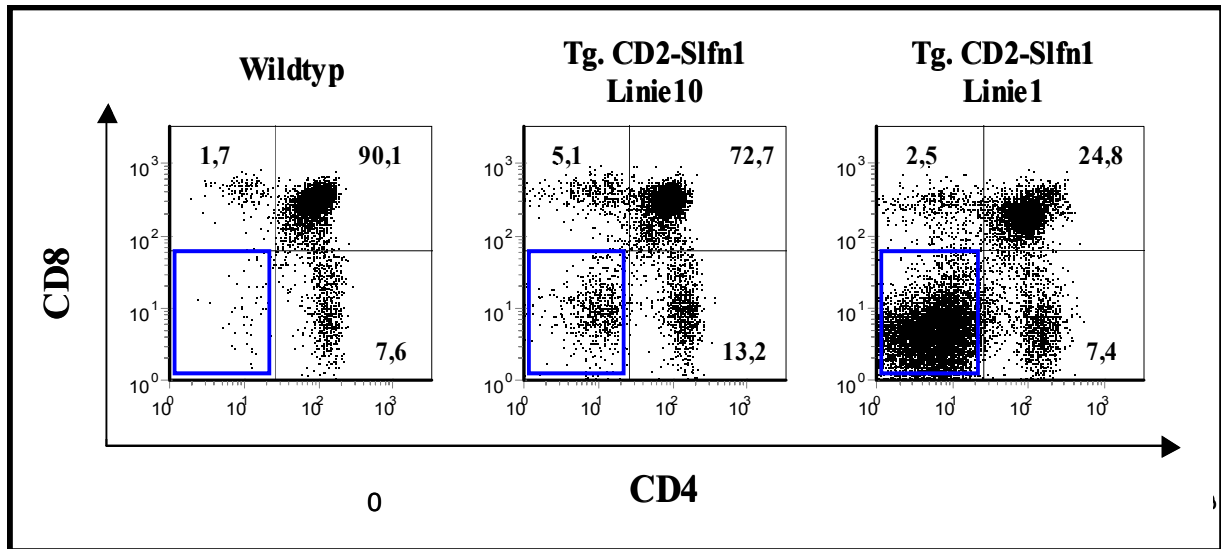


Abb. 28: FACS-Analysen von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Thymozyten

Unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-CD4 und Cy5-konjugierten anti-CD8 Antikörpern wurde die relative Anteile von CD4⁺, CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻-Thymozyten im Thymus von Wildtyp-Mäusen und den beiden Slfn1-transgenen Mauslinien (Tg.CD2-Slfn1 Linie10 und Tg.CD2-Slfn1 Linie 1) bestimmt. Die Darstellung als Dot-Blots zeigt die prozentuale Verteilung von Thymozyten, die sich in verschiedenen Stadien der T-Zellentwicklung befinden.

Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die transgene Slfn1-Expression die intrathymische T-Zellentwicklung im CD4⁻CD8⁻-DN-Vorläufer-T-Zellstadium inhibiert.

Durch die Expression des Adhäsionsmoleküls CD44 und des IL-2-Rezeptors CD25 an der Zelloberfläche können die unreifen Thymozyten (DN) in CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD44⁻CD25⁺ (DN3) und CD44⁻CD25⁻ (DN4) unterschieden werden. Es ist anzunehmen, dass durch die transgene Slfn1-Expression die Thymozytenentwicklung in einem der vier DN-T-Zellstadien inhibiert wird und dies folglich zu einer erhöhten Akkumulation von Thymozyten in einer dieser Phasen führt.

Um festzustellen, in welcher der vier CD4⁻CD8⁻-DN-Thymozytenphasen die Differenzierung der Vorläufer-T-Zellen inhibiert wird, wurden die relative Anteile von CD44⁺CD25⁻-(DN1), CD44⁺CD25⁺-(DN2), CD44⁻CD25⁺-(DN3) und CD44⁻CD25⁻-(DN4) Thymozyten von beiden Slfn1-transgenen Mauslinien vergleichend zur Wildtyp-Kontrolle mittels FACS-Analysen bestimmt. Um die CD4⁻CD8⁻-DN-Vorläufer-T-Zellen von den CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺-Thymozyten in den FACS-Analysen unterscheiden zu können, wurden die gesamten Thymozyten zunächst mit den PE-konjugierten anti-CD4-, anti-CD8 und anti-CD3-Antikörpern gefärbt (Abb30). Unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-CD44 und von Cy5-konjugierten anti-CD25-Antikörpern konnten nun die relative Anteile der vier CD4⁻CD8⁻-DN-Thymozytenpopulationen analysiert werden.

Die Analyse der vier DN-Thymozytenpopulationen zeigt eine signifikante Erhöhung der relativen Anteile von $CD25^+CD44^-$ -Vorläufer-T-Zellen in beiden *Slfn1*-transgenen Mauslinien (Abb.30). In den nicht-transgenen Wildtypkontrollen beträgt der relative Anteil von $CD25^+CD44^-$ -Thymozyten von den gesamten DN-Thymozyten etwa 42 %, während sich diese Zellpopulation in beiden transgenen Thymi nahezu verdoppelt (Abb. 29).

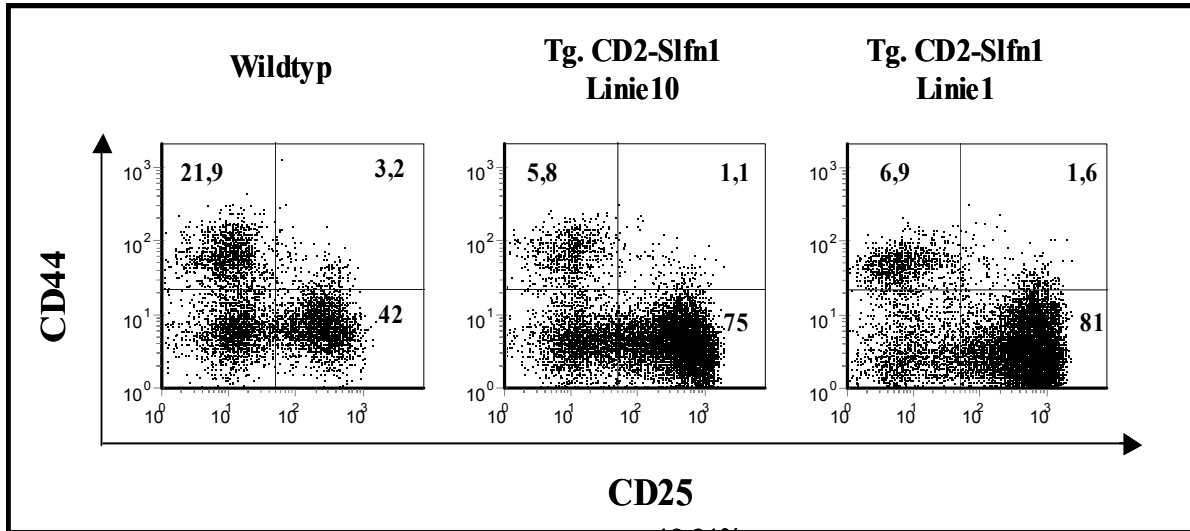


Abb. 29: FACS-Analysen von Wildtyp- und *Slfn1*-transgenen Thymozyten im DN-T-Zellstadium

Unter Verwendung von Cy5-konjugierten anti-CD25 und von FITC-konjugierten anti-CD44 Antikörper wurden die vier Zellpopulation im DN-T-Zellstadium von *Slfn1*-transgenen und Wildtyp-Mäusen analysiert. Die Darstellung als Dot-Blots zeigt die prozentuale Verteilung von Thymozyten, die sich in verschiedenen DN-Stadien der T-Zellentwicklung befinden.

In Linie10 akkumulieren ca. 75 % und in Linie1 mehr als 80 % der DN-Zellen im $CD25^+CD44^-$ -T-Zellstadium, welches eine deutliche Erhöhung im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle bedeutet (Abb. 30B).

Die signifikante Akkumulation von Thymozyten im $CD25^+CD44^-$ -Pre-T-Zellstadium zeigt, dass die transgene *Slfn1*-Expression die T-Zelldifferenzierung im DN3-Stadium ($CD25^+CD44^-$) blockiert. Die neu generierten Mauslinien zeigen damit einen übereinstimmenden Phänotyp mit der bereits publizierten *Slfn1*-transgenen Mauslinie.

Die beschriebene Arretierung der T-Zellen im DN3-Stadium und die daraus resultierende Verringerung der Zellzahl im Thymus haben auch Auswirkungen auf die Zellularität der peripheren lymphatischen Organe (Abb. 28). Die deutlich geringere Zellzahl der Milz und der Lymphknoten in den *Slfn1*-transgenen Mäusen könnte auf eine Verminderung der relativen Anteile von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurden zunächst die relativen Anteile der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen in den Milzen und in den

Lymphknoten von Wildtyp und von beiden Slfn1-transgenen Mauslinien mittels FACS-Analysen bestimmt. Dazu wurden die jeweiligen lymphoiden Organe aus den entsprechenden Mauslinien isoliert und die relativen Anteile der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellpopulationen, nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern, mittels FACS-Analysen bestimmt.

Überraschender Weise sind die relativen Anteile der CD8⁺-T-Zellen in den transgenen Milzen der Linie 1 um durchschnittlich das 4fache bzw. in den Lymphknoten um das 2fache erhöht. Im Vergleich dazu bleiben die relativen Anteile von CD4⁺-T-Zellen in beiden Organen vergleichend zur Wildtypsituation verhältnismässig gleich. Demzufolge ändert sich das Verhältnis der peripheren CD4⁺ zu CD8⁺-T-Zellen zu Gunsten der CD8⁺-T-Zellen (Abb.30).

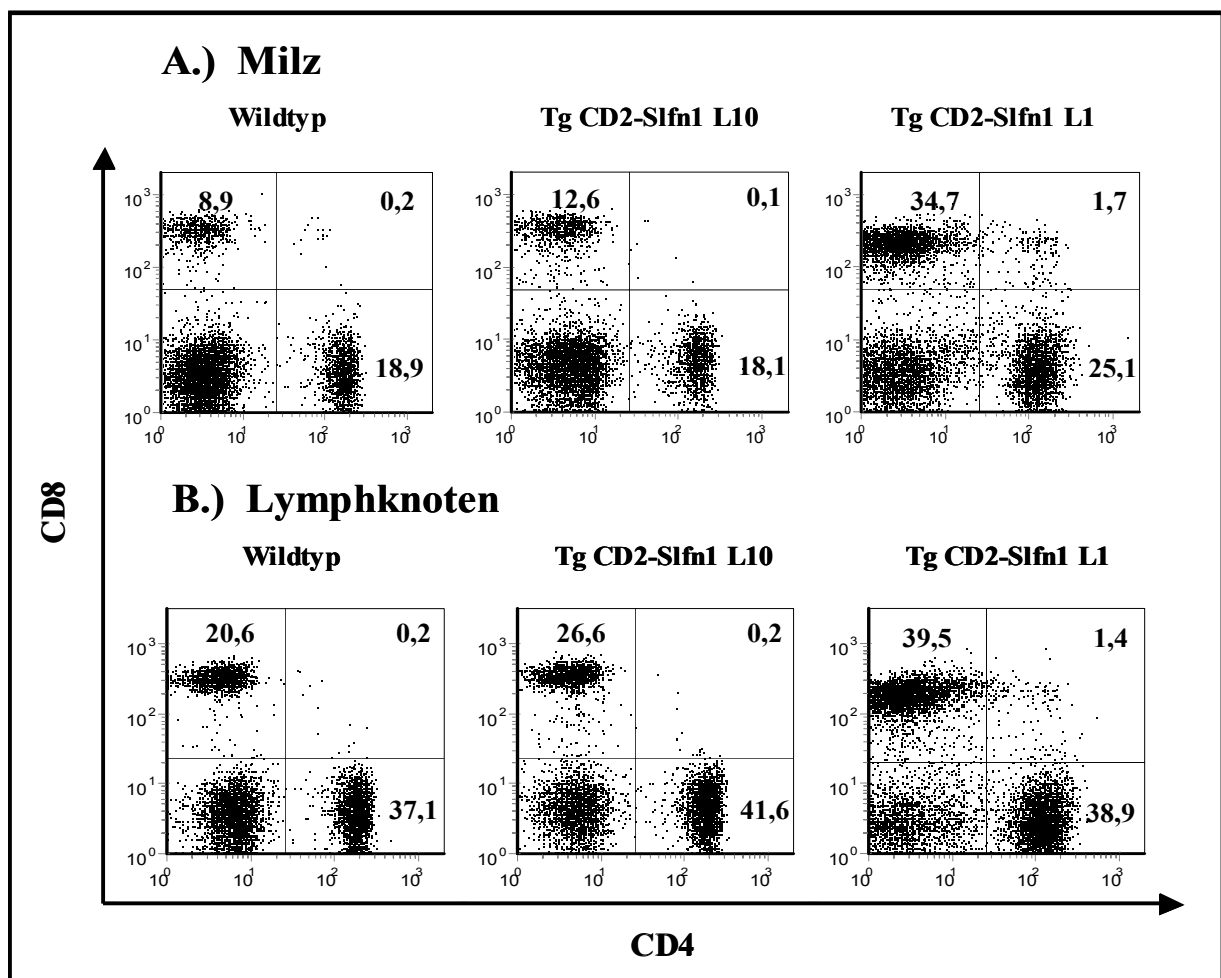


Abb. 30: FACS-Analysen von Wildtyp- und transgenen Slfn1-exprimierenden T-Zellen aus den peripheren lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten

Unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-CD4 und Cy5-konjugierten anti-CD8 Antikörpern wurde die Expression von CD4 und CD8 von T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von Wildtyp- und Slfn1-transgenen T-Zellen bestimmt. Die Darstellung als Dot-Blots zeigt die prozentuale Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen.

5.4 Einfluss des Slfn1-Transgens auf die Entwicklungen weiterer lymphozytärer Zellpopulationen

Die gleichbleibenden bzw. die erhöhten relativen Anteile von peripheren CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen und die deutlich geringere Zellularität in den sekundären lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mauslinien legt die Schlussfolgerung nahe, dass nicht nur das T-Zellkompartiment von der ektopischen Slfn1-Expression beeinflusst wird. Möglicherweise wird die Entwicklung von B-, NKT- oder die NK-Zellen ebenfalls von der transgenen Slfn1-Expression beeinflusst, was zur Folge haben könnte, dass die relativen Anteile dieser Zellpopulationen in den jeweiligen lymphoiden oder nicht lymphoiden Organen sinken.

B-Zellen sind durch die Expressionen des IgM-Rezeptors und des B220-Zelloberflächenproteins charakterisiert, während die NK-Zellen durch die Expression des NK1.1-Oberflächenmoleküls (-CD3) erfasst werden. Die NKT-Zellentwicklung ist ein Thymus-abhängiger Prozess (Pellicci et al., 2003). Diese Lymphozytenpopulation exprimiert den $\alpha\beta$ -TZR, einschliesslich CD3 und den NK-Oberflächenrezeptor NKR-P1 (NK1.1 im C57BL/6 Mausstamm) (Martin et al., 2001) und wurden als eine distinkte Lymphozytenpopulation klassifiziert, die unter anderem in der Leber als CD4⁺TZR $\alpha\beta$ ⁺NK1.1⁺-NKT-Zellen vorkommen.

Um festzustellen, ob die Entwicklung der B-, NKT- oder der NK-Zellen durch die transgene Slfn1-Expression beeinflusst wird, wurden die relativen Anteile von B- und NK-Zellen in den Milzen und in den Lymphknoten von beiden Slfn1-transgenen Mauslinien und von CD4⁺NK1.1⁺-NKT-Zellen in der Leber der Slfn1-transgenen Linie 10 bestimmt. Dazu wurden die lymphoiden Organe bzw. die gesamten Lymphozyten aus den Lebern der jeweiligen Mauslinien präpariert und die Zellsuspensionen, nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten anti-NK1.1-, anti-CD3-, anti-CD4-, anti-IgM und anti-B220-Antikörpern, mittels FACS analysiert.

In der Milz und den Lymphknoten der Slfn1-transgenen Mäuse ist eine signifikante Verminderung der relativen Anteile von reifen B-Zellen zu beobachten. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen, dass der relative Anteil der gesamten B-Zellen in der Milz der transgenen Linie 10 durchschnittlich um das 2,5fache und in der Linie 1 ca. um das 9fache und in den Lymphknoten ebenfalls um das 2,5fache in beiden Linien sinkt. Im Vergleich dazu ist der relative Anteil von NK-Zellen in der Milz in beiden transgenen Linien um den Faktor 6 erhöht (Abb. 31), wobei die absoluten NK-Zellzahlen nur geringfügige Variationen aufzeigen (Abb. 32). Die NKT-Zellentwicklung wird ebenfalls durch die transgene Slfn1-Expression negativ beeinflusst. Dies wird deutlich durch die drastisch

geringeren relativen Anteile von CD4⁺NK1.1⁺-NKT-Lymphozyten in der Leber der Slfn1-transgenen Mäusen (3 % in Linie 10) (Abb. 32).

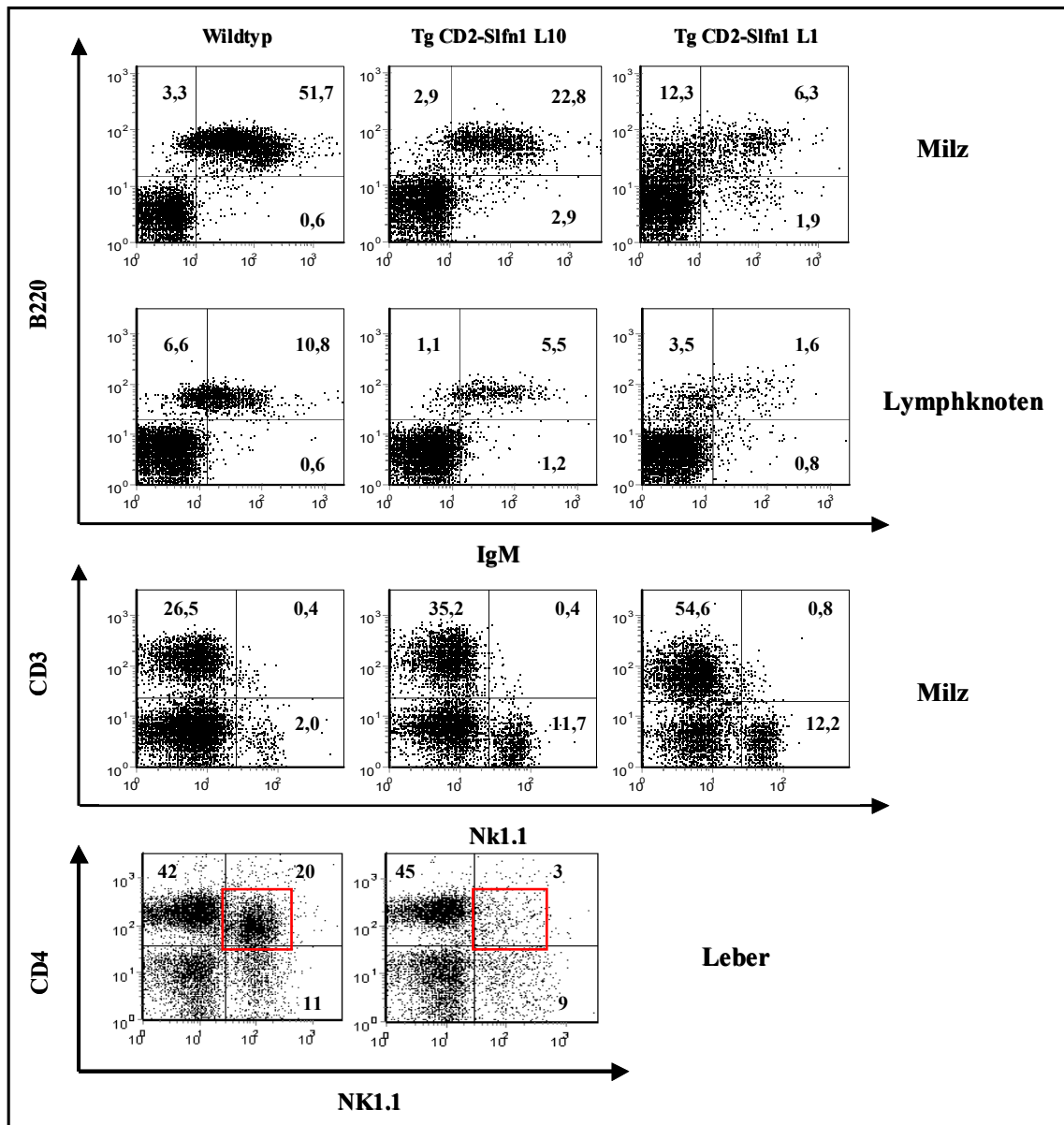


Abb. 31: FACS-Analysen zur Bestimmung der relativen Anteile von B-Zellen in Milz und Lymphknoten, von NK-Zellen in Milz bzw. von NKT-Zellen in der Leber von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen

Unter Verwendung von Cy5-konjugierten anti-B220 und PE-konjugierten anti-IgM bzw. von Cy5-konjugierten anti-CD3 und FITC-konjugierten anti-Nk1.1-Antikörpern wurde die Expression von B220 und IgM von reifen B-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten bzw. die Expression von Nk1.1 von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Thymozyten bestimmt. Die Darstellung als Dot-Blots zeigt die prozentuale Verteilung der gesamten B- und NK-Zellen in den Lymphknoten und den Milzen von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen. Unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-NK1.1- und Cy5-konjugierten anti-CD4-Antikörpern wurden die relativen Anteile von NKT-Zellen von aufgereinigten Lymphozyten aus der Leber von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen (Linie10) bestimmt. NK-T-Zellen exprimieren den Korezeptor CD4 und den Oberflächenrezeptor NK1.1 (rote Markierung).

	absolute Zellzahl			relative Anteile der Zellpopulationen		
	Wildtype (x10 ⁶) n = 13	Tg <i>CD2-Slfn 1</i> L10 (x10 ⁶) n = 7	Tg <i>CD2-Slfn 1</i> L1 (x10 ⁶) n = 7	Wildtype % n = 13	Tg <i>CD2-Slfn 1</i> L10 % n = 7	Tg <i>CD2-Slfn 1</i> L1 % n = 7
Thymus	124 ± 31	17,7 ± 4,7	3,8 ± 1,7	Thymus		
CD4 ⁺ SP	8,7 ± 3,2	1,6 ± 0,5	0,3 ± 0,2	7,0 ± 1,6	9,6 ± 2,2	8,8 ± 1,5
CD8 ⁺ SP	2,3 ± 0,7	0,5 ± 0,2	0,14 ± 0,1	1,9 ± 0,5	3,0 ± 1,2	3,6 ± 1,4
CD4 ⁺ CD8 ⁺ DP	111 ± 27,8	13,9 ± 3,4	1,4 ± 0,9	89,3 ± 1,5	78,5 ± 5,6	33,5 ± 13,1
CD4 ⁻ CD8 ⁻ DN	2,3 ± 1,3	1,7 ± 0,9	1,9 ± 0,7	1,8 ± 0,9	9,7 ± 4,5	54 ± 14
DN3 CD44 ⁺ CD25 ⁺	0,8 ± 0,4	1,00 ± 0,7	1,5 ± 0,6	38,3 ± 5,4	79,2 ± 2,9	79 ± 1,8
Milz	83,5 ± 14,4	31,7 ± 6	8,3 ± 1,6	Milz		
CD4 ⁺ SP	15,2 ± 3,7	6,4 ± 1,3	1,3 ± 0,5	18,3 ± 3,5	20,2 ± 1,8	15,9 ± 6,9
CD8 ⁺ SP	8,8 ± 1,6	4,3 ± 0,8	2,1 ± 0,7	10,7 ± 2,0	13,8 ± 1,4	25,5 ± 7,8
IgM/B220	36,5 ± 8,8	7,8 ± 2,2	1,0 ± 0,4	43,3 ± 5,7	24,6 ± 3,7	12,2 ± 4,5
NK 1.1	1,8 ± 0,6	3,2 ± 0,6	1,2 ± 0,3	2,2 ± 0,4	10,3 ± 0,8	13,9 ± 3,4
Lymphknoten	25,1 ± 8,1	12,3 ± 3,6	2,2 ± 0,7	Lymphknoten		
CD4 ⁺ SP	9,9 ± 2,8	5,6 ± 2,1	0,8 ± 0,3	39,9 ± 7,8	38,3 ± 1,7	35 ± 5,9
CD8 ⁺ SP	6,3 ± 2,0	4,8 ± 1,7	0,8 ± 0,3	25,7 ± 4,6	32,5 ± 2,4	35,1 ± 2,4
IgM/B220	6,1 ± 2,7	1,3 ± 0,5	0,1 ± 0,07	25,2 ± 11,8	8,9 ± 1,3	4,4 ± 2,0

Abb. 32: Darstellung der absoluten Zellzahlen und der relativen Anteile von verschiedenen Zellpopulation im Thymus, in der Milz und in den Lymphknoten von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 1 und der Linie 10.

Die absoluten Zellzahlen und die relativen Anteile von verschiedenen Lymphozytenpopulationen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten von 13 Wildtyp- und von jeweils 7 Slfn1-transgenen Mäusen von beiden Linien wurden einschliesslich der Standardabweichung bestimmt.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Slfn1-Transgen auch in B-Zellen, jedoch nicht in NK-Zellen, exprimiert wird und dadurch die B-Zellontogenie in einer bestimmten Phase der Differenzierung beeinträchtigt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Berichten, dass die CD2-Kassette auch in B-Zellen exprimiert wird (Kioussis et al., 1996). Der Slfn1-induzierte T-Zellentwicklungsblock im DN3-Stadium ($CD25^+CD44^-$) beeinflusst auch die intrathymische Ontogenie der NKT-Zellen und führt somit zu einer Verminderung der $CD4^+NK1.1^+$ -NKT-Zellen in der Leber.

Die Abbildung 33 fasst die Befunde der FACS-Analysen in tabellarischer Form zusammen. Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass das Slfn1-Transgen im Thymus besonders die Zellularität von $CD4^+CD8^+$ - und $CD4^-CD8^-$ - T-Zellen beeinflusst. Von der Slfn1-Expression sind in den peripheren lymphoiden Organen sowohl T- als auch B-Lymphozyten betroffen, während die Entwicklung von NK-Zellen aufgrund der gleichbleibenden Zellzahlen nicht beeinflusst wird.

Auch das Darm-Epithel beinhaltet separate T-Lymphozytenpopulationen, die als intraepitheliale Lymphozyten (IELs) bezeichnet werden und deren Entwicklung konventionell in einem Thymus-abhängigen oder nicht-konventionell in einem intra-intestinal extrathymischen Prozess stattfindet. Thymus-abhängigen IELs im Dünndarm exprimieren vorrangig den $\alpha\beta$ -TZR. Die Entwicklung dieser Lymphozytenpopulationen könnte ebenfalls durch die transgene Slfn1-Expression beeinträchtigt sein. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die IELs des Dünndarms von Wildtyp und Slfn1-transgenen Mäusen isoliert und die relativen Anteile von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -TZR-exprimierenden Lymphozyten nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern mittels FACS bestimmt.

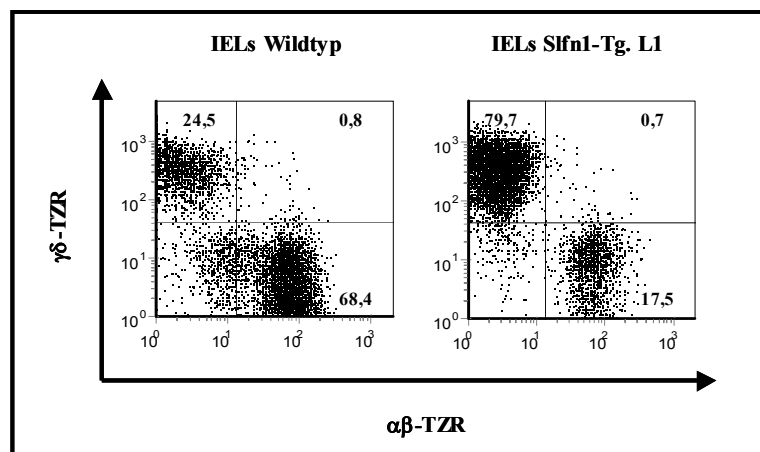


Abb. 33: FACS-Analysen zur Bestimmung der relativen Anteile von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -TZR exprimierenden IELs im Dünndarm von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen (Linie 10)

Unter Verwendung eines FITC-konjugierten anti- β -TZR- und eines PE-konjugierten anti $\gamma\delta$ -TZR-Antikörpers wurden die relativen Anteile von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -TZR-exprimierende IELs mittels FACS bestimmt. Die Darstellung als Dot-Blots zeigt die prozentuale Verteilung der verschiedenen IEL-Population im Dünndarm von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen (Linie10, Tg CD2 Slfn1).

Der relative Anteil von thymus-abhängigen $\alpha\beta$ -TZR-exprimierenden IELs ist mit ca. 17,5 % im Dünndarm der transgene Slfn1-Mäuse signifikant niedriger im Vergleich zu den 68 % der Wildtypkontrolle. Demzufolge steigt der relative Anteil der $\gamma\delta$ -TZR-exprimierenden IELs (Abb.33). Dieser Befund demonstriert, dass die Entwicklungen der Thymus-abhängigen IEL-Zellpopulationen auch von der transgenen Slfn1-Expression negativ beeinflusst werden.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen, dass die über den CD2-Promotor kontrollierte transgene Slfn1-Expression zu einer umfangreichen Beeinträchtigung von verschiedenen lymphoiden Zellpopulationen führt. Die T-Zellentwicklung ist im DN3-Thymozytenstadium inhibiert und dies führt zu einer deutlichen Verminderung der Zellularität in den primären und sekundären lymphoiden Organen und verändert die relativen Verhältnisse zwischen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen. Des Weiteren wurde eine signifikante Verminderung der relativen und absoluten Anteile von B-Lymphozyten in der Milz und in den Lymphknoten, von NKT-Zellen in der Leber und von $\alpha\beta$ -TZR-exprimierenden IELs im Dünndarm der Slfn1-transgenen Mäusen beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die transgene Expression von Slfn1 nicht nur die Ontogenie der T-Zellen, sondern auch die Entwicklung von B- und NKT-Zellen, jedoch nicht von $\gamma\delta$ - T- und NK-Zellen beeinträchtigt.

5.4.1 Charakterisierung von Slfn1-transgenen Thymozyten im DN3-Stadium der T-Zellentwicklung

Die verringerte Zellularität im Thymus und in den peripheren lymphoiden Organen in den Slfn1-transgenen Mäusen ist zurückzuführen auf einen Block im DN3-Stadium der T-Zell-Entwicklung. Die in vitro gefundenen Befunde zeigten, dass die retrovirale Slfn1-Expression in NIH3T3-Fibroblasten zunächst eine Wachstumsarretierung in der G_1 -Phase des Zellzyklusses und folgend den Prozess der Apoptose induziert, welche durch die erhöhte Expression von ER-Stress- und Apoptose-relevanten Genen vermittelt wird. Die von Hedrick und Mitarbeitern durchgeführten Studien an Slfn1-transgenen Mäusen zeigten vergleichend zur Wildtypkontrolle einen signifikant höheren Anteil von apoptotischen Thymozyten im transgenen Thymus (Schwarz et al., 1999).

Um festzustellen, ob es als Folge der Slfn1-Expression zur Induktion einer ER-Stressantwort kommt und in Folge dessen der Differenzierungsblock im DN3-Stadium induziert und die Apoptose eingeleitet wird, wurde zunächst der Status der Xbp-1 mRNA in den Thymi von beiden Slfn1-transgenen Mauslinien untersucht. Dazu wurde die mRNA der gesamten Thymi von Wildtyp- und beiden Slfn1-transgenen Mauslinien isoliert, in cDNA umgeschrieben und

für PCR-Analysen verwendet. Der gesamte Thymus der Slfn1-transgenen Mäuse wurde verwendet, weil hier die dominante Thymozytenpopulation im CD25⁺CD44⁻DN3-Stadium vorliegt. Der Thymus der transgenen Linie 1 besteht aus nahezu 52 % aus DN3-Thymozyten. Die Xbp-1 mRNA in den Thymozyten der transgenen Mäusen liegt unprozessiert vor und verdeutlicht dadurch, dass eine ER-Stressinduktion nicht für die Slfn1-induzierte Inhibition der T-Zelldifferenzierung im DN3-Stadium und für die Einleitung des apoptotischen Prozesses verantwortlich ist (Abb. 34).

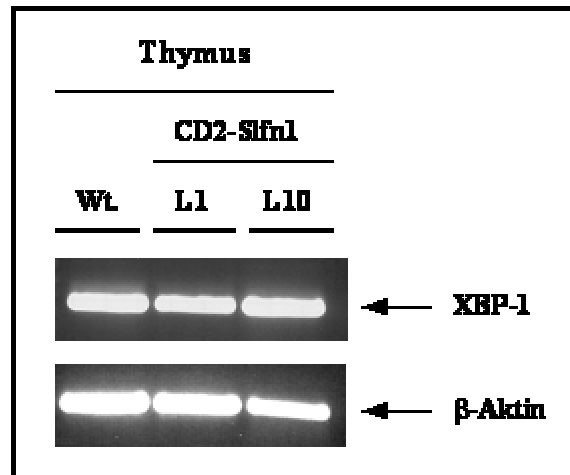


Abb. 34: PCR-Analysen zur Charakterisierung der Xbp-1-RNA aus den Thymi von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen

Die mRNA der gesamten Thymi von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 1 (L1) und der Linie 10 (L10) wurden isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die RT-PCR-Analysen verwendet. Zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der cDNA wurde parallel zu Xbp-1, β -Aktin amplifiziert. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden entweder in einem 1%igen (β -Aktin) oder in einem 2%igen (Xbp-1) Agarose-Gel separiert und dokumentiert.

Der Entwicklungsblock und die Apoptoseinduktion werden durch differentielle Genexpressionen hervorgerufen. Demzufolge könnte die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene einen Hinweis auf dem mechanistischen Aspekt der Slfn1-vermittelten Blockierung im Pro-T-Zellstadium liefern.

Um festzustellen, ob die Slfn1-induzierte Inhibition der T-Zellentwicklung im DN3-Stadium auf eine veränderte Genexpression zurückzuführen ist, wurden Microarray-Transkriptom- und quantitative PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurden CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD44⁻CD25⁺-Thymozyten aus den Thymi von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen (Linie10) sortiert, die mRNA isoliert und entweder für die quantitative PCR-Analysen in cDNA umgeschrieben oder für Microarray-Analysen verwendet. Für die quantitativen PCR-Analysen wurden die in den in vitro Experimenten genutzten Oligonukleotid-Primer verwendet.

Eine signifikante Veränderung in der Genexpression von Slfn1-exprimierenden CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD44⁻CD25⁺-Thymozyten konnte weder durch Microarray- noch durch quantitative PCR-Analysen beobachtet werden. Auch eine Regulation von Apoptose- oder Zellzyklus-relevanten Genen konnte in den Thymozyten in diesem T-Zellstadium nicht beobachtet werden. Ein Grund warum eine differentielle Genexpression nicht nachgewiesen werden konnte, besteht in der Möglichkeit, dass die Pro-T-Zellen durch die Slfn1-Expression frühzeitig in die Apoptose eintreten und diese apoptotischen Zellen unmittelbar durch Phagozytose eliminiert werden.

5.4.2 Charakterisierung von transgenen Slfn1-exprimierenden p53-KO-Mäusen (p53^{-/-} x Tg.-Slfn1^{+/-})

Die erfolgreiche Rekombination der TZR- β -Gene im DN2 und DN3-T-Zellstadium und die anschließende Expression des funktionellen Pro-TZRs induziert intrazelluläre Signalkaskaden, die zur Proliferation der CD25⁺CD44⁻-Pro-T-Zellen führen. Die Expression eines nicht funktionellen Pro-TZRs resultiert in einer Inhibition der Thymozytenproliferation an dem eine p53-abhängiger Kontrollmechanismus involviert ist. Diese Umstände führen zur Inhibition der T-Zelldifferenzierung im DN3-Stadium und folglich zur verstärkten Akkumulation von CD25⁺CD44⁻-Thymozyten (Jacks et al., 1996; Haks et al., 1999). Die Rag1- und Rag2-Proteine sind ebenfalls essentielle Komponenten für die Einleitung der Rekombination der TZR- β -Gene. Das transgene Slfn1-Protein könnte zu einer erhöhten Expression des p53-Gens und zur Stabilisierung des p53-Proteins führen oder die Rekombination der β -TZR-Gene inhibieren oder mit den daraus resultierenden Signalen interferieren und in Folge dessen die Blockierung der T-Zelldifferenzierung im CD25⁺CD44⁻-Thymozytenstadium einleiten. Um festzustellen, ob p53 an der Slfn1-induzierten Inhibition der T-Zellontogenie involviert ist, wurden p53-defiziente-Mäuse mit heterozygoten Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 10 gekreuzt. Eine p53-Defizienz könnte möglicherweise die Entwicklungs-inhibierende Wirkung des transgenen Slfn1-Proteins kompensieren.

Zunächst sollte festgestellt werden, ob durch die p53-Defizienz die Slfn1-induzierte Blockierung der T-Zelldifferenzierung aufgehoben wird und sich dadurch die Zellzahl der Thymozyten im Thymus und der T-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen, z.B. in der Milz und den Lymphknoten, auf dem Niveau der Wildtypkontrolle normalisiert. Um der Frage nachzugehen, ob der Differenzierungsblock der DN3-Thymozyten durch die p53-Defizienz aufgehoben wird, wurden im Anschluss die relativen Anteile von CD4⁺-, CD8⁺-, CD4⁺CD8⁺ und von den vier CD4⁻CD8⁻-Thymozytensubpopulation bestimmt. Dazu wurden

die Thymi, die Milzen und die Lymphknoten aus den Slfn1-transgenen Mäusen mit p53-Defizienz, den p53-KO-, den Slfn1-transgenen und nicht-transgenen Kontrolltieren entnommen, deren absolute Zellzahlen und die relativen Anteile der verschiedenen Thymozytensubpopulation mittels FACS bestimmt.

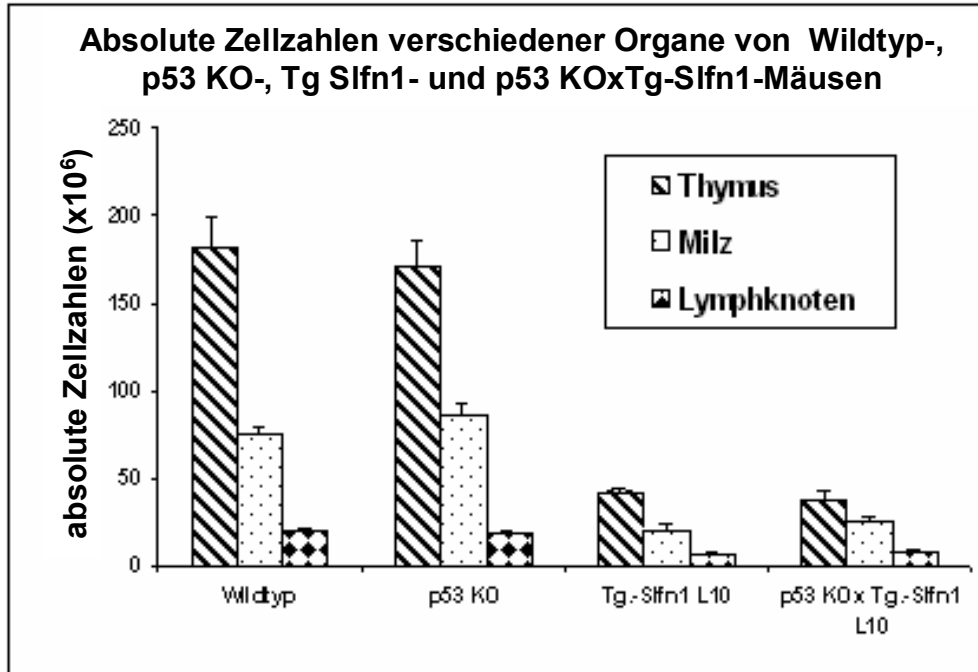


Abb. 35: Darstellung der absoluten Zellzahlen verschiedener lymphoider Organe von Wildtyp-,p53 KO-, Slfn1-transgenen- und p53KO x Slfn1-transgenen-Mäusen

Die Organe (Thymus, Milz und Lymphknoten) von jeweils drei Mäusen eines Genotyps wurden isoliert und die absoluten Zellzahlen bestimmt. (p53-KO: Mäuse mit p53-Defizienz; Tg.-Slfn1: transgene Slfn1-Mauslinie 10; p53 KO x Tg.-Slfn1: transgenen Slfn1-Maus mit p53-Defizienz)

Während der Organentnahme aus den jeweiligen Mauslinien konnte beobachtet werden, dass die Größen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten von beiden Slfn1-transgenen Mauslinien, unabhängig vom p53-Genotyp, im Vergleich zur nicht-transgenen Wildtyp- oder p53-KO-Kontrolle signifikant kleiner waren. Dementsprechend sind deren absolute Zellzahlen deutlich geringer (Abb. 35). Hinsichtlich der Zellularität und der zellulären Komposition werden keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrolltieren und p53-defizienten Mäusen gefunden (Abb. 35 und 36). Die p53-Defizienz hat keinen Einfluss auf den Slfn1-transgenen Phänotyp. Die Thymozyten der transgenen Slfn1^{+/-}p53^{-/-}-Mäusen akkumulieren ebenfalls verstärkt im CD25⁺CD44⁻-Pro-T-Zellstadium. Die relativen Anteile von CD4⁺-, CD8⁺- und CD4⁺CD8⁺-Thymozyten (Abb.36) und von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, sowie von B-Zellen in der Peripherie, sind gegenüber den Lymphozytenpopulationen in den Slfn1-transgenen Mäusen unverändert (Daten partiell nicht gezeigt). Diese Befunde

bestätigen die Vermutung, dass das transgene Slfn1-Protein die Inhibition der T-Zelldifferenzierung in einem p53-unabhängigen Mechanismus induziert.

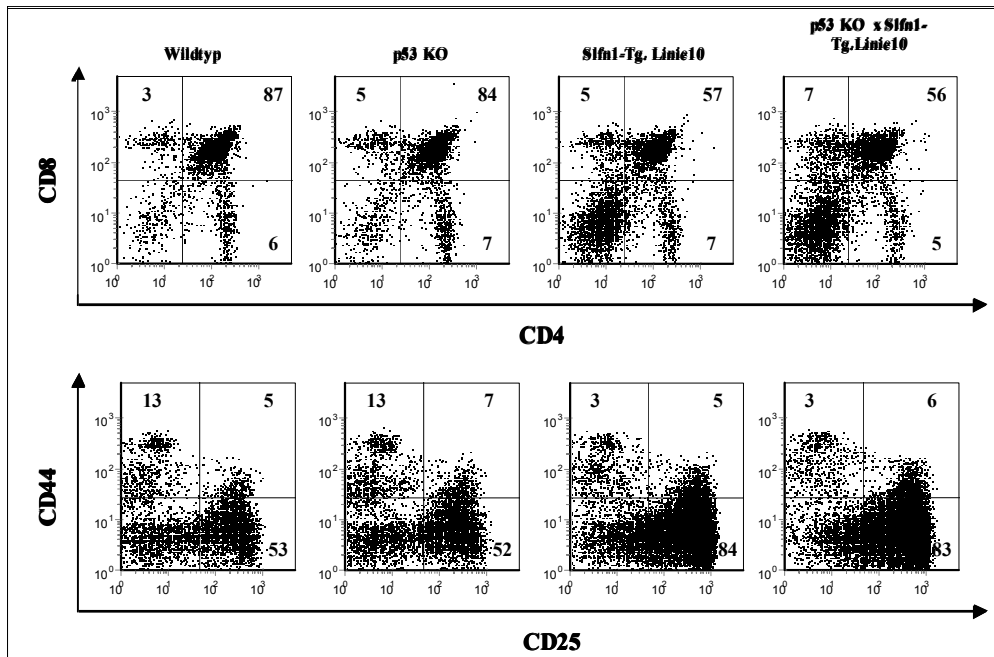


Abb. 36: FACS-Analysen zur Bestimmung der relativen Anteile von CD4-, CD8-, CD44- und CD25-Thymozyten in den Thymi von Wildtyp-, p53 KO-, Slfn1-transgenen und p53KO x Slfn1-transgenen Mäusen

Unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-CD4 und Cy5-konjugierten anti-CD8- bzw. von FITC-konjugierten anti-CD44 und Cy5-konjugierten anti-CD25-Antikörpern wurden die relativen Anteile der jeweiligen Thymozytenpopulationen von den jeweiligen Thymi mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die DN-Thymozyten konnten unter Verwendung von PE-konjugierten anti-CD3/CD4/CD8-Antikörpern von den CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen differenziert analysiert werden.

5.4.3 Analyse von Slfn1-exprimierenden Lymphknoten-T-Zellen

In vorangegangenen Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass reife naive T-Zellen vom C57BL/6 Wildtypmausstamm Slfn1 exprimieren und das Expressionniveau nach TZR-vermittelter Aktivierung stark negativ reguliert wird. Die Northern-Blot-Analysen (Abb.25) zeigten, dass das Slfn1-Expressionsniveau in den aufgereinigten transgenen naiven peripheren T-Zellen gegenüber den Wildtyp-T-Zellen ca. um den Faktor 2-3 erhöht ist. Durch quantitative PCR-Analysen sollte festgestellt werden, in welchem Masse sich das gesamte slfn1-Expressionsniveau in den peripheren Slfn1-transgenen T-Zellen nach TZR/CD28-vermittelter Aktivierung verändert. Dazu wurden die Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen über Nylonwollsäulen angereichert und mit immobilisierten anti-CD3 und löslichen anti-CD28-Antikörpern nicht (0d) oder für 1d und 2d stimuliert. Die mRNAs der nicht-stimulierten und stimulierten T-Zellen wurde isoliert, in cDNA

umgeschrieben und für die quantitativen PCR-Analysen, unter Benutzung von slfn1-spezifischen Primern, verwendet.

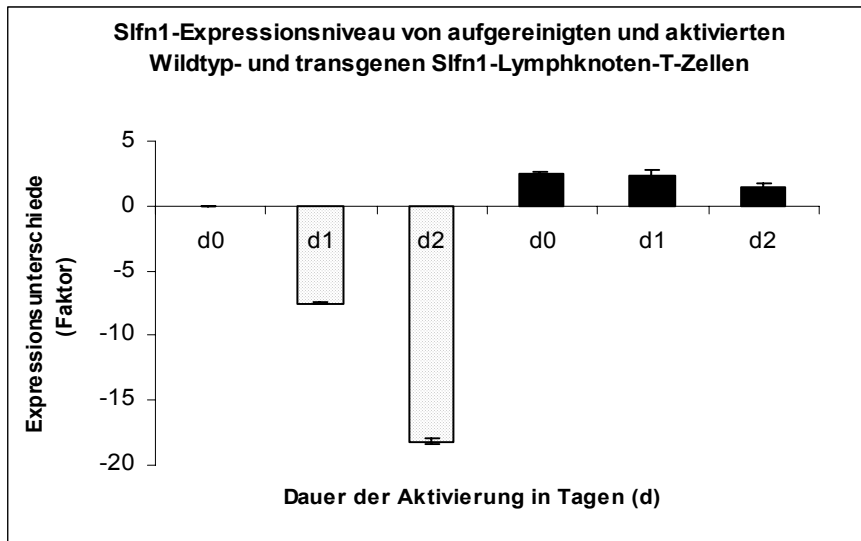


Abb. 37: Quantitative PCR-Analysen zur Prüfung des Slfn1-Expressionsniveaus von Aufgereinigten, aktivierten und nicht-aktivierten peripheren Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen der Linie10

Die cDNAs von aktivierten und nichtaktivierten Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen der Linie10 wurden hinsichtlich der Slfn1-Expression in quantitativen PCR-Analysen untersucht. Zur Normalisierung der cDNA-Mengen wurde in einem Parallelansatz die Expression von β -Aktin überprüft. Die Darstellung zeigt die Slfn1-Expressionsunterschiede als Faktoren von aktivierten T-Zellen beider Linien (Wildtyp und Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 10) im Vergleich zu den naiven Wildtyp-T-Zellen. Das Slfn1-Expressionsniveau von aktivierten Wildtyp-T-Zellen und von nicht-aktivierten und aktivierten Slfn1-transgenen T-Zellen wurde auf die nichtaktivierten Wildtyp-T-Zellen normalisiert. Es wurde von jedem Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt. $1 \cdot 10^7$ über Nylonwollsäulen angereicherte Lymphknoten-T-Zellen wurden entweder nicht oder für 1-2 Tage (d) stimuliert. Für die T-Zell-Stimulation wurden $8 \mu\text{g}$ anti-CD3-Antikörper auf 24 Loch-Platten immobilisiert. Zur Kostimulation wurden $10 \mu\text{g/ml}$ löslichen anti-CD28-Antikörper zum Aktivierungsansatz hinzugegeben.

Eine signifikante Reduktion der Slfn1-Expression ist in Wildtyp-T-Zellen 1 d (Reduktion um den Faktor 7) und 2d (Reduktion um den Faktor 20) nach TZR/CD28-vermittelter Stimulation auch in den quantitativen PCR-Analysen zu erkennen (Abb.37). Im Gegensatz dazu ist das Slfn1-Expressionsniveau in den naiven Slfn1-transgenen T-Zellen um den Faktor 2-3 und auch 1d bzw. 2d nach Stimulation unverändert erhöht (Abb. 37).

Die in etwa gleichbleibend höhere Slfn1-Expression in den aktivierten Slfn1-transgenen Lymphknoten-T-Zellen kann mit der konstitutiven Aktivität des CD2-Promotors erklärt werden, der eine konstitutive Expression des transgenen Slfn1-Proteins von der frühen Phase der T-Zellentwicklung bis zur aktivierten oder Gedächtnis-T-Zelle gewährleistet. Demgegenüber wird die endogene slfn1-Expression vom Slfn1-Promotor kontrolliert, dessen Aktivität von transkriptions-regulierenden Faktoren bestimmt wird. Daher wird die endogene Slfn1-Expression nach TZR-vermittelter Aktivierung herunterreguliert.

5.4.4 Analysen zum nicht-proliferativen Überleben von Wildtyp- und von transgenen Sfn1-exprimierenden naiven peripheren Lymphknoten-T-Zellen (Linie 10)

Eine retrovirale Sfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten induziert eine Wachstumsarretierung in der G₁-Phase des Zellzyklusses und induziert in Folge dessen den programmierten Zelltod. Die transgene Sfn1-Expression könnte sich ebenfalls negativ auf das Wachstum oder das nicht-proliferative Überleben der peripheren T-Zellen auswirken. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde das nicht-proliferative Überleben und das proliferative Verhalten von Sfn1-exprimierenden Lymphknoten-T-Zellen analysiert.

Dazu wurden Lymphknoten-T-Zellen aus Wildtyp- und Sfn1-transgenen Mäusen (Linie10) angereichert, die lebenden von den toten T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Lympholyt M getrennt und deren Überleben ohne mitogene Stimulation für die Dauer von vier Tagen unter normalen Zellkulturbedingungen beobachtet. Für die Proliferationsstudien wurden die Lymphknoten-T-Zellen von beiden Sfn1-transgenen Mauslinien (Linie1 und Linie 10) isoliert und gleiche Zellzahlen entweder mit seriellen Konzentrationen von anti-CD3-Antikörpern alleine oder in Verbindung mit löslichen anti-CD28-Antikörpern für 72h kostimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau von radioaktiven ³H-Thymidin bestimmt.

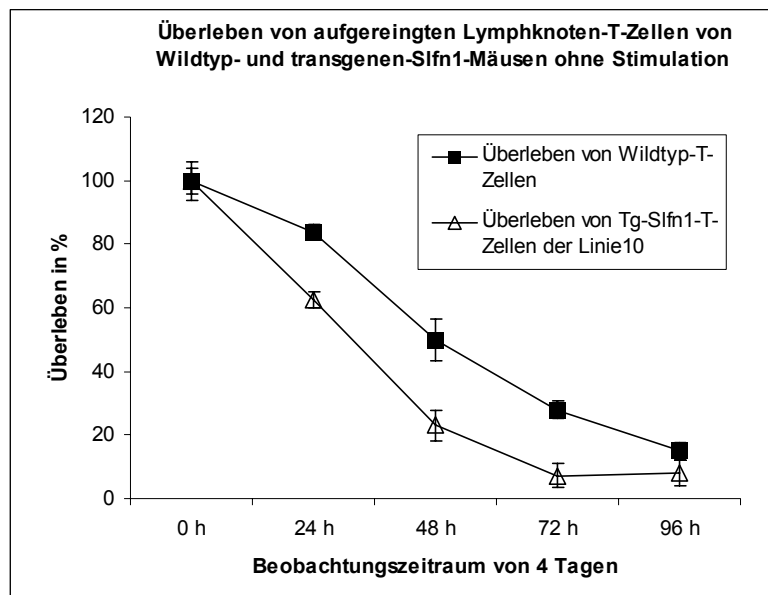


Abb. 38: Überleben von aufgereinigten, peripheren Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp- und Sfn1-transgenen Mäusen der Linie10 ohne mitogene Stimulation

Lymphknoten-T-Zellen wurden aus Wildtyp- und Sfn1-transgenen Mäusen der Linie10 mittels Nylonwolle angereichert und deren Überleben unter normalen Zellkulturbedingungen ohne exogene Stimulation innerhalb von vier Tage beobachtet. Die Bestimmung der lebenden T-Zellen erfolgte in den dargestellten Zeitpunkten in dreifach Ansätzen und unter Verwendung von Trypan-Blau.

Die transgene Slfn1-Expression führt zu einer signifikanten Verminderung des nicht-proliferativen Überlebens der peripheren Lymphknoten-T-Zellen. Dies ist insbesondere 24h und 48h nach Kultivierung offensichtlich. Die Lebendzellzahl der transgenen T-Zellen beträgt in etwa nur 60 % nach 24h bzw. 20 % nach 48h der Kultivierung. Demgegenüber überleben die Wildtyp-T-Zellen ohne mitogene Stimulation zu 80 % nach 24h und zu 55 % nach 48h. Der Anteil an vitalen T-Zellen sinkt ex vivo in beiden Mauslinien (Wildtyp und Slfn1-transgene Linie10) 4d nach Kultivierung auf etwa 20 % (Abb. 38). Dieses Experiment zeigt, dass die transgene Slfn1-Expression auch das nicht-proliferative Überleben der peripheren T-Zellen ex vivo negativ beeinflusst.

Interessanter Weise hat das Slfn1-Transgen keinen negativen Effekt auf das proliferative Verhalten der peripheren T-Zellen. Im Gegenteil, bereits geringfügige stimulatorische Signale führen im Vergleich zu den T-Zellen der Wildtypkontrolle in den transgenen T-Zellen der Linie 1 und 10 zu einer wesentlich stärkeren Proliferation. Die Einbaurate von ³H-Thymidin und demzufolge die Proliferationsrate ist besonders hoch, wenn die transgenen T-Zellen mit hohen anti-CD3-Antikörperkonzentrationen (2-4 µg) und/oder mit CD28-Antikörpern kostimuliert werden. Die T-Zellen von beiden transgenen Linien verhalten sich hinsichtlich der Proliferation sehr ähnlich. Unter kostimulatorischen Bedingungen haben die transgenen T-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-T-Zellen eine ca. um 40 % höhere Proliferationsrate. Interessant ist des Weiteren die Beobachtung, dass die Einbaurate von ³H-Thymidin von CD3-stimulierten transgenen T-Zelllinien genauso groß ist, wie die Einbaurate von T-Zellen der Wildtypkontrolle unter kostimulatorischen Bedingungen (Abb.39).

Die ursprüngliche Vermutung, dass das transgenen Slfn1-Protein auch in den peripheren T-Zellen zu einer Wachstumsinhibition führt, konnte in den durchgeführten Proliferationsanalysen nicht bestätigt werden. Aufgrund der ektopischen Slfn1-Expression wurde eine erhöhte Induktion des Zelltodes in den peripheren T-Zellen beobachtet, die Proliferationsrate ist jedoch nach mitogene Stimulation signifikant höher als in den Wildtyp-T-Zellen.

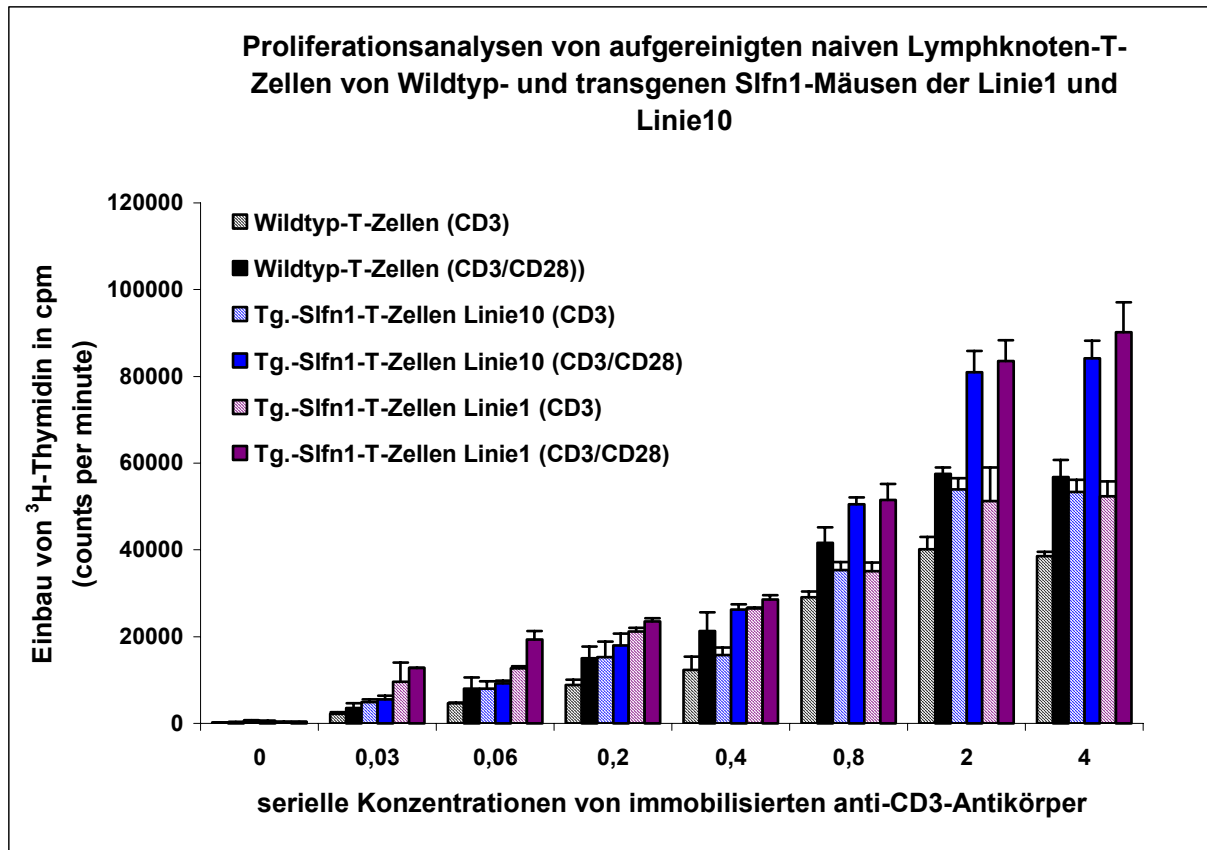


Abb. 39: Proliferationsanalysen von Wildtyp- und Slfn1-transgenen T-Lymphozyten nach CD3- oder CD3/CD28-vermittelter Stimulation

Aufgereinigte Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp und Slfn1-transgenen Mäusen (Linie1 und Linie 10) wurden mit seriellen anti-CD3-Antikörpermengen (in µg/ml) stimuliert oder in Verbindung mit 10µg/ml löslichen anti-CD28-Antikörper kostimuliert. 72h nach Aktivierung wurden 1µCi ³H-Thymidin/Ansatz dazugegeben und der radioaktive Einbau nach weiteren 8h gemessen. Es wurden von jedem Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt.

5.4.5 Produktion von IL-2 und IFN γ durch T-Zellen nach ex vivo Stimulation

Die CD3- bzw. die CD3/CD28-vermittelte Aktivierung von peripheren T-Zellen induziert ex vivo eine verstärkte Synthese von Typ1-Zytokinen, wie IL-2 und IFN γ (Jung et al., 2003). Die hyperproliferative Aktivität der Slfn1-transgenen peripheren T-Zellen nach CD3 bzw. CD3/CD28- vermittelter Stimulation korreliert möglicherweise mit einer erhöhten Sekretion von IL-2 und IFN γ . Um festzustellen, ob und wenn ja, in welchem Masse die Slfn1-Expression in den transgenen peripheren T-Zellen zu einer erhöhten Produktion und Sekretion von IL-2 und IFN γ führt, wurde die produzierte Menge der beiden Zytokine von transgenen Slfn1- und Wildtyp-T-Zellen 24h und 48h nach mitogene Stimulation mittels ELISA bestimmt. Dazu wurden die peripheren T-Zellen von Wildtyp und Slfn1-transgenen Mäusen

der Linie 10 präpariert und mit immobilisierten, seriellen Konzentrationen von anti-CD3-Antikörpern oder in Verbindung mit löslichen anti-CD28-Antikörpern kostimuliert.

Im allgemeinen ist zu beobachten, dass die Zunahme der IL-2-Konzentration mit der Stärke des aktivierenden Stimulus und mit der Dauer der Aktivierung korreliert. Das kostimulatorische Signal vermittelt über den CD28-Korezeptor in allen Fällen zu einer deutlich höhere IL-2-Produktion als die alleinige Aktivierung über den CD3-Komplex. 48h nach Beginn der Stimulation wurde ebenfalls deutlich mehr IL-2 nachgewiesen als nach 24h. Es sind signifikante Unterschiede in den IL-2-Konzentrationen, die unter gleichen Aktivierungsbedingungen von den Slfn1-transgenen und den Wildtyp-T-Zellen produziert werden, erkennbar. Die aktivierten Wildtyp-T-Zellen produzierten 24 und 48 Stunden nach CD3-Stimulation weniger als 0,5µg/ml IL-2 und nach Kostimulation maximal ca. 11,6 µg/ml IL-2 (48h; 2µg/ml anti-CD3 + anti-CD28). Demgegenüber produzierten die transgenen Slfn1-exprimierenden T-Zellen 24 Stunden nach Aktivierung ca. 4 mal mehr IL-2 (siehe 2-4 µg/ml; CD3/CD28). Noch deutlicher sind die Unterschiede 48 Stunden nach Aktivierungsbeginn. Ohne kostimulatorisches Signal wird von den transgenen T-Zellen im Vergleich zu den aktivierten Wildtyp-T-Zellen 5-12 mal mehr und nach CD28-Kostimulation sogar 40-50 mal mehr IL-2 produziert (siehe 2-4 µg/ml; CD3/CD28; 48h; Abb.40A). Ähnliche Beobachtungen wurden für die Mengen an sekretiertem IFN γ festgestellt. Auch hier wird im Vergleich zu den nicht-transgenen T-Zellen von den Slfn1-transgenen T-Zellen 48h nach Aktivierung 2-3fach mehr IFN γ produziert. Unter kostimulatorischen Bedingungen wird von den aktivierten Wildtyp- und von den aktivierten Slfn1-transgenen T-Zellen deutlich mehr IFN γ produziert. Gegenüber den Wildtyp-T-Zellen ist die Konzentration von IFN γ in den CD3/CD28 kostimulierten transgenen T-Zellen um den Faktor 2-3 erhöht (Abb. 40B). 24h nach Aktivierungsbeginn konnten keine messbaren IFN γ -Konzentrationen nachgewiesen werden.

A

IL-2 Konzentration in ng/ml								
24h					48 h			
immobilisiert [anti CD3] in µg/ml	Wildtyp		Tg-Slfn1 Linie10		Wildtyp		Tg-Slfn1 Linie10	
	CD3	CD3/CD28	CD3	CD3/CD28	CD3	CD3/CD28	CD3	CD3/CD28
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,2	0,02	0,05	0,1	0,26	0,06	1	0,54	21,6
0,4	0,07	0,11	0,14	0,36	0,11	1,1	1,11	24,4
0,8	0,1	0,12	0,29	0,65	0,19	1,97	1,57	129,2
2	0,2	1	0,87	4,77	0,26	11,6	3,3	538,4
4	0,3	1,4	0,85	6,84	0,41	9,5	1,5	486,2

B

IFN γ Konzentration in U/ml				
48 h				
immobilisiert [anti CD3] in µg/ml	Wildtyp		Tg-Slfn1 Linie10	
	CD3	CD3/CD28	CD3	CD3/CD28
0	0	0	0	0
0,2	1,7	11,5	3,5	19,9
0,4	2,7	20,7	4,7	34,2
0,8	3,1	38,9	7,4	51,5
2	9,3	134,2	30,1	254,2
4	8,8	121	24,9	244,2

Abb. 40: IL-2- (in ng/ml) und IFN γ -Produktion (in U/ml) von aktivierten Wildtyp- und Slfn1-transgenen T-Lymphozyten 24h und 48h nach Aktivierung

Periphere Lymphknoten-T-Zellen wurden von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen präpariert und entweder mit seriellen immobilisierten anti-CD3-Antikörperkonzentrationen oder in Verbindung mit löslichen anti-CD28-Antikörpern (10µg/ml) für 24h bzw. 48h stimuliert. Die IL-2- und IFN γ -Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Von jedem Ansatz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

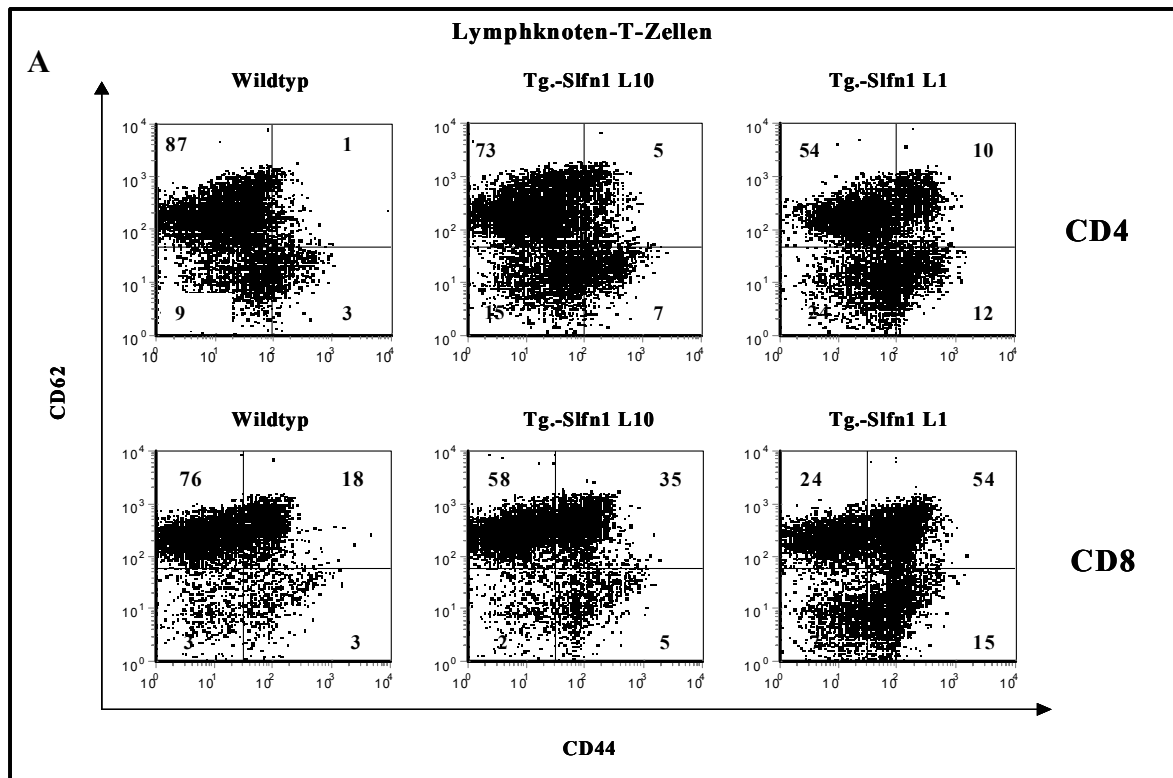
Zusammenfassend ist zu erkennen, dass ohne mitogene Stimulation und ohne die Anwesenheit von exogenen Zytokinen die Slfn1-transgenen Lymphknoten-T-Zellen bedeutend schneller sterben als die Wildtyp-T-Zellen. Die transgene Expression von Slfn1 in den peripheren T-Zellen führt nach CD3/CD28-vermittelter Stimulation jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferation. 48h nach Beginn der TZR/CD28-vermittelten T-Zellaktivierung werden von den Slfn1-transgenen T-Zellen deutlich höhere Mengen von IL-2 und IFN γ sekretiert. Diese reaktiven Eigenschaften der Slfn1-transgenen T-Zellen entsprechen weniger dem Phänotyp einer normalen naiven T-Zelle, sondern eher dem einer Gedächtnis-T-Zelle.

5.4.6 Überprüfung des Aktivierungsgrades der Slfn1-transgenen peripheren T-Zellen

Ruhende naive T-Zellen exprimieren das CD62L-Oberflächenmolekül (L-Selektin), deren Expression nach T-Zellaktivierung signifikant vermindert wird und das für das „Homing“ von T-Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten notwendig ist (Mackay et al., 1993). Der aktivierte Zustand einer T-Zelle ist unter anderem gekennzeichnet durch die Expression des CD44-Zelloberflächenmoleküls, ein Zelladhäsionsmolekül, dass an der Modulation der T-Zellantwort und am Prozess des lymphozytären „Thymus-Homing“ beteiligt ist (O’Neill et al., 1987; O’Neill et al., 1992). Der Status der T-Zellaktivierung kann durch die Expression von CD44 und CD62 bestimmt werden. Eine Besonderheit stellen die Gedächtnis-T-Zellen dar, die partiell beide Zelloberflächenmoleküle (CD44 und CD62) koexprimieren (Mackay et al., 1993).

Ein möglicher Grund für die hyperproliferative Aktivität und für die erhöhte Produktion von IL-2 und IFN γ könnte darin bestehen, dass die Slfn1-exprimierenden T-Zellen in einen aktivierten (CD44⁺CD62⁻) oder prä-aktivierten (CD44⁺CD62⁺) Zustand, der einer Gedächtnis-T-Zelle ähnlich ist, vorliegen. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde der Aktivierungsgrad durch Darstellung der CD44 und CD62L-Expression auf den Slfn1-transgenen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten überprüft. Dazu wurden die jeweiligen lymphoiden Organe aus den Wildtyp und aus beiden Slfn1-transgenen Mauslinien entfernt und die relativen Anteile von CD44- und CD62L-exprimierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD44- und anti-CD62L-Antikörpern, durch FACS bestimmt.

Die Abbildung 41A zeigt exemplarisch die Ergebnisse der FACS-Analysen, in denen die relativen Anteile von CD62- und/oder CD44-exprimierenden CD4⁺- und CD8⁺-Lymphknoten-T-Zellen dargestellt sind. Die Slfn1-exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺-Lymphknoten-T-Zellen der beiden transgenen Linien haben partiell einen prä-aktivierten Phänotyp, dem der einer Gedächtnis-T-Zelle (CD44⁺CD62⁺) ähnlich ist. Mehr als 50 % der CD8⁺- und ca. 10 % der CD4⁺-Lymphknoten-T-Zellen der transgenen Linie 1 sind CD44⁺CD62L⁺. In den Lymphknoten der transgenen Linie 10 beträgt der relative Anteil der CD4⁺CD44⁺CD62⁺-T-Zellen etwa 5 % und der der CD8⁺CD44⁺CD62⁺ T-Zellen ca. 35 %. Zusätzlich wird eine signifikante Zunahme von aktivierten CD4⁺CD44⁺CD62⁻- und CD8⁺CD44⁺CD62⁻-T-Zellen in beiden transgenen Linien beobachtet. Die Tabelle in Abbildung 41B fasst die Ergebnisse eines zweiten Experimentes zusammen und zeigt, dass auch in den Milzen der Slfn1-transgenen Mäusen die relativen Anteile von



B

	Milz CD4			LN CD4		
	Wildtyp %	Tg.-slfn1 L10 %	Tg.-slfn1 L1 %	Wildtyp %	Tg.-slfn1 L10 %	Tg slfn1 L1 %
gesamt CD62 ⁺	72,7 ± 1,6	59,4 ± 1,9	48,2 ± 6,4	82,2 ± 2,8	79,6 ± 1,5	67,8 ± 2,9
gesamt CD44 ⁺	17,1 ± 0,7	23,8 ± 6,1	36,6 ± 2,8	6,5 ± 1,4	11,7 ± 0,5	19,7 ± 1,6
CD62 ⁺ CD44 ⁺	7,5 ± 0,5	9,8 ± 2,0	15,0 ± 2,0	2,3 ± 0,8	5,1 ± 0,2	8,0 ± 1,6
	Milz CD8			LN CD8		
	Wildtyp %	Tg.-slfn1 L10 %	Tg.-slfn1 L1 %	Wildtyp %	Tg.-slfn1 L10 %	Tg.-slfn1 L1 %
gesamt CD62 ⁺	87,3 ± 0,8	81,1 ± 1,2	76,1 ± 0,3	93,5 ± 0,7	92,7 ± 0,5	82,5 ± 3,7
gesamt CD44 ⁺	14,5 ± 0,9	26,0 ± 2,0	41,2 ± 0,8	5,7 ± 0,7	14,8 ± 1,3	34,7 ± 4,1
CD62 ⁺ CD44 ⁺	10,8 ± 0,7	20,0 ± 1,8	33,5 ± 0,6	4,2 ± 0,5	12,9 ± 1,3	30,6 ± 3,5

Abb. 41: FACS-Analysen zur Bestimmung der relativen Anteile von CD62- und CD44-exprimierenden CD4⁺- und CD8⁺-Lymphknoten-T-Zellen in Wildtyp- und in beiden Slfn1-transgenen Maus-Linien (Linie1 und 10)

A. Lymphknoten-T-Zellen (LN) wurden mit einem PE-konjugierten anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörper in Kombination mit einem Cy5-konjugierten anti-CD44- und einem FITC-konjugierten anti-CD62-Antikörper gefärbt und der Aktivierungsstatus der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Dot-Blots zeigen die relativen Anteile von CD62- und CD44-exprimierenden CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen. Dazu wurden die lebenden CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen ausgewählt und dann die Expression von CD44 und CD62 dargestellt.

B. Tabellarische Darstellung der relativen Anteile von Gedächtnis-CD4⁺- oder -CD8⁺-T-Zellen (CD44⁺CD62⁺) in den Milzen und den Lymphknoten von Slfn1-transgenen Mäusen.

CD8⁺CD44⁺CD62⁻- und CD4⁺CD44⁺CD62⁺-T-Zellen drastisch zunehmen. Am deutlichsten ist dieser Befund in der Slfn1-transgenen Linie 1 zu beobachten. Mehr als 33 % der CD8⁺-T-Zellen und ca. 15 % der CD4⁺-T-Zellen in der Milz sind CD44⁺CD62⁺. Eine direkte Korrelation kann zwischen dem transgenen Slfn1-Expressionsniveau und der Zunahme der relativen Anteile von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen beobachtet werden, die den Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp haben. Der relative Anteil von Memory-T-Zellen (CD44⁺CD62⁺) ist in der transgenen Linie 1 deutlich höher als in der Linie 10. Interessant ist der Befund, dass die CD8⁺-T-Zellen im Vergleich zu den CD4⁺-T-Zellen in beiden Organen den Gedächtnis-ähnlichen Phänotyp stärker ausbilden.

Die Ergebnisse der FACS-Analysen unterstützen die Hypothese, dass der erhöhte relative Anteil von aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mäuse ein möglicher Grund für die hyperproliferative Aktivität und für die effizientere Sezernierung von IL-2 und IFN γ nach CD3-Stimulierung sein könnte.

5.4.7 Infektionsbiologische Untersuchungen von Slfn1-transgenen Mäusen

Das murine Modell der Listeriose hat sich als geeignetes System erwiesen, um eine primär T-Zell-spezifische Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien zu studieren (Kaufmann et al., 1993). *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ist ein fakultativ, intrazelluläres Bakterium und kann in Phagozyten, z. B. Makrophagen (North et al., 1998; Kaufmann et al., 1999; Miyamoto et al., 2003), aber auch in parenchymalen Hepathozyten replizieren (North et al., 1998; Kaufmann et al., 1999; Gregory et al., 1992). Nach systematischer Infektion migriert die Mehrzahl der Listerien Bakterien primär in die Leber und in die Milz, infiziert und repliziert in Hepathozyten und Makrophagen (North et al., 1998; Kaufmann et al., 1999; Mackaness et al., 1962). An der sterilen Eliminierung sind sowohl T-Zellen als auch Granulozyten beteiligt (North et al., 1998; Kaufmann et al., 1999; Conlan et al., 1992; Conlan et al., 1994). In Folge einer Listerien-Infektion wird eine CD8⁺- und eine CD4⁺-T-Zellantwort initiiert, und erst diese T-Zellantwort führt zur sterilen Klärung der Bakterien (Ladel et al., 1994).

Um der Frage nachzugehen, ob das transgene Slfn1-Protein in den peripheren T-Zellen zu einer modulierten Immunantwort nach Infektion mit intrazellulären Bakterien führt, wurden Infektionsstudien mit *L. monocytogenes* in Slfn1-transgenen Mäusen durchgeführt. Die verminderte Zellularität in den peripheren lymphoiden Organen und die nahezu vollständige Depletion der CD4⁺NK1.1⁺-NKT-Zellen in der Leber der Slfn1-transgenen Mäuse könnte negative Auswirkungen auf die Neutralisierung von Bakterien in der Leber und der Milz und

auf die CD4⁺- und CD8⁺-vermittelte Immunantwort nach bakterieller Listerien-Infektion haben. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Slfn1-transgenen Mäuse der Linie 10 und Wildtypkontrolltiere mit 5×10^3 *L. monocytogenes* infiziert und die bakterielle Zellzahl in der Milz und in der Leber 5 Tage nach Infektionsbeginn bestimmt.

In der Leber der transgenen Mäuse ist eine signifikant niedrigere bakterielle Belastung erkennbar. Die Gesamtzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) ist in der Leber der Slfn1-transgenen Mäuse im Vergleich zur Kontrolle um ca. 100fach geringer (Abb. 42). Dementsprechend hat die verminderte Anzahl der CD4⁺NK1.1⁺-NKT-Zellen in der Leber keinen negativen Einfluss auf die Eliminierung der Listerien-Bakterien. In der Milz sind zwischen den transgenen und den Wildtyp-Mäusen keine Unterschiede in der bakteriellen Belastung nach primärer Infektion zu erkennen (Abb. 42). Dieser Befund zeigt deutlich, dass die verminderte Zellularität des T-Zell- und B-Zell-Kompartiments in den Milzen der Slfn1-transgenen Mäuse nicht zu einer Beeinträchtigung in der Abwehr einer listeriellen Infektion führt.

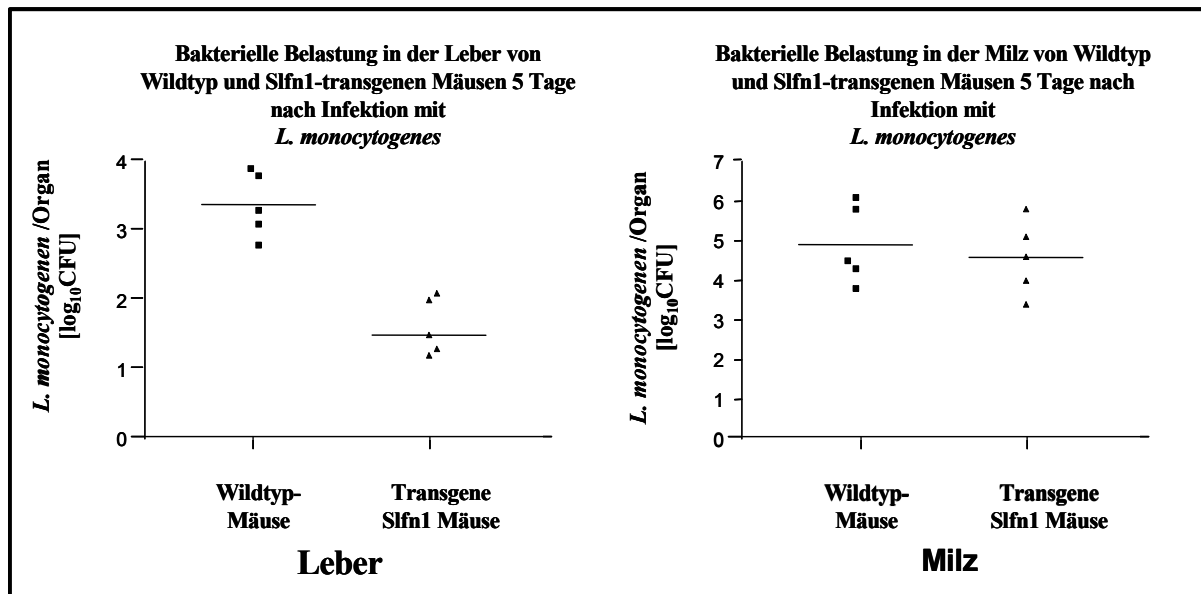


Abb. 42: Bakterielle Belastung in der Milz und in der Leber von Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen 5 Tage nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Wildtypkontrolltiere und Slfn1-transgene Mäuse (Linie10) wurden mit 5×10^3 *L. monocytogenes* Bakterien infiziert. 5 Tage nach Infektion wurden die Leber und Milz aus den jeweiligen Mäusen isoliert, homogenisiert, serielle Verdünnungen von den Suspensionen gefertigt und die Kolonie-bildenden Einheiten 24h nach Kultivierung auf TSA-Platten bestimmt. Für die Infektionsstudien wurden von jeder Mauslinie fünf Mäuse verwendet.

Um die Funktionalität der Slfn1-transgenen peripheren T-Zellen im Rahmen einer Immunreaktion gegen *L. monocytogenes* zu prüfen, wurde die Kinetik und die Frequenz der

CD4⁺- und CD8⁺-vermittelten T-Zellantwort in den Slfn1-transgenen Mäusen untersucht. Dazu wurden Slfn1-transgene Mäuse der Linie 10 und Wildtypkontrolltiere (C57BL/6) intravenös mit rekombinanten Listerien-Bakterien (OVA-exprimierende Listerien Bakterien) infiziert. Für *L. monocytogenes* ist bisher kein H-2^k-Epitop bekannt. Aus diesem Grund wurden OVA-exprimierende Listerien Bakterien verwendet. Das rekombinante OVA-Protein erlaubt die Bestimmung der Zunahme von OVA-spezifischen CD8⁺-T-Zellen im Verlauf der Listerien-Infektion. An verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (0d, 3d, 5d, 9d und 15d) wurden die Milzen aus den jeweiligen Mäusen entfernt und mit Listerien-spezifischen Peptiden (LLO₁₉₀₋₂₀₁ oder f-Met-Mix) oder mit OVA-spezifischen Peptiden (OVA₂₅₇₋₂₆₄) ex vivo restimuliert. Die Anzahl von Antigen-spezifischen CD4⁺- bzw. CD8⁺-Effektor-T-Zellen, die aufgrund der Restimulation INF γ produzieren, wurden durch intrazelluläre INF γ -Färbung bzw. die Gesamtzahl von OVA-spezifischen CD8⁺-T-Zellen wurde mittels MHC Klasse I-OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetrameren durch FACS-Analysen bestimmt.

Die Kinetik der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort ist in den Slfn1-transgenen und in den Wildtyp-Mäusen während der Listerien-Infektion nicht signifikant verschieden. Das Maximum der T-Zell-vermittelten Immunantwort wird 9 Tage nach Infektionsbeginn in beiden Mauslinien erreicht. Die Anzahl von INF γ -produzierenden CD4⁺- und CD8⁺-Effektor-T-Zellen und die Anzahl von OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetramer⁺-CD8⁺-T-Zellen ist zu diesem Zeitpunkt der Infektion am höchsten. Die Frequenz Listerien-spezifischer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen ist 5 Tage nach Infektion in den Slfn1-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren um bis zu 50 % höher. Die Gesamtzahl der CD4⁺- und CD8⁺-Effektor-T-Zellen sinkt 15d nach Infektion, zu einem Zeitpunkt, wo die Listerien-Bakterien schon vollständig eliminiert sind, in den transgenen Tieren signifikant stärker ab, als in den Wildtypkontrollen (Abb. 43). Scheinbar sind die Slfn1-transgenen Mäuse in der Lage auf Listerien effizienter zu reagieren als die Wildtyp-T-Zellen, indem sie T-Zellen mit spezifischer Effektorfunktion schneller bereitstellen. Ein möglicher Grund für die erhöhte Initiation der T-Zell-vermittelten Immunantwort in den Slfn1-transgenen Mäusen 5 Tag nach Infektion könnte der erhöhte Anteil von Gedächtnis-ähnlichen T-Zellen sein, die in einem prä-aktivierten Zustand vorliegen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Funktionalität der peripheren T-Zellen innerhalb einer Listerien-Infektion durch das Slfn1-Transgen nicht negativ beeinträchtigt wird. Die transgenen peripheren T-Zellen werden potent aktiviert, proliferieren uneingeschränkt und auch die Etablierung der Effektorfunktionen wird durch die ektopische Slfn1-Expression nicht

begrenzt. Die verminderte Zellularität in der Milz hat dabei keinen negativen Einfluss auf die Effizienz der Listerien-spezifischen Immunantwort.

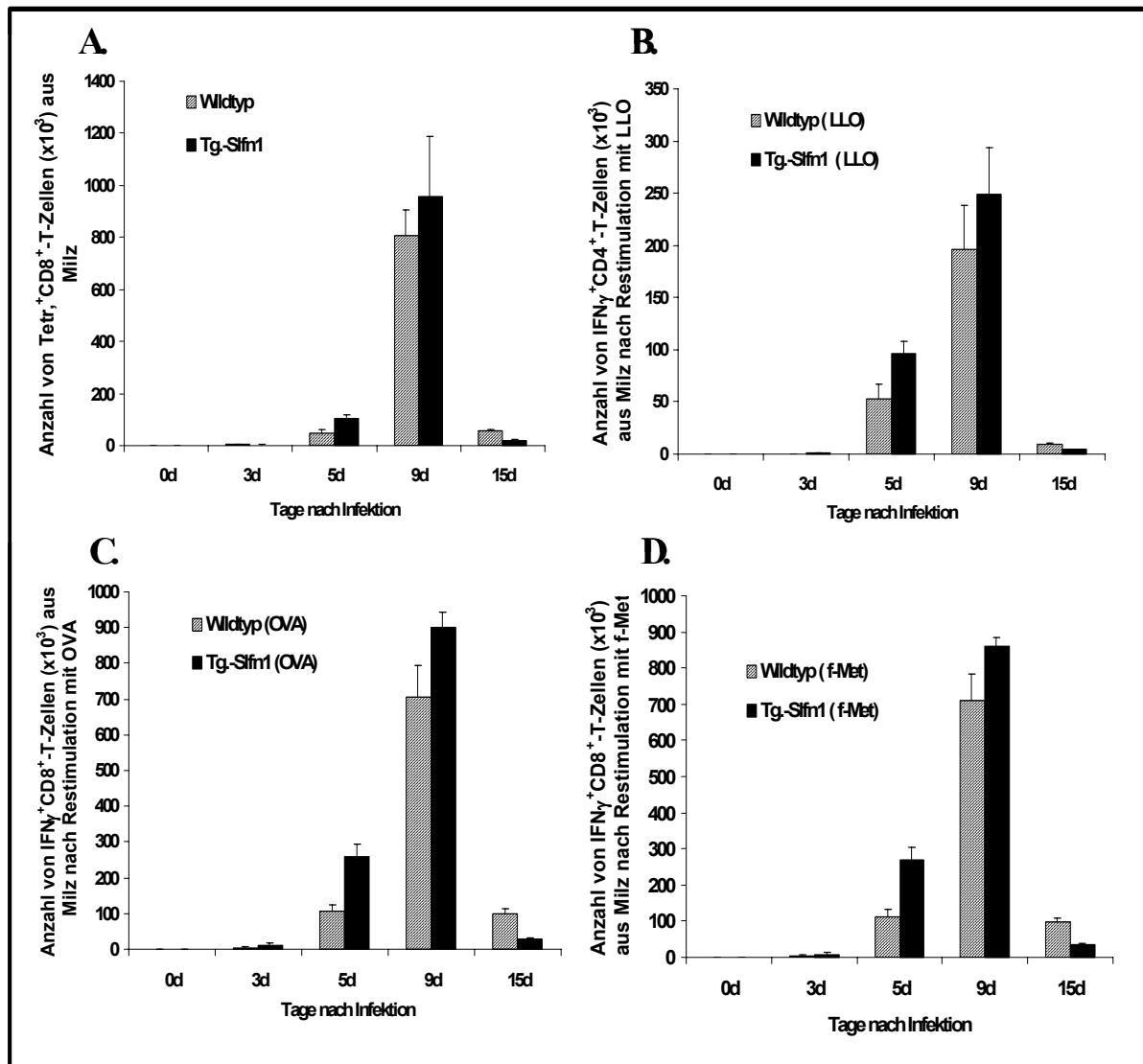


Abb. 43: Kinetik und Frequenz von Listerien-spezifischen T-Zellen in der Milz nach Infektion mit *L.monocytogenes*

A.) Milz-Zellen von infizierten Wildtyp- und Slfn1-transgenen Mäusen wurden mit PE-konjugierten MHC Klasse I-OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetrameren gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Diagramm stellt die Anzahl von lebenden CD62^{low}OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD8-T-Zellen im zeitlichen Verlauf von 15 Tagen dar.

B.) Milz-Zellen wurden ex vivo mit dem LLO₁₉₀₋₂₀₁ Listeriolysin-Peptid für 5h stimuliert. Die Gesamtzahl von lebenden IFN γ -produzierenden LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifischen CD4⁺-T-Zellen wurde mittels Cy5-konjugierten anti-CD4- und FITC-konjugierten anti-IFN γ -Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert.

C. und D.) Milz-Zellen wurden ex vivo entweder mit einem Gemisch aus drei Formyl-Methionin-Listerien-Peptiden (f-Met) oder mit einem Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄-Peptid ebenfalls für 5h stimuliert. Die Gesamtzahl von lebenden IFN γ -produzierenden OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischen oder f-Met-spezifischen CD8⁺-T-Zellen wurde mittels Cy5-konjugierten anti-CD8- und FITC-konjugierten anti-IFN γ -Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Daten repräsentiert die Standardabweichung von drei Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt.

5.5 Analyse von Slfn4-transgenen Mäusen

Slfn4, ein Repräsentant der zweiten Untergruppe der Slfn-Protein-Familie, ist im Vergleich zu Slfn1 in den frühen Phasen der T-Zellentwicklung und nach CD3/CD28 vermittelter Aktivierung erhöht exprimiert, während die Slfn4-Expression in ruhenden reifen CD4⁺- und CD8⁺-Thymozyten erniedrigt ist. Die generell postulierte anti-proliferative Aktivität der Slfn-Proteine konnte in den bisherigen Studien für Slfn4 nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise besitzt Slfn4, ähnlich wie Slfn1, eine Wachstums- und Entwicklungs-modulierende Funktion und induziert nach transgener Expression einen Block in der Entwicklung von verschiedenen Lymphozytenpopulationen. Um der Frage nachzugehen, welche Konsequenzen eine ektopische Slfn4-Expression für die Ontogenie von lymphoiden Zellsubpopulationen hat, wurden in analoger Weise zu Slfn1, Slfn4-transgene Mäuse generiert. Durch PCR-Analysen konnten zwei Slfn4-transgene Mauslinien (Linie2 und Linie11) identifiziert werden. Die transgene Slfn4-Expression wurde in den primären und sekundären lymphoiden Organen durch RT-PCR-Analysen mit transgen-spezifischen Oligonukleotid-Primern ermittelt.

Um der Frage nachzugehen, ob die transgene Slfn4-Expression einen Einfluss auf die intrathymische T-Zellentwicklung hat und dies zu Veränderungen der Zellularität in den primären und sekundären lymphoiden Organen führt, wurden zunächst die absoluten Zellzahlen der Thymozyten, der Milz und der Lymphknoten bestimmt. Die relativen Anteile der individuellen Lymphozytenpopulationen in diesen Organen wurden durch FACS-Analysen ermittelt.

Der Phänotyp der Slfn4-transgenen Mäuse ist gegenüber den Wildtypkontrollen unauffällig. Die absoluten Zellzahlen sind nicht signifikant verschieden. Im Thymus der transgenen Linie 11 ist lediglich eine geringfügige Abnahme der absoluten Zellzahl zu beobachten, wobei die Zellularität in den Lymphknoten und in den Milzen etwa auf dem Niveau der Wildtypkontrollen ist (Abb.44). Dieser Befund gibt einen ersten Hinweis, dass die transgene Slfn4-Expression die T-Zellentwicklung nicht negativ beeinflusst. Dies wird des Weiteren durch die Beobachtung gestützt, dass die transgenen Slfn4-exprimierenden Thymozyten nicht wie in den Slfn1-transgenen Mäusen im DN3-Stadium akkumulieren, die relativen Anteile der verschiedenen Thymozytensubpopulationen im Thymus und die relativen Anteile von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen gegenüber den Wildtypkontrolltieren unverändert sind (Abb.45). Auch die B-Zellentwicklung wird durch die transgene Slfn4-Expression nicht beeinflusst. Dies wird ebenfalls durch die gleichbleibenden

relativen Anteile der B-Zellen in den Milzen und den Lymphknoten der Slfn4-transgenen Mäuse deutlich (Abb. 45).

	absolute Zellzahlen		
	Wildtyp ($\times 10^6$) n = 6	CD2-Slfn 4 L2 ($\times 10^6$) n = 5	CD2-Slfn 4 L11 ($\times 10^6$) n = 5
Thymus	166 ± 27	162 ± 9	148 ± 23
Milz	80 ± 19	73 ± 20	88 ± 10
Lymphknoten	21 ± 7	23 ± 5	20 ± 5

Abb. 44: Die absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten von Wildtyp- und CD2-Slfn4-transgenen Mäusen der Linie 2 und 11

Die absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten wurde von 6 (n=6) Wildtyp- und jeweils 5 (n=5) CD2-Slfn4-transgenen Mäusen bestimmt. Unter Verwendung von Trypan-Blau wurde zwischen toten und lebenden Lymphozyten unterschieden.

Die relativen Anteile von NK-Zellen in der Milz, von NKT-Zellen in der Leber und von $\alpha\beta$ -TZR- und $\gamma\delta$ -TZR-exprimierenden IELs im Dünndarm sind in den Slfn4-transgenen Mäusen ebenfalls nicht verändert. Demzufolge hat die transgene Slfn4-Expression keine Konsequenzen für die Entwicklung von T-, B- und NK-Zellen.

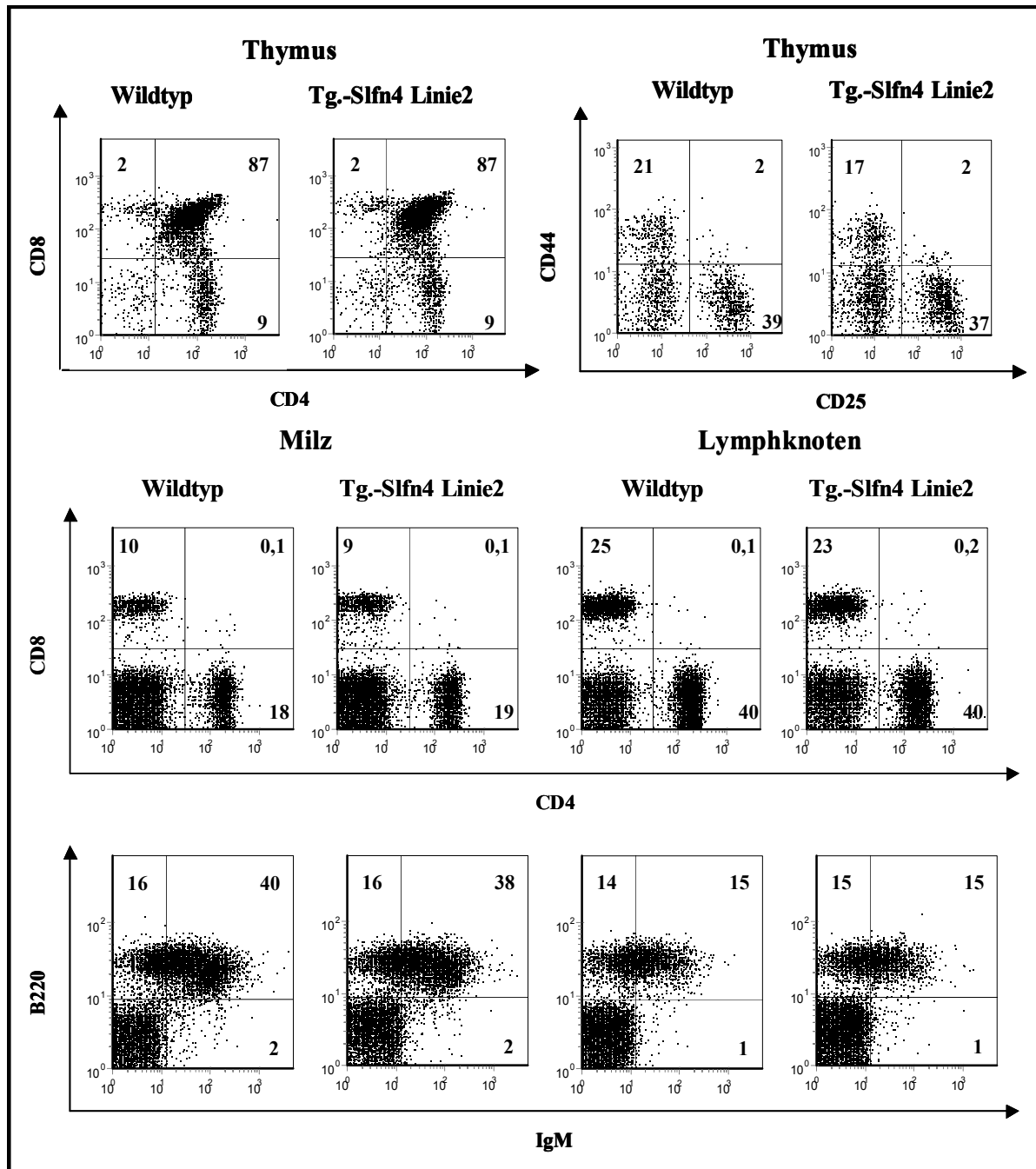


Abb. 45: FACS-Analysen zur Bestimmung der relativen Anteile von verschiedenen Lymphozyten-Populationen in den primären bzw. sekundären lymphoiden Organen von Wildtyp- und Slfn4-transgenen Mäusen (Tg. Slfn4) der Linie 2

Unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-CD4-, von Cy5-konjugierten anti-CD8-, von Cy5-konjugierten anti-B220-, von PE-konjugierten anti-IgM-, von Cy5-konjugierten anti-CD25 und von FITC-konjugierten anti-CD44-Antikörpern wurden die relativen Anteile von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in den Thymi und in den peripheren lymphoiden Organen und die relativen Anteile von B-Zellen in der Milz und den Lymphknoten von Wildtyp- und Slfn4-transgenen Mäusen (Linie2) bestimmt. Die dargestellten Dot-Blots zeigen die relativen Anteile der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen in den jeweiligen lymphoiden Organen. Exemplarisch wurden hier die FACS-Analysen der Linie 2 präsentiert. Der Phänotyp der Slfn4-transgenen Mäuse der Linie 11 zeigt keine Unterschiede zum Phänotyp der Wildtypkontrollen oder der transgenen Linie2.

5.5.1 Proliferationsanalysen von Slfn4-exprimierenden peripheren Lymphknoten-T-Zellen

In den peripheren lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mäuse konnte ein erhöhter Anteil von T-Zellen, die phänotypisch aktivierten oder Gedächtnis-T-Zellen ähnlich sind, beobachtet werden und die nach mitogener Stimulation zu einem hyperproliferativen Wachstum führten. Die peripheren T-Zellen der Slfn4-transgenen Mäuse liegen weder in einem aktivierten Zustand vor, noch ist eine Erhöhung der relativen Anteile von $CD4^+CD44^+CD62L^-$ und $CD8^+CD44^+CD62L^-$ -T-Zellsubpopulationen zu erkennen (Ergebnisse wurden hier nicht gezeigt.). Um festzustellen, ob die transgene Slfn4-Expression in den peripheren T-Zellen dennoch zu Veränderungen im proliferativen Verhalten führt, wurden Wachstumsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp- und von beiden Slfn4-transgenen Mauslinien (Linie2 und Linie11) präpariert und gleiche Zellzahlen, wie beschrieben, stimuliert. Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau von radioaktiven 3H -Thymidin bestimmt.

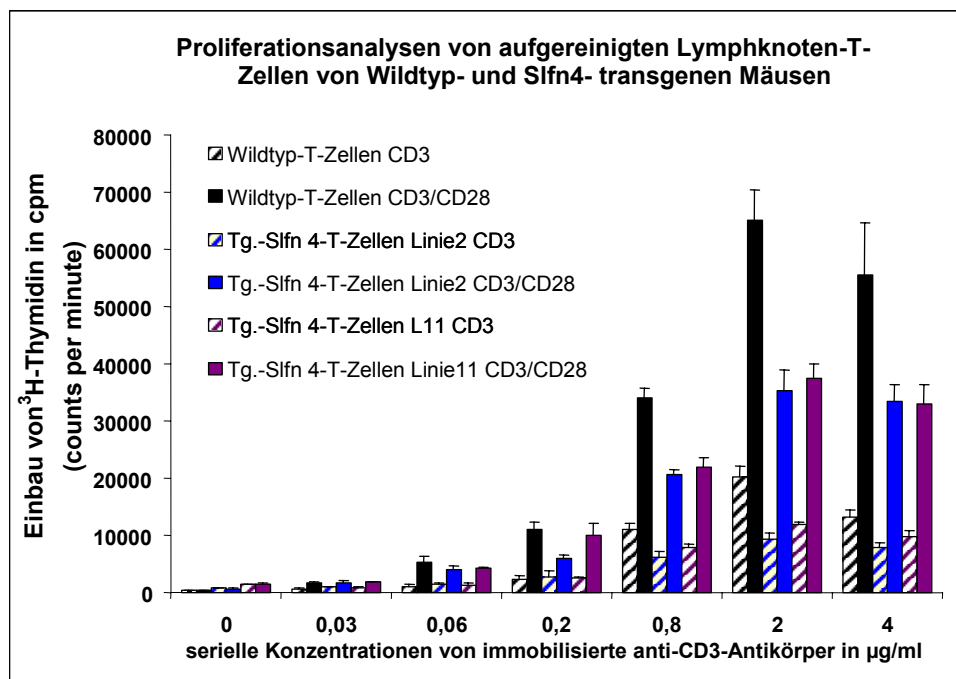


Abb. 46: Proliferationsanalysen von Wildtyp- und Slfn4-transgenen T-Lymphozyten

Angereicherte Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp und Slfn4-transgenen Mäusen (Linie2 und Linie 11) wurden mit seriellen anti-CD3-Antikörpermengen (in µg/ml) stimuliert oder mit 10µg/ml löslichen anti-CD28-Antikörper kostimuliert. 72h nach Aktivierung wurden 1µCi 3H -Thymidin/Ansatz dazugegeben und der radioaktive Einbau nach weiteren 8h gemessen. Es wurden von jeden Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die funktionelle Kapazität der Slfn4-transgenen peripheren T-Zellen wird durch das Transgen negativ beeinflusst. Das proliferative Wachstum der Slfn4-transgenen peripheren T-Zellen ist im Vergleich zu Wildtyp-T-Zellen signifikant geringer. Der Einbau von ^3H -Thymidin ist in beiden transgenen Linien unter nicht-kostimulatorischen und kostimulatorischen Bedingungen um ca. 45 % vermindert (siehe 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3/CD28) (Abb. 46). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das transgene Slfn4-Protein eine anti-proliferative Aktivität in peripheren T-Zellen besitzt.

5.6 Analyse von Slfn8-transgenen Mäusen

Slfn8 ist ein Repräsentant der dritten Untergruppe der Slfn-Protein-Familie und wird innerhalb der T-Zellentwicklung verstärkt im CD4 $^-$ CD8 $^-$ -DN-T-Zellstadium und in reifen CD4 $^+$ -und CD8 $^+$ -T-Zellen exprimiert. Nach CD3/CD28 vermittelter T-Zellaktivierung wird die Slfn8-Expression in ähnlicher Weise wie Slfn1 stark negativ reguliert (Abb.25). Die Befunde der *in vitro* Analysen zeigen, dass eine retrovirale Slfn8-Expression in NIH3T3 Fibroblasten keine antiproliferative Aktivität besitzt. Um der Frage nachzugehen, welche Konsequenzen eine ektopische Slfn8-Expression für die Ontogenie von lymphoiden Zellsubpopulationen hat, wurden in analoger Weise zu Slfn1 und Slfn4, Slfn8-transgene Mäuse generiert. Durch PCR-Analysen konnten zwei Slfn8-transgene Mauslinien (Linie 3 und Linie 13) identifiziert werden. Die Linie 3 war infertil und konnte für die Analysen nicht herangezogen werden. Am Beispiel der Linie 13 wurde die transgene Slfn8-Expression in den primären und sekundären lymphoiden Organen durch RT-PCR-Analysen mit transgenspezifischen Oligonukleotid-Primern bestimmt.

Um festzustellen, ob die transgene Slfn8-Expression einen Einfluss auf die intrathymische T-Zellentwicklung hat und dies zu Veränderungen der Zellularität in den primären und sekundären lymphoiden Organen führt, wurden zunächst die absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten und dann die relativen Anteile der individuellen Lymphozytenpopulationen in diesen Organen durch FACS-Analysen bestimmt.

Ähnlich wie Slfn1, wird die T-Zellentwicklung durch das transgene Slfn8-Protein negativ beeinflusst.

	absolute Zellzahlen	
	Wildtyp ($\times 10^6$) n = 5	CD2-Slfn 8 L13 ($\times 10^6$) n = 5
Thymus	172 \pm 16	85 \pm 22
Milz	69 \pm 6	67 \pm 14
Lymphknoten	20 \pm 2	20 \pm 2

Abb. 47: Die absoluten Zellzahlen der Thymi, Milzen und Lymphknoten von Wildtyp- und CD2-Slfn8-transgenen Mäusen der Linie 13

Die absoluten Zellzahlen der Thymi, der Milzen und der Lymphknoten wurde von 5 (n=5) Wildtyp- und von 5 (n=5) CD2-Slfn8-transgenen Mäusen bestimmt. Unter Verwendung von Trypan-Blau wurde zwischen toten und lebenden Lymphozyten unterschieden.

Die Gesamtzahl der Thymozyten in den Slfn8-transgenen Mäusen ist ca. um 50 % vermindert. Erstaunlicher Weise bleiben die absoluten Zellzahlen der Milzen und der Lymphknoten in den Slfn8-transgenen Mäuse auf dem Niveau der Wildtyporgane (Abb.47). Die T-Zellentwicklung wird durch das Slfn8-Transgen im CD25⁺CD44⁻-Thymozytenstadium blockiert. Die FACS-Analysen belegen, dass die Slfn8-transgenen Thymozyten verstärkt in CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44⁻-Stadium akkumulieren und der relative Anteil von Pro-T-Zellen im DN4-Stadium abnimmt. 61% der DN-Thymozyten befinden sich im CD25⁺CD44⁻-Pro-T-Zellstadium. Dahingegen beträgt der relative Anteil von CD25⁺CD44⁻-Thymozyten in den Wildtyp-Mäusen nur 32 %. Die relativen Anteile von CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und von B-Zellen ist in den sekundären lymphoiden Organen der Slfn8-transgenen Mäusen unverändert (Abb.48). Aber auch die relativen Anteile von NK-Zellen in der Milz und von $\alpha\beta$ -TZR- und $\gamma\delta$ -TZR-exprimierenden IELs im Dünndarm werden durch das Slfn8-Transgen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

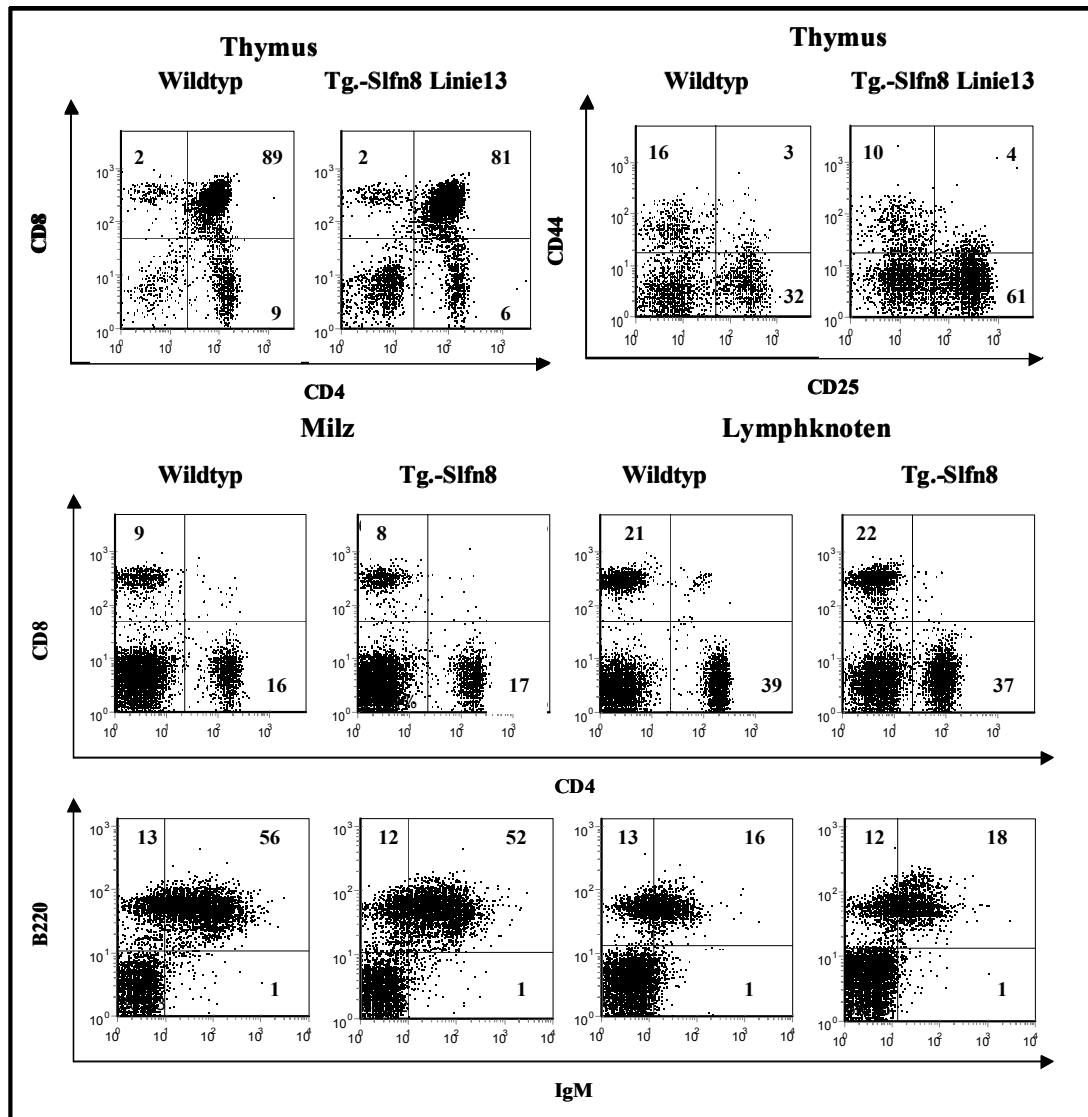


Abb. 48: FACS-Analysen zur Bestimmung der relativen Anteile von verschiedenen Lymphozytenpopulationen in den primären bzw. sekundären lymphoiden Organen von Wildtyp- und Slfn8-transgenen Mäusen der Linie 13

Unter Verwendung von FITC-konjugierten anti-CD4-, von Cy5-konjugierten anti-CD8-, von Cy5-konjugierten anti-B220-, von PE-konjugierten anti-IgM-, von Cy5-konjugierten anti-CD25 und von FITC-konjugierten anti-CD44-Antikörpern wurde die relative Anteile von CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen im Thymus und in den peripheren lymphoiden Organen und die relative Anteile von B-Zellen in der Milz und den Lymphknoten von Wildtyp- und Slfn8-transgenen Mäusen (Linie13) bestimmt. Die dargestellten Dot-Blots zeigen die relative Anteile der verschiedenen Lymphozytenpopulationen in den jeweiligen lymphoiden Organen. Exemplarisch wurden hier die FACS-Analysen der Slfn8-transgenen Mäuse der Linie 13 präsentiert.

Die transgene Slfn8-Expression hat offensichtlich keinen negativen Einfluss auf die Ontogenie der B-, NK-Zellen und der $\alpha\beta$ -TZR- und $\gamma\delta$ -TZR-exprimierenden IELs. Das T-Zellkompartiment wird lediglich im Thymus durch das Transgen beeinflusst. Die T-Zellentwicklungs-inhibierende Funktion des Slfn8-Transgens hat keine Konsequenzen auf die

Zellularität und die relativen Anteile von reifen T-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen.

5.6.1 Proliferationsanalysen von Slfn8-exprimierenden Lymphknoten-T-Zellen

In den peripheren lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mäuse, jedoch nicht in Slfn4 transgenen Mäusen, konnte ein erhöhter Anteil von aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen beobachtet werden, die nach mitogener Stimulation zu einem hyperproliferativem Wachstum führten. Die transgene Slfn4-Expression in den peripheren T-Zellen wirkt jedoch antiproliferativ auf deren Wachstum. Die peripheren T-Zellen der Slfn8-transgenen Mäuse liegen weder in einem aktivierten Zustand vor, noch ist eine Erhöhung der relativen Anteile von $CD4^+CD44^+CD62L^-$ oder $CD8^+CD44^+CD62L^+$ -T-Zellsubpopulationen zu erkennen (Ergebnisse werden hier nicht gezeigt.). Um festzustellen, ob die transgene Slfn8-Expression in den peripheren T-Zellen zu einer Veränderung im proliferativen Verhalten führt, wurden Wachstumsanalysen mit diesen Zellen durchgeführt. Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau von radioaktiven 3H -Thymidin bestimmt.

Das Wachstum der peripheren T-Zellen wird durch das Slfn8-Transgen um bis zu 20-30 % vermindert. Auch die Kostimulation durch CD28 kann die verminderte Proliferation der Slfn8-transgenen T-Zellen nicht kompensieren (Abb.49). Die Stimulation der Slfn8-transgenen T-Zellen mit PMA/Ionomycin bestätigt die antiproliferative Aktivität des Slfn8-Transgens. Die Proliferationsrate der Slfn8-exprimierenden Lymphknoten-T-Zellen ist im Vergleich zu den T-Zellen der Wildtypkontrolltieren um ca. 35 % niedriger.

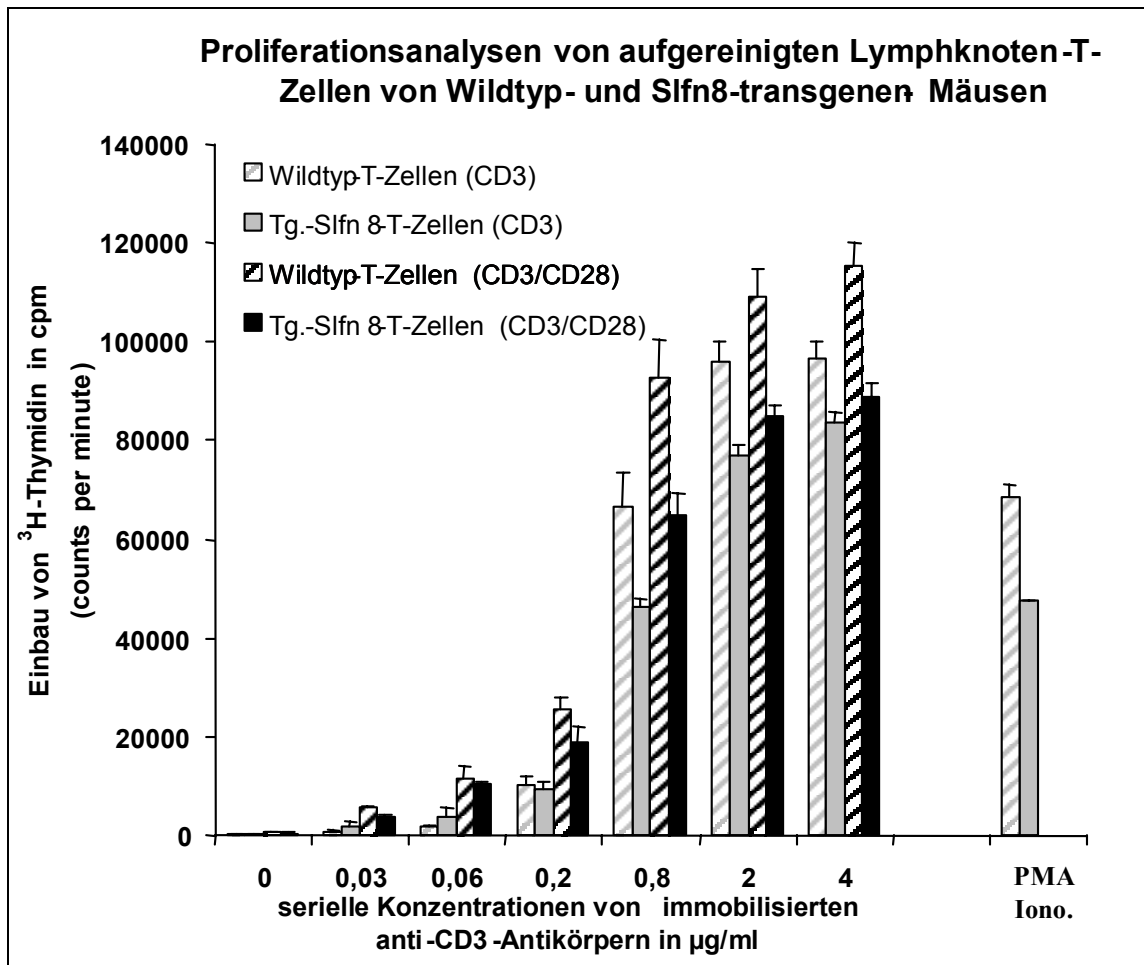


Abb. 49: Proliferationsanalysen von Wildtyp- und Slfn8-transgenen (Tg. Slfn8) Lymphknoten-T-Zellen

Angereicherte Lymphknoten-T-Zellen von Wildtyp und Slfn8-transgenen Mäusen (Linie 13) wurden mit seriellen anti-CD3-Antikörpermengen (in µg/ml) oder mit 10µg/ml löslichen anti-CD28-Antikörper kostimuliert oder mit PMA/Ionomycin stimuliert. 72h nach Aktivierung wurden 1µCi ³H-Thymidin/Ansatz dazugegeben und der radioaktive Einbau nach weiteren 8h gemessen. Es wurde von jedem Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Analysen mit Slfn8-transgenen Mäusen, dass die T-Zellentwicklung, jedoch nicht die Ontogenie der B- und NK-Zellen, durch das Slfn8-Transgen negativ beeinflusst wird. Die signifikante Akkumulation von CD25⁺CD44⁻ Thymozyten deutet darauf hin, dass die ektopische Slfn8-Expression die T-Zellentwicklung im Pro-T-Zellstadium inhibiert und dies der Grund für die verminderte Zellularität des Thymus ist. Hinsichtlich der absoluten Zellzahlen der T-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen sind keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrolltieren und Slfn8-transgenen Mäusen zu beobachten. Dennoch hat das Slfn8-Transgen eine antiproliferative Wirkung auf das Wachstum von aktivierten T-Zellen.