

Aus dem  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin - Schlossmannhaus  
Klinik für Kinderonkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie  
des Universitätsklinikums Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Borkhardt

**Lymphozytenhomöostase im IL-7 defizienten Mausmodell und Vergleich  
der Lymphozytensubpopulationen in Abhängigkeit vom Alter**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Astrid Ganzow

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf (Dekan)

Referent: Prof. Dr. med. Tim Niehues

Korreferent: Prof. Dr. med. Bernhard Homey

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Immunologische Grundlagen . . . . .	5
1.2	IL-7 . . . . .	5
1.2.1	Gen und Struktur . . . . .	6
1.2.2	IL-7 produzierende Zellen . . . . .	6
1.2.3	Der IL-7 Rezeptor . . . . .	6
1.2.4	Phänotyp von IL-7 <sup>-/-</sup> . . . . .	7
1.2.5	Funktion von IL-7 . . . . .	7
1.2.6	Effekte auf das Immunsystem . . . . .	7
1.2.7	IL-7 bei Erkrankungen . . . . .	8
1.2.8	Einfluss auf B-Zellen . . . . .	8
1.2.9	Einfluss auf T-Zellen . . . . .	9
1.2.10	Weiterer Einfluss von IL-7 . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Versuchstiere, Material und Methoden</b>	<b>12</b>
3.1	Versuchstiere . . . . .	12
3.2	Materialien . . . . .	12
3.2.1	Monoklonale, fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie . . . . .	12
3.2.2	Antikörper für die Immunhistochemie . . . . .	13
3.2.3	Sonstiges . . . . .	15
3.3	Methoden . . . . .	16
3.3.1	Versuchstierhaltung . . . . .	16
3.3.2	Organentnahme . . . . .	16
3.3.3	Herstellung der Einzelzellsuspensionen . . . . .	16
3.3.4	Durchflusszytometrie . . . . .	17
3.3.5	Immunhistochemie . . . . .	19
3.4	Statistik . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
4.1	Gewicht der Mäuse sowie ihre relativen und absoluten Lymphozytenzahlen	23
4.2	Verteilung der Lymphozytensubpopulationen in den einzelnen Organen	25
4.2.1	Lymphozyten im Knochenmark drei Monate alter Mäuse . . .	25
4.2.2	Lymphozyten im Knochenmark einjähriger Mäuse . . . . .	27
4.2.3	Lymphozyten in der Leber drei Monate alter Mäuse . . . . .	29
4.2.4	Lymphozyten in der Leber einjähriger Mäuse . . . . .	31
4.2.5	Lymphozyten in der Milz drei Monate alter Mäuse . . . . .	34

4.2.6	Lymphozyten in der Milz einjähriger Mäuse . . . . .	35
4.2.7	Lymphozyten in der Lunge drei Monate alter Mäuse . . . . .	38
4.2.8	Lymphozyten in der Lunge einjähriger Mäuse . . . . .	38
4.2.9	Lymphozyten im Darm drei Monate alter Mäuse . . . . .	38
4.2.10	Lymphozyten im Darm einjähriger Mäuse . . . . .	40
4.2.11	Übersicht: Signifikante Unterschiede der Lymphozytensubpopu- lationen bei 3m und 12m alten IL-7 <sup>-/-</sup> Mäusen . . . . .	42
4.3	Immunhistochemie . . . . .	44
4.3.1	Einzelfärbungen . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Der IL-7 <sup>-/-</sup> -Phänotyp . . . . .	57
5.2	Verteilung der Lymphozyten auf die Organe . . . . .	57
5.3	T-Lymphozyten . . . . .	58
5.3.1	T-Lymphozyten im Thymus . . . . .	58
5.3.2	TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten in den Organen . . . . .	59
5.3.3	CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in den Organen . . . . .	59
5.3.4	TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	59
5.3.5	DN-T-Lymphozyten im Blut . . . . .	60
5.3.6	DN-T-Lymphozyten in den Organen . . . . .	60
5.4	NK- und NK-like T-Zellen . . . . .	61
5.5	B-Lymphozyten . . . . .	61
5.6	Einfluss des Alterungseffektes auf Lymphozytensubpopulationen bei IL-7 <sup>+/+</sup> und IL-7 <sup>-/-</sup> Mäusen . . . . .	62
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>67</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunologische Grundlagen

Der Ausgangspunkt für die Bildung der Zellen des Immunsystems sind die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Aus diesen entstehen zum einen gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen, die sich zu B- und T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK) weiterentwickeln (Abbildung 1.1). Zum anderen entstehen gemeinsame myeloische Vorläuferzellen, aus denen sich Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen sowie Thrombozyten und Erythrozyten entwickeln.

Die B- und T-Lymphozyten unterscheiden sich zum einen durch ihre Oberflächenrezeptoren, zum anderen durch den Ort, an dem sie heranreifen. Die Bildung der Lymphozyten findet in den primären oder auch zentralen lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus) statt, ihre Aktivierung in den peripheren lymphatischen Organen, auch sekundäre lymphatische Organe genannt (Lymphknoten, Milz, mukosaassoziierte lymphatische Gewebe, bronchienassoziierte lymphatische Gewebe). Die reifen Lymphozyten zirkulieren zwischen peripherem Blut und lymphatischen Organen. T-Lymphozyten reifen im Thymus heran. Nach Antigenkontakt differenzieren sich die T-Zellen zu T-Effektorzellen. Der T-Zell-Antigenrezeptor erkennt spezifisch körperfremde Antigene. B-Lymphozyten reifen bereits im Knochenmark heran, sie differenzieren sich nach Antigenkontakt zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren. Der B-Zell-Antigenrezeptor ist ein membrangebundener Antikörper, den die B-Zelle nach Aktivierung zur Plasmazelle sezerniert. B- und T-Zellen gehören zum erworbenen Immunsystem, die NK-Zellen dagegen gehören zum angeborenen Immunsystem, sie besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren.

## 1.2 IL-7

Interleukin-7 (IL-7) wurde erstmals 1988 isoliert [Namen et al., 1988a,b; Goodwin et al., 1989; Jiang et al., 2005]. Die Rolle, die IL-7 als Zytokin insbesondere bei der Lymphozyten-Homöostase einnimmt, wurde bisher nicht vollständig aufgeklärt. Grundsätzlich wirkt es sowohl auf B-Zellen als auch auf T-Zellen [Chantry et al., 1989; Morrissey et al., 1989]. Durch Experimente mit IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen wird angenommen, dass IL-7 ein nicht-redundantes Zytokin für die murine B- und T-Zell-Lymphopoese ist [Peschon et al., 1994; von Freeden-Jeffry et al., 1995]. Für die menschliche T-Zell-Entwicklung ist IL-7 ebenfalls unverzichtbar. Patienten mit einem schweren kombinierten Immundefekt (severe combined immunodeficiency, SCID), bei denen eine Mutation in der  $\alpha$ -Kette des IL-7-Rezeptors vorliegt, haben keine T-Lymphozyten, wohl aber B-Lymphozyten. Damit unterscheidet sich die Funktion von IL-7 bei der Lymphozytenentwicklung beim Menschen von der bei Mäusen, bei denen ein IL-7-

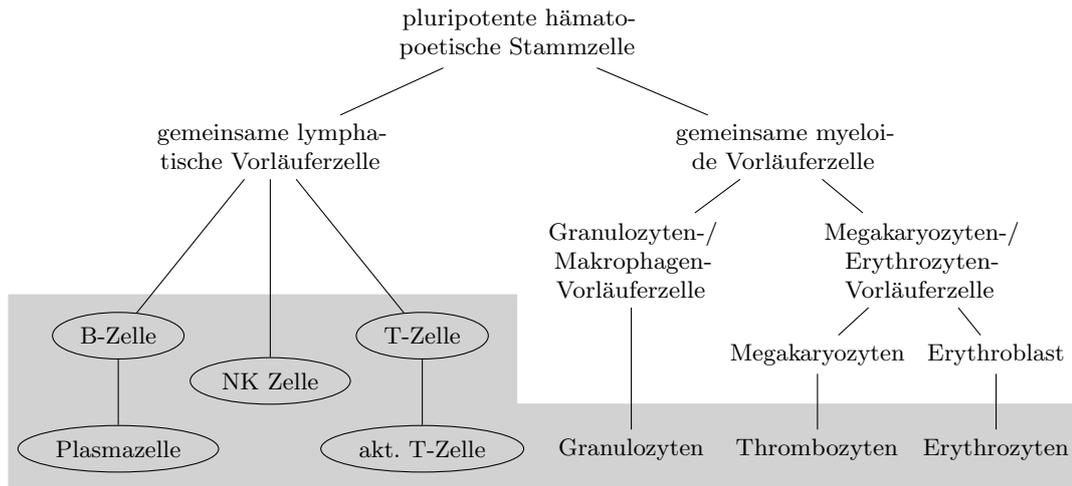


Abbildung 1.1: Die Leukozyten stammen wie die Erythrozyten und Thrombozyten von denselben Vorläuferzellen ab, den hämatopoetischen pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Die Bildung findet hauptsächlich im Knochenmark statt, ab einer bestimmten Ausreifungsstufe findet die Abgabe in das periphere Blut statt (grau hinterlegt).

Defekt auch eine Reduktion der B-Zellen bedingt [Puel et al., 1998; Jiang et al., 2005].

### 1.2.1 Gen und Struktur

Das humane IL-7 Gen, lokalisiert auf Chromosom 8q12-13 [Lupton et al., 1990], besteht aus sechs Exonen über 33kb (IL7-cDNA: 534 Nukleotide kodieren für ein Protein mit 177 Aminosäuren). Das murine IL-7-Gen, lokalisiert auf Chromosom 3, enthält nur fünf Exone, ihm fehlen die 19 Aminosäuren des fünften Exons des humanen Gens. Als Zytokin gehört es zur Familie der Hämatopoetine (25-kDa), der auch die Zytokine IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15, GM-CSF, M-CSF und SCF angehören. Menschliches IL-7 kann auch in der Maus wirken, murines IL-7 hingegen hat im Menschen keine Lymphozyten stimulierende Wirkung [Namen et al., 1988a].

### 1.2.2 IL-7 produzierende Zellen

IL-7 wird hauptsächlich von Zellen des Immunsystems, aber auch von nicht zum Immunsystem gehörenden Zellen gebildet. In immunhistochemischen Untersuchungen an lymphatischem Gewebe konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Stromazellen, insbesondere Makrophagen und dendritische Zellen, IL-7 produzieren. Die Produktion findet vor allem im Knochenmark und Thymus, aber auch im intestinalen Epithel und anderen Zelltypen (Keratinocyten, fetaler und adulter Leber und dendritischen Zellen) statt [Sakata et al., 1990; Madrigal-Estebas et al., 1997; Heufler et al., 1993; Gutierrez-Ramos et al., 1992; Golden-Mason et al., 2001; de Saint-Vis et al., 1998; Sorg et al., 1998]. Lymphozyten selbst können kein IL-7 produzieren [Benjamin et al., 1994; Fry and Mackall, 2005].

### 1.2.3 Der IL-7 Rezeptor

Der IL-7 Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, der *gemeinsamen gamma-Kette*,  $\gamma$ c-chain (IL-7R $\gamma$ ), die auch als Rezeptor für die Interleukine IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 und IL-21 fungiert [Ziegler et al., 1995; Kondo et al., 1994; Milne et al., 2004a; Leonard, 2005] und der *alpha-Kette*, IL-7R $\alpha$  (CD127), die neben IL-7 ein weiteres Zytokin, nämlich TSLP (Thymic Stromal Derived Lymphopoietin) bindet. Ist der Rezeptor defekt, sind B- und T-Zell-Differenzierung schwer beeinträchtigt. Eine Blockierung von IL-7 oder des IL-7 Rezeptors über Antikörper wirkt sich als signifikante Reduktion von Zellzahlen der lymphozytären Vorstufen und peripheren Lymphozyten in den murinen B- und T-Zell-Linien aus. Dieser Effekt wird besonders mit zunehmendem Alter deutlich [Carvalho et al., 2001].

Ein Defekt der IL-7R $\gamma$ -Kette bei Menschen führt zu einem X-gebundenen schweren kombinierten Immundefekt (XSCID) [Fry et al., 2001; Buckley et al., 1997; Kittipatarin and Khaled, 2007]. Bei den betroffenen Patienten fehlen T- und NK-Zellen, B-Zellen sind jedoch vorhanden (T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>-</sup>). Betrifft der Defekt die IL-7R $\alpha$ -Kette, so werden keine T-Zellen gebildet, aber NK-Zellen sind vorhanden (T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup>).

### 1.2.4 Phänotyp von IL-7<sup>-/-</sup>

Bedeutend für das aktuelle Wissen über IL-7 und die nähere Charakterisierung war die Inaktivierung des IL-7-Gens durch gentechnische Manipulation des murinen Genoms und Züchtung von IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen durch von Freeden et al. [von Freeden-Jeffry et al., 1995]. Sowohl im peripheren Blut, als auch in den lymphatischen Organen ist die Anzahl der Lymphozyten bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen reduziert. So ist beispielsweise die Gesamtlymphozytenzahl in der Milz auf ein Zehntel reduziert. Splenozyten sind nicht nur in ihrer Anzahl reduziert, es gibt auch eine Population unreifer B-Zellen, die man vom Wildtyp nicht kennt. Die Lymphozyten zeigen jedoch eine normale Antwort auf Mitogen-Stimulation.

Bei normaler CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Ratio (2:1 bis 3:1) ist die Anzahl der T-Zellen im Thymus auf ein Zwanzigstel im Vergleich zum Wildtyp vermindert [von Freeden-Jeffry et al., 1995]. Die Entwicklung von TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> und TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zell-Linien hängt in unterschiedlicher Weise vom IL-7 Rezeptor ab. Das Fehlen von IL-7 manifestiert sich als schwere Reduktion der  $\alpha\beta$ -T-Zellen und kompletter Verlust der TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen.

### 1.2.5 Funktion von IL-7

Ursprünglich wurde IL-7 als Wachstumsfaktor der murinen B-Zelllinie beschrieben. IL-7 fördert darüber hinaus einerseits die thymische und extrathymische Differenzierung von T-Zellen, andererseits stimuliert IL-7 die periphere Expansion von T-Zellen. Die Arbeitsgruppe von Mackall [Mackall et al., 2001] zeigte, dass sich die absolute Zahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen umgekehrt proportional zum Serumspiegel von IL-7 verhält. Ebenso zeigt sich diese Beziehung bei CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. So folgte einem Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellen infolge hochaktiver antiretroviraler Therapie (HAART) bei HIV-Patienten, die longitudinal beobachtet werden konnten, eine Abnahme des IL-7-Spiegels im Serum. Daher wird vermutet, dass IL-7 eine zentrale Rolle bei der Regulierung der T-Zellhomöostase einnimmt und zukünftig auch therapeutisch in

diesem Sinne eingesetzt werden könnte [Fry et al., 2001; Kittipatarin and Khaled, 2007].

### 1.2.6 Effekte auf das Immunsystem

Im Gegensatz zu anderen Zytokinen, deren Fehlen keinen Einfluss auf die Entwicklung oder Funktion von T- und B-Zellen hat, wie zum Beispiel IL-2 oder IL-4, nimmt IL-7 eine besondere Stellung ein; es ist redundant für die Lymphopoese. Es dient als wichtiger Wachstumsfaktor sowie als Faktor für die Differenzierung und die Entwicklung der TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen inner- und außerhalb des Thymus. Weiterhin fördert es die Immunfunktion in T-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten/Makrophagen.

### 1.2.7 IL-7 bei Erkrankungen

IL-7 scheint für die meisten der immunologischen Defekte verantwortlich, die im Mausmodell des X-SCID mit einem Defekt der gemeinsamen  $\gamma$ -Kette assoziiert sind [Trinder and Markus, 2004]. Das Fehlen des IL-7R $\alpha$  oder der IL-7R $\gamma$ -Kette führt zum schweren kombinierten Immundefekt [Roifman et al., 2000]. Die *Common Variable Immunodeficiency* (CVID) ist charakterisiert durch niedrige Immunglobulinspiegel, in deren Folge die Betroffenen häufig an Infekten erkranken. Auch die T-Zell-Funktion ist oft beeinträchtigt. Mutationen im IL-7-Gen führen zu schweren Beeinträchtigungen des Immunsystems. Bei CVID-Patienten konnten erhöhte Plasmaspiegel von IL-7 gemessen werden [Holm et al., 2005]. Die erhöhten IL-7-Spiegel wirken sich in Form erhöhter Anzahl von CD8 $^+$  T-Zellen mit reduzierter Apoptoserate aus. Ebenso sind hohe Spiegel von IL-7 mit einer niedrigen Anzahl von CD4 $^+$  Zellen verknüpft, wie man es zum Beispiel bei HIV-Patienten findet. Der erhöhte IL-7-Spiegel ist die Antwort des Immunsystems zur Erhaltung der T-Zell-Homöostase bei erniedrigter CD4 $^+$ -Zellzahl [Fry et al., 2001].

### 1.2.8 Einfluss auf B-Zellen

Die B-Zell-Entwicklung kann anhand von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen in verschiedene Phasen unterteilt werden. IL-7 ist zuerst als ein Faktor identifiziert worden, der das Wachstum der unreifen B-Zellen beeinflusst [Hardy et al., 1991]. Die erste Phase der B-Zell-Entwicklung ist abhängig von Gewebezytokinen, IL-11, Mastzell-Wachstumsfaktor und IL-7 [Milne et al., 2004b]. Die Notwendigkeit von IL-7 für die B-Zell-Entwicklung in der Maus unterstützten Experimente mit monoklonalen blockierenden Antikörpern sowie die Entwicklung von IL-7 $^{-/-}$ - und IL-7R $\alpha^{-/-}$ -Mäusen [von Freeden-Jeffry et al., 1995; Peschon et al., 1994]. In der IL-7 $^{-/-}$  Maus stoppt die B-Zell-Entstehung von der Entwicklung der pro-B-Zelle zur prä-B-Zelle [von Freeden-Jeffry et al., 1995]. In der IL-7R $\alpha^{-/-}$  Maus ist der Stopp früher, im Stadium der prä-pro-B-Zelle beschrieben [Peschon et al., 1994; Hofmeister et al., 1999]. Dies belegt die Anwesenheit eines weiteren Moleküls, das den IL-7R $\alpha$  nutzt und die B-Zell-Entwicklung im prä-pro B-Zell-Stadium steuert. IL-7 scheint auch schon zu einem früheren Zeitpunkt in der B-Zell-Entwicklung Einfluss zu nehmen. In Abwesenheit von IL-7 ist die Anzahl der B-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, sowie die Expression des frühen B-Zell Faktors deutlich erniedrigt [Dias et al., 2005],

so dass davon ausgegangen wird, dass IL-7 schon auf die lymphoide Vorläuferzelle Einfluss nimmt. Auf reife B-Zellen nimmt IL-7 hingegen keinen Einfluss [Carvalho et al., 2001]. In der IL-7<sup>-/-</sup> Maus gelang der Nachweis von reifen B-Lymphozyten trotz des Entwicklungsstopps von der pro zur prä-B-Zelle. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um B-Zellen der Marginalzonen, die sich durch periphere Expansion erhalten können. Die Verabreichung von exogenem IL-7 an Wildtyp-Mäuse führt zu einem signifikanten Anstieg der prä-B und reifen B-Zellen in normalen und lymphopenischen Mäusen [Morrissey et al., 1991]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass für die IL-7 induzierte Entwicklung der prä-pro-B-Zelle ein Kontakt mit Stromazellen notwendig ist, ohne den es zu einem Reifungsstopp in der B-Zellentwicklung kommt [Hardy et al., 1991; Hayashi et al., 1990].

HSZ	prä-pro	pro	frühe prä	späte prä	neue	reife
	B220	B220	B220	B220	B220	B220
	CD43	CD43	CD43			
		CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
			CD25		IgM	IgM
						IgD

Tabelle 1.1: Murine B-Zell-Entwicklung, modifiziert nach Hardy und Hayakawa [Hardy et al., 1991]

### 1.2.9 Einfluss auf T-Zellen

Die Entwicklung der T-Zellen durchläuft im Thymus verschiedene Stadien. Die erste Stufe wird von den Dreifach-Negativen Thymozyten (TN), CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, repräsentiert, gefolgt von Doppelt-Positiven (DP) Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, und schließlich Einfach-Positive (single positive, SP), CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>. Den größten Anteil am T-Zell-Pool haben die DP mit etwa 80%, die SP repräsentieren etwa 15% und die Dreifach-Positiven (TP) etwa 5% aller T-Zellen.

HSZ	pro T <sub>1</sub>	pro T <sub>2</sub>	pro T <sub>3</sub>	pro T <sub>4</sub>	DP	SP
	CD44	CD44				
		CD25	CD25			
			TCR $\beta$	TCR $\beta$	TCR $\beta$	TCR $\beta$
					CD4	CD4 oder CD8
					CD8	

Tabelle 1.2: Murine T-Zell-Entwicklung

Die meisten (ca. 98%) aller T-Zellen gehen durch negative Selektion während der Entwicklung verloren. TN Thymozyten wandern in den Thymus bzw. die subkapsuläre Zone ein. Während der Reifung durchwandern sie den Kortex Richtung Mark und verlassen den Thymus als reife SP T-Zellen. Die T-Zell-Reifung ist unter anderem auch von Epithelzellen, Dendritischen Zellen, Fibroblasten sowie einigen weiteren Zellarten

abhängig. Schon in 13 Tage alten murinen Embryonen gelang der Nachweis von IL-7, parallel zur ersten Expansion von Thymozyten [Wiles et al., 1992]. Bald nachdem IL-7 als Wachstumsfaktor für B-Zellen identifiziert wurde, erkannte man den Einfluss von IL-7 auf das Überleben und die Proliferation unreifer Thymozyten. In IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen ist die Zellzahl im Thymus 20-fach geringer. Insbesondere wurde eine Anhäufung TN-Thymozyten beobachtet. Die Verabreichung monoklonaler anti-IL-7-Antikörper führte zu einer mehr als 99%-igen Reduktion der Zellularität im Thymus und einem Reifungsstopp vor der CD44<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Stufe.

Die Effekte von IL-7 auf die Entwicklung von T-Zellen sind vielfach. Frühere Experimente zeigen, dass IL-7 die Überlebensfähigkeit von Thymozyten unabhängig von der Proliferation erhöht ist [Watson et al., 1989; Suda and Zlotnik, 1991]. Ein in IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich erniedrigtes bcl-2, ein Apoptoseinhibitor, resultiert in einer erhöhten Apoptoserate der Thymozyten. Bcl-2 transgene Expression führt zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl der peripheren T-Zellen. Auch bax, ein proapoptotischer Faktor, ist am antiapoptotischen Effekt von IL-7 beteiligt [von Freeden-Jeffrey et al., 1997; Kim et al., 1998]. Deshalb wird angenommen, dass eine der Funktionen von IL-7 innerhalb des Thymus die Apoptosemodulation ist. IL-7 spielt eine wichtige Rolle im Stadium der TN-Zellen für das Überleben der T-Zellen. Zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren (wie SCF), trägt IL-7 zur Vermehrung der IL-7-Vorläuferzellen bei. So unterliegt eine genügende Anzahl an T-Zell-Vorstufen der TCR Umordnung, bevor es im Rahmen der positiven und negativen Selektion zum Untergang einer großen Anzahl von T-Zellen durch Apoptose kommt.

Neben dem Effekt auf die Entwicklung von B- und T-Zellen hat IL-7 auch Einfluss auf die Funktion von T-Lymphozyten. Es wirkt als zusätzlicher Stimulus bei der Aktivierung reifer T-Zellen über Förderung der Proliferation und Zytokinbildung. IL-7 scheint die Typ1-Immunantwort zu induzieren, denn es steigert die INF- $\gamma$ - und IL-2-Produktion. Ebenso steigert es die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4, der auf einem Teil der CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird [Jourdan et al., 2000] und aufgrund seiner Bindung mit SDF-1 (CXCL 12) wichtig beim Homing der T-Zellen in lymphatischem Gewebe ist. IL-7 hemmt den programmierten Zelltod der reifen T-Zellen, deshalb besteht bei IL-7<sup>-/-</sup> eine T-Lymphopenie, das Überleben von T-Zellen in Langzeitkulturen ist durch Zugabe von IL-7 möglich [Lynch and Miller, 1994]. Weiterhin erhöht IL-7 die lytische Aktivität von CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten (CTCs), lytischen NK-Zellen, NKT-Zellen und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen.

### 1.2.10 Weiterer Einfluss von IL-7

IL-7 scheint keinen oder nicht alleine Einfluss auf die Entwicklung von NK-Zellen zu haben, denn sowohl IL-7<sup>-/-</sup> als auch IL-7R<sup>-/-</sup> Mäuse haben eine normale Anzahl von NK-Zellen. Deren Entwicklung unterliegt vorwiegend dem Einfluss von IL-15 [Vicari et al., 1996]. Für die Entwicklung von TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen scheint IL-7 bzw. der IL-7R $\alpha$  unentbehrlich zu sein. So konnten in verschiedenen IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mausstämmen keine TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen gefunden werden [He and Malek, 1996; Maki et al., 1996]. Die T-Zell-Entwicklung findet hauptsächlich im Thymus statt, es gibt jedoch Hinweise, dass

auch außerhalb des Thymus eine T-Zell-Entwicklung stattfindet, meist genannt ist hier das Intestinum [Lefrançois and Puddington, 1995]. Durch Expression von transgenem IL-7 erfolgte eine Wiederaufnahme der extrathymischen T-Zell-Entwicklung. Somit nimmt IL-7 eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung aus dem Thymus stammender  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen, und der  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen, die außerhalb des Thymus gebildet werden, ein [Laky et al., 2000]. Auch die Entwicklung und Proliferation dendritischer und myeloischer Populationen wird durch IL-7 beeinflusst [Emile et al., 1997].

## 2 Fragestellung

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, den Einfluss von IL-7 auf die murine Lymphopoese weiter zu charakterisieren. Es ist bekannt, dass IL-7 sowohl die B- als auch die T-Lymphopoese beeinflusst (s.o.). Die Synthese von IL-7 findet in Stromazellen, aber auch dendritischen Zellen und Makrophagen statt. Als Bildungsorte sind insbesondere Knochenmark und Thymus zu nennen, aber auch das intestinale Epithel, Keratinozyten der Haut und dendritische Zellen der fetalen und adulten Leber.

Bisherige Untersuchungen, die die Funktionen von IL-7 weiter aufklären sollten, haben sich hauptsächlich auf einzelne Organe konzentriert. In den Arbeiten mit IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen hat man so auch die jeweiligen Unterschiede des Phänotyps der IL-7<sup>-/-</sup> Maus zur Wildtyp-Maus dargestellt. In der vorliegenden Arbeit werden fünf primäre und sekundäre lymphatische Organe bei IL-7<sup>-/-</sup> und IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen auf ihre Lymphozytenpopulationen hin untersucht. Die Untersuchung einzelner Organe soll weitere Informationen über IL-7 liefern, insbesondere ob eine Abhängigkeit der Auswirkung des Fehlens bzw. Vorhandensein von IL-7 erkennbar ist und ob IL-7 die Verteilung der Lymphozyten innerhalb der Organe und die Organe selbst beeinflusst.

Ein Fehlen von IL-7 könnte sich also vor allem in den Organen, in denen IL-7 gebildet wird, wie Knochenmark, Darm und Leber, auf die Anzahl der Lymphozyten im Organ und auf die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen auswirken. Da IL-7 auf einige Subpopulationen mehr als auf andere Einfluss nimmt und zum Beispiel die NK-Zell-Entwicklung und -Homöostase unabhängig von IL-7 zu sein scheinen, soll die Verteilung der Subpopulationen bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> beschrieben werden.

# 3 Versuchstiere, Material und Methoden

## 3.1 Versuchstiere

Wir untersuchen Mäuse der Mauslinie C57BL/9: Maus Inzuchtstamm (IL-7<sup>+/+</sup> Wildtyp) und der Mauslinie C57BL/9 ; 129<sup>tmIL-7</sup>. Die Transgene Mauslinie ist z. Z. die neunte Rückkreuzungsgeneration C57BL/9 x SV129<sup>tmIL-7</sup>. Ergänzend zum genehmigten Tierversuchsantrag (AZ.: 23.05.230-3-12/00) erfolgte die Anzeige einer Organentnahme am getöteten Tier (Organentnahmeanzeige/Anzeige Nr. 101 von 1996).

Die IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse sind auch unter konventioneller Haltung nicht infektanfälliger. Allerdings weisen sie eine verkürzte Lebensspanne auf (ca. 1 Jahr gegenüber ca. 3 Jahren bei Wildtypen). Auffällig ist eine verringerte Fertilität, d.h. sie haben insgesamt weniger Würfe mit zusätzlich abnehmender Wurfgröße.

## 3.2 Materialien

### 3.2.1 Monoklonale, fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle aufgeführten Antikörper werden von der Fa. BD PharMingen (Heidelberg) bezogen.

- (R-PE)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD4 (L3T4) Monoclonal Antibody;  
Clone: RM4-5
- (PerCP)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD4 (L3T4) Monoclonal Antibody;  
Clone: RM4-5
- (PerCP)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD8a (Ly-2) Monoclonal Antibody;  
Clone: 53-6.7
- (R-PE)-Conjugated Hamster Anti-Mouse CD3e (CD3 e chain) Monoclonal Antibody; Clone: 145-2C11
- (FITC)-conjugated Rat Anti-Mouse CD19 Monoclonal Antibody;  
Clone: 1D3
- (R-PE)-Conjugated Mouse Anti-Mouse NK-1.1 (NKR-P1B and NKR-P1C) Monoclonal Antibody; Clone: PK136
- (FITC)-Conjugated Mouse Anti-Mouse NK-1.1 (NKR-P1B and NKR-P1C) Monoclonal Antibody; Clone: PK136

- (FITC)-Conjugated Hamster Anti-Mouse TCR  $\beta$  chain Monoclonal Antibody; Clone: H57-597
- (R-PE)-Conjugated Hamster Anti-Mouse  $\gamma\delta$  T-Cell Receptor Monoclonal Antibody; Clone: GL3
- (FITC)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD45RB Monoclonal Antibody; Clone: 16A (also known as C363.16A)
- (R-PE)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD43 (Ly-48, Leukosialin) Monoclonal Antibody; Clone: S7
- (PerCP)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD45R/B220 Monoclonal Antibody; Clone: RA3-6B2
- (FITC)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD25 (IL-2 Receptor  $\alpha$  chain, p55) Monoclonal Antibody; Clone: 7D4
- (R-PE)-Conjugated Rat Anti-Mouse CD43 (Ly-48, Leukosialin) Monoclonal Antibody; Clone: S7
- (R-PE)-Conjugated Rat Anti-Mouse IgM Monoclonal Antibody; Clone: R6-60.2
- (FITC)-Conjugated Rat Anti-Mouse IgD Monoclonal Antibody; Clone: 11-26c.2a

FITC = Fluoreszein-Isothiocyannath (grün)

PE = Phycoerythrin (hellrot)

PerCP= Peridinin Chlorophyll-a Protein (dunkelrot)

### 3.2.2 Antikörper für die Immunhistochemie

Die Antikörper werden von BD PharMingen bzw. Santa Cruz bezogen.

- Purified Hamster Anti-Mouse CD3 $\epsilon$  Antibody For IHC; Clone: 145-2C11
- Purified Rat Anti-Mouse CD4 (L3T4) Monoclonal Antibody For IHC; Clone: H129.19
- Purified Rat Anti-Mouse CD8a (Ly-2) Monoclonal Antibody For IHC; Clone: 53-6.7
- Purified Rat Anti-Mouse CD19 Monoclonal Antibody For IHC; Clone: 1D3
- Purified Mouse Anti-Mouse NK1.1 (NKR-P1B and NKR-P1C) Monoclonal Antibody; Clone: PK136

- Purified Hamster Anti-Mouse TCR $\beta$  Chain Monoclonal Antibody;  
Clone: H57-597
- Purified Hamster Anti-Mouse TCR $\gamma\delta$  T-Cell Receptor Monoclonal Antibody;  
Clone: GL3
- Purified Hamster IgG1,  $\kappa$  Isotype Control For IHC;  
Clone: A19-3
- Purified Hamster IgG2,  $\lambda$ 1 Isotype Control For IHC;  
Clone: Ha4/8
- Purified Rat IgG2a Immunglobulin Isotype Control For IHC
- Purified mouse IgG2a $\kappa$  Immunglobulin Isotype Control For IHC
- VECTASTAIN Peroxidase Rat IgG (Pk 4001)
- VECTASTAIN Peroxidase Mouse IgG (Pk 4002)
- goat anti-armenian-hamster IgG-AP, Santa Cruz
- Biotinylated Mouse Anti-Hamster Cocktail For IHC;  
Clone: G70-204, G94-56

### 3.2.3 Sonstiges

Scalpel (# 21)	Feather (Japan)
Pinzette	Roth (Karlsruhe)
Petrischale (10 cm)	Falcon (BD, Heidelberg)
Cell-Stainer (Zellsieb) (70 µl)	Falcon (BD, Heidelberg)
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml, Eppendorf tubes	
20 ml Einmalspritzen (Omnifix)	Braun (Melsungen)
Kanülen 26G (Microlance)	BD (Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Lysing Solution	BD (Becton Dickinson, Heidelberg)
Mikrohomogenisatoren, konisch	Roth (Karlsruhe)
FACS tubes	Falcon (BD, Heidelberg)
konisches Röhrchen 50 ml	Falcon (BD, Heidelberg)
Cellstar tubes 15 ml	greiner
PBS DULBECCO'S Phosphate Buffered Saline 1x	PAA Laboratories
Tissue Tek	(SAKURA)
HSS-HRP	R&D
PBS	Gibco
Aqueous/Dry Mounting Medium	Crystal/Mount
Cryogengefäß (2,0 ml)	Corning
Mikrohomogenisator	Roth (Karlsruhe)

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Versuchstierhaltung

Futtermittel: Maus-/Nacktmausfutter, ssniff Nacktmausfutter (Spezialdiäten GmbH, Soest) (Rohnährstoffe: Rohprotein 25,0 %, Rohfett 5,8 %, Rohasche 6,7 %, Rohfaser 3,7 % Spurenelemente: Kupfer (5,0 mg/kg) Vitamine: A (18.000 µg/kg), D3 (1.200 µg/kg), E (120 µg/kg)).

### 3.3.2 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgt im Alter von drei bzw. 12 Monaten. Die Versuchstiere werden dazu in mit CO<sub>2</sub> vorbegaste Gefäße gesetzt, wodurch der Erstickungstod bereits nach 30 Sekunden eintritt. Es erfolgt die Entnahme der Organe Darm, Leber, Milz und Lunge sowie die Entnahme eines Femurs. Die Organe für die Durchflusszytometrie werden in je ein Falcon-Röhrchen, das mit PBS gefüllt ist und auf Eis steht, gegeben. So gekühlt werden die Organe transportiert und sofort weiter verarbeitet (3.3.3). Die Organe zur immunhistochemischen Untersuchung werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.3 Herstellung der Einzelzellsuspensionen

#### 3.3.3.1 Isolierung von Splenozyten

Unter Zuhilfenahme eines Mikrohomogenisators (Fa. Roth) werden die Milzen in einem Eppendorf-Gefäß homogenisiert. Die so gewonnene Zellsuspension wird mit 10 ml PBS aufgenommen und über einen 70 µm-Nylonfilter in ein 50 ml-Falcon-Tube filtriert. Das Transport-PBS (5 ml) wird ebenfalls filtriert (modifiziert nach [Schwarzkopff, 2001; Eulenburg, 2007]).

#### 3.3.3.2 Isolierung von Lymphozyten aus Dünndarm

Ein 4 cm langes Stück Dünndarm wird in einer Petri-Schale der Länge nach mit einer Mikroschere eröffnet und von Kotresten gesäubert. Zur weiteren Säuberung wird der Darm dann in einem mit PBS gefüllten Falcon-Tube geschwenkt. Die gesäuberten Darmstücke werden in einem 50 ml-Falcon-Tube, gefüllt mit 15 ml PBS, 60 Sekunden lang gevortext. Die so gewonnene Zellsuspension wird über einen 70 µm-Nylonfilter filtriert. Weitere Lymphozyten werden anschließend durch Homogenisierung der Darmstücke mittels eines Mikrohomogenisators in einem Eppendorfszylinder gewonnen. Die Zellsuspension wird mit 5 ml PBS aufgenommen und über einen 70 µm-Nylonfilter in ein 50 ml-Falcon-Tube filtriert (modifiziert nach [Eulenburg, 2007]).

#### 3.3.3.3 Isolierung hepatischer Lymphozyten

Die beiden entnommenen Leberlappen werden zunächst in ein Falcon-Tube mit frischem PBS umgefüllt. Dann werden sie in je einen Eppendorfszylinder gegeben und mit einem Mikrohomogenisator zerstoßen. Das Leber-Homogenat wird mit 15 ml

PBS aufgenommen und über einen 70 µm-Nylonfilter in ein 50 ml-Falcon-Tube filtriert (modifiziert nach [Schwarzkopff, 2001]).

#### **3.3.3.4 Isolierung von Lymphozyten aus der Lunge**

Die Lunge wird in einer Petri-Schale in frischem PBS zunächst mit einem Skalpell in kleinere Segmente zerteilt, die Stücke werden anschließend in einen Eppendorfzylinder gegeben und mit einem Mikrohomogenisator verarbeitet. In 15 ml PBS wird die Zellmasse aufgenommen und über einen 70 µm-Nylonfilter in ein 50 ml Falcon-Tube filtriert (modifiziert nach [Schwarzkopff, 2001]).

#### **3.3.3.5 Isolierung von Lymphozyten aus dem Knochenmark**

Die entnommenen Femurknochen werden in eine Petrischale mit PBS gegeben. Die Epiphysen der Knochen werden in einer trockenen Petrischale abgetrennt. Mit einer 16G Kanüle wird 10 ml PBS durch den Knochen in eine Petrischale mit 5 ml PBS gespült, um das Knochenmark herauszulösen. Die so gewonnene Zellsuspension wird über einen 70 µm-Nylonfilter in ein 50 ml Falcon-Tube filtriert ([Feyen, 2004]).

#### **3.3.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Aufbereitung der Einzelzellsuspensionen**

In den wie oben beschrieben erhaltenen Einzelzellsuspensionen wird nun die Zellzahl bestimmt. Hierzu wird je 40 µl Zellsuspension und 20 µl Lysin-Lösung in 10 ml Celloton gegeben. Die Messung erfolgt an einem elektrischen Zellcounter. Je nach enthaltener Zellzahl ergibt sich das Volumen an PBS, mit dem die Zellen im folgenden Schritt aufgenommen werden, um eine Konzentration zwischen 100.000/ml und 2.000.000/ml für die anschließende FACS-Analyse zu erhalten.

Die Einzelzellsuspensionen werden nun zur Reinigung für 5 Minuten bei 4 °C und einer Geschwindigkeit von 1.700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das bodenständige Pellet in einem von der zuvor bestimmten Zellkonzentration abhängigen Volumen PBS aufgenommen.

### **3.3.4 Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können verschiedene Parameter einer Zelle erfasst werden. So können neben der Erfassung von Zellgröße und Granularität auch Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle nach Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern identifiziert werden. Für die Messung werden die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen durch eine Kapillare geführt, so dass die Zellen einzeln an einem Argon-Laser vorbeigeleitet werden. Nach Anregung bei 488 nm können von verschiedenen Detektoren unterschiedliche Lichtemissionen jeder einzelnen Zelle erfasst werden: Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC), das Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter*, SSC) und die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe im grünen (525 nm; FL1-Detektor), roten (578 nm; FL2-Detektor) oder dunkelroten Wellenlängenbereich (680 nm; FL3-Detektor). In dieser Arbeit werden grün bzw. rot fluoreszierende Farbstoffe (Kapitel 3.2.1) einzeln oder als Antikörperkonjugate verwendet.

FSC ist ein Maß für die Größe der Zelle, SSC beschreibt die intrazelluläre Granularität. Durch eine Dot-Plot-Darstellung von FSC gegen SSC können tote Zellen oder Partikel aufgrund ihrer geringen Größe und Granularität von lebenden Zellen unterschieden und so von der Analyse ausgeschlossen werden.

#### 3.3.4.1 Antikörper-Färbung und gewählte Kombinationen

Pro Färbungsansatz werden 100  $\mu$ l Zellsuspension in einem FACS-Röhrchen aufgenommen. Zur Anfärbung der gewünschten Oberflächenmoleküle wird ein FITC-, PE- oder PerCP-markierter Antikörper gegen das nachzuweisende Molekül in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration eingesetzt. Bei der Zugabe des Antikörpers zur Zellsuspension muss darauf geachtet werden, dass der Ansatz gründlich aber vorsichtig gemischt wird. Dann wird der Färbungsansatz 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgt die Erythrozyten-Lyse (BD-Lyse, Becton Dickinson). Pro Ansatz wird 1ml BD-Lyse dazugegeben. Es schließt sich eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln an. Danach wird ein Waschschrift durchgeführt, die Proben werden für 5 Minuten bei 4 °C und 1.600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und je Probe wird 2 ml PBS zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift, in dem die Proben wie zuvor zentrifugiert werden und der Überstand anschließend dekantiert wird, werden die Zellen in 100 bzw. 200  $\mu$ l PBS resuspendiert, in einer abgedunkelten Aufbewahrungsdose aus Styropor auf Eis gestellt und anschließend gemessen.

Für die durchflusszytometrischen Analysen der Einzelzellsuspensionen wurden die folgend aufgeführten zehn kombinierten Antikörper-Färbungen standardisiert eingesetzt. Der erstgenannte Antikörper ist an FITC, der zweite an PE, und der dritte an PerCP konjugiert:

1. Isotypkontrolle (Hamster bzw. Ratte Anti Maus Immunglobuline)
2. CD3<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup>
3. CD45RB<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup>
4. TCR $\beta$ <sup>+</sup> / TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>
5. TCR $\beta$ <sup>+</sup> / NK1.1<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>
6. IgD<sup>+</sup> / IgM<sup>+</sup> / B220<sup>+</sup>
7. CD19<sup>+</sup> / B220<sup>+</sup>
8. NK1.1<sup>+</sup> / CD43<sup>+</sup> / B220<sup>+</sup>
9. CD25<sup>+</sup> / CD44<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>
10. CD45RB<sup>+</sup> / CD44<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>

Mit diesen Antikörperfärbungen werden folgende Zellpopulationen erfasst:

Lymphozyten	Phänotyp
Reife T-Zellen	TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> oder TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>
Reife T-Helferzellen	TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>
Naive T-Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> /CD45RB <sup>high</sup>
Gedächtnis T-Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> /CD45RB <sup>low</sup>
Reife Zytotoxische T-Zellen	TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
Naive Zytotoxische T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD45RB <sup>high</sup>
Zytotoxische Gedächtnis T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD45RB <sup>low</sup>
Doppelnegative T-Zellen	TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> /CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup>
Reife B-Zellen	CD19 <sup>+</sup>
Reife NK-Zellen	NK1.1 <sup>+</sup> /TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>
NK-like T-Zellen	NK1.1 <sup>+</sup> /TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>
B-Vorläuferzellen	CD19 <sup>-</sup> /RB220 <sup>+</sup>
Neue B-Zellen	IgM <sup>+</sup> /IgD <sup>+</sup>

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der in der Durchflusszytometrie untersuchten Zell-Populationen. CD45RB<sup>high</sup> entspricht dabei naiven, CD45RB<sup>low</sup> Gedächtniszellen.

### 3.3.4.2 Durchflusszytometrie-Messung

Zur durchflusszytometrischen Analyse werden die mit Antikörpern markierten Zellen von Lunge und Knochenmark in je 100  $\mu$ l, die von Milz, Leber und Darm in je 200  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Messungen erfolgen mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Pro Messung werden mindestens 10.000 Partikel pro Ansatz aufgenommen. Die Auswertung wird an einem Apple Power Macintosh G3 mit der Software *CellQuest* (Becton Dickinson) durchgeführt.

### 3.3.5 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie (IHC) nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen.

#### 3.3.5.1 Gefrierschnitte

Gefrierschnitte (Kryostatschnitte) bieten in der Immunhistochemie eine bessere Erhaltung der Antigene (bzw. ihrer Antigenität) als Paraffinschnitte. Die morphologischen Details sind bei Gefrierschnitten jedoch oft deutlich schlechter erhalten als bei paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Viele Antigene, wie Oberflächenmarker von Leukozyten, überstehen weder Fixationsschritte noch die Prozedur der Paraffineinbettung. Zum Nachweis dieser Antigene wird daher mit Alkohol oder Aceton fixiert. Der durch Aceton erzeugte Fixierungseffekt ist nicht vollständig. Gefrierschnitte, die mit längeren immunzytochemischen Protokollen gefärbt werden, zeigen oft störende morphologische Veränderungen, wie Auflösung des Zellkerns und sichtbaren Verlust von Membranen. Solche Artefakte können jedoch durch dünne Gewebeschnitte und längeres Trocknen weitgehend verhindert werden.

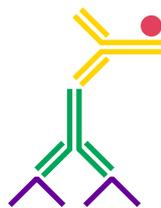


Abbildung 3.1: Indirekte immunhistochemische Färbemethode mit konjugiertem Sekundärantikörper. (Antigen: blau, unkonjugierter Primärantikörper: grün, Sekundärantikörper: gelb, enzymmarkiert: rot)

### 3.3.5.2 Antikörper-Färbung und gewählte Kombinationen

**Anfertigen der Gefrierschnitte (Kryostatschnitte)** Die entnommenen Organe werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der gefrorene Gewebeblock wird in Tissue Tec einbettet und im Kryostat bei ca.  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf den Objektträger gefroren. Es werden  $8\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf saubere Objektträger aufgezogen. Die aufgezogenen Gefrierschnitte werden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die endgültige Fixierung in Aceton wird dann erst unmittelbar vor der Färbung durchgeführt.

**Zwei-Schritt Indirekte Methode** Bei dieser Methode (Abbildung 3.1) bindet zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen bevor ein zweiter enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen wird, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Danach folgt die Substrat-Chromogenreaktion. Es können mehrere Primärantikörper aus einer Spezies mit dem gleichen konjugierten Sekundärantikörper kombiniert werden. Die indirekte (oder 2-Schritt-) Methode ist sehr sensitiv. Es kann zu unerwünschten Reaktionen kommen, wenn der Sekundärantikörper mit endogenen Immunglobulinen in der Gewebeprobe kreuzreagiert. Diese Kreuzreaktivität versucht man durch Verwendung präabsorbierter Antiseren (Seren, die mit Immunglobulinen aus derjenigen Spezies absorbiert wurden, aus der die Probe stammt) zu unterbinden [Thomas, 2001; JM and S, 1987].

**Doppelfärbung** Die zu färbenden Gefrierschnitte müssen zunächst ca. 20 Minuten an der Luft trocknen bevor sie für fünf Minuten in Aceton fixiert werden. Anschließend folgt wiederum eine Lufttrocknung der Gefrierschnitte. Es sind jeweils zwei Gewebeschnitte pro Objektträger aufgetragen. Um ein Vermischen der Antikörper auf dem Objektträger zu verhindern, werden die Präparate mit einem Fettstift umkreist. Die folgenden Schritte dienen dazu, gewebeeigene Enzyme, die zu unerwünschter Hintergrundfärbung führen können, zu blockieren. Zunächst erfolgt ein Peroxidase-Block, dann die Avidin-Blockade und zuletzt die Biotin-Blockade für jeweils zehn Minuten. Zwischen den Blockungsschritten werden die Präparate mit PBS gewaschen. Dann können die primären Antikörper in der jeweils benötigten und vorher getesteten Konzentration und Menge gemischt und aufgetragen werden. Parallel hierzu werden die Isotypkontrollen in gleicher Konzentration aufgetragen und die Präparate damit für 75 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es schließt

sich ein Waschschrift, dreimal drei Minuten in PBS, an. Die sekundären Antikörper werden nun, wiederum in der benötigten und empfohlenen Konzentration, gemischt und anschließend aufgetropft. Die Inkubation der sekundären Antikörper, ebenfalls bei Raumtemperatur, dauert 45 Minuten. Auch hieran schließt sich ein Waschschrift, dreimal drei Minuten in PBS, an, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die für die anschließende Farbreaktion benötigten Enzyme, ABC-Kit und HSS, werden nun gemischt und auf die Präparate getropft, auch hier erfolgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 45 Minuten. Nun folgen die eigentlichen Färbeschritte; Zunächst der rote Farbstoff mit dem AEC-Komplex, der eine Einwirkzeit von wenigen Minuten benötigt. Die Reaktion wird unter dem Mikroskop beobachtet, um sie rechtzeitig, bei genügender Färbung, zu stoppen. Dann folgt die blaue Färbung mit dem AP-Komplex, der eine längere Einwirkzeit benötigt. Dies wird auch beobachtet, um bei entsprechend starker Färbung die Reaktion zu stoppen. An den Stellen, an denen der primäre und somit auch der sekundäre Antikörper und der AEC-Komplex bzw. AP-Komplex gebunden waren, wurde das Substrat zu einem roten bzw. blauen Farbniederschlag umgesetzt. Abschließend werden die Präparate mit Mountain Medium eingedeckelt und zum Trocknen in den Ofen gestellt (modifiziert nach [Schwarzkopff, 2001; Thomas, 2001]).

**Einfachfärbung** Bei einfacher Färbung entfällt der zweite Färbeschritt mit dem AP-Komplex. Es erfolgt eine Gegenfärbung der Organschnitte mit Hämatoxylin, wodurch auch die Gewebestruktur der Organe besser zur Darstellung kommt.

Für die immunhistochemischen Analysen der lymphatischen Organe wurden die folgend aufgeführten Antikörper-Färbungen standardisiert eingesetzt. Der erstgenannte AK wird jeweils mit rotem Farbstoff und AEC-Komplex angefärbt, der zweite mit blauem Farbstoff, der mit dem AP-Komplex reagiert:

1.  $CD4^+$  und  $CD8^+$  /  $TCR\beta^+$
2.  $CD4^+$  /  $TCR\beta^+$
3.  $CD8^+$  /  $TCR\beta^+$
4.  $CD19^+$  /  $CD3^+$
5.  $NK1.1^+$  /  $TCR\gamma\delta^+$

Mit diesen Antikörperfärbungen werden folgende Zellpopulationen erfasst:

Lymphozyten	Phänotyp
Doppelnegative T-Zellen	$TCR\alpha\beta^+/CD4^-/CD8^-$
Reife T-Helferzellen	$TCR\alpha\beta^+/CD4^+$
Reife Zytotoxische T-Zellen	$TCR\alpha\beta^+/CD8^+$
B- oder T-Lymphozyten	$CD19^+$ oder $CD3^+$
NK-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen	$NK1.1^+$ oder $\gamma\delta^+$

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der mittels IHC mit Doppelfärbung untersuchten Zell-Populationen.

Zusätzlich zu den Doppelfärbungen wurden auch Einzelfärbungen mit den folgenden Antikörpern angefertigt:

<b>Lymphozyten</b>	<b>Antikörper</b>
Reife T-Helferzellen	CD4 <sup>+</sup>
Reife Zytotoxische T-Zellen	CD8 <sup>+</sup>
B- Lymphozyten	CD19 <sup>+</sup>
T-Lymphozyten	CD3 <sup>+</sup>
NK-Zellen	NK1.1 <sup>+</sup>
$\gamma\delta$ T-Zellen	TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>
$\alpha\beta$ T-Zellen	TCR $\beta$ <sup>+</sup>

Tabelle 3.3: Zusammenstellung der mittels IHC mit Einzelfärbung untersuchten Zell-Populationen.

### 3.4 Statistik

Zum Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben wurde der t-Test nach Student angewandt. Die mit Hilfe des t-Tests ermittelten  $p$ -Werte beziehen sich auf die Mittelwerte der Absolutwerte. Es wird ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt, das heißt Werte mit  $p > 0,05$  werden als nicht signifikant, Werte mit  $p \leq 0,05$  als signifikant bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gewicht der Mäuse sowie ihre relativen und absoluten Lymphozytenzahlen

Im Alter von drei Monaten unterscheiden sich die Wildtyp und IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse bezüglich ihres Gewichts nicht voneinander. Die IL-7<sup>+/+</sup> Mäuse wiegen durchschnittlich 23,8 g, die IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse 23,6 g. Mit zunehmendem Alter jedoch, hier im Alter von 12 Monaten, wiegen die IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse deutlich weniger als die Wildtyp-Mäuse. Die IL-7<sup>+/+</sup> Mäuse haben ein durchschnittliches Gewicht von 35,3 g, die IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse ein Gewicht von 26,2 g (Tabelle 4.1).

Alter Genotyp	3 Monate		12 Monate	
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>
	25,0 g (w)	18,7 g (w)	44,3 g (w)	31,1 g (w)
	26,3 g (m)	19,7 g (m)	25,0 g (m)	30,9 g (m)
	24,1 g (m)	25,0 g (m)	41,8 g (m)	22,3 g (m)
	20,4 g (w)	21,0 g (w)	41,1 g (w)	24,4 g (w)
	23,4 g (w)	23,4 g (w)	24,5 g (w)	22,3 g (w)
MW ± SA	23,8 g ± 2,2	23,6 g ± 3,5	35,3 g ± 9,7	26,2 g ± 4,5
Signifikanz	$p = 0,8843$		$p = 0,0929$	

Tabelle 4.1: Gewichtsvergleich jeweils drei Monate alter und einjähriger IL-7<sup>+/+</sup>- und IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse

Auch bei der makroskopischen Betrachtung der entnommenen Organe ist dieser Unterschied der beiden Phänotypen vorhanden. Die Organe der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse sind kleiner als die der IL-7<sup>+/+</sup> Mäuse, und der Größenunterschied nimmt mit dem Alterungsprozess zu. Nach Herstellung der Einzelzellsuspensionen der Organe und Messung der Lymphozytenzahlen zeigt sich bei den IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen überwiegend eine Reduktion der Lymphozytenzahl, sowohl relativ, als auch absolut. Bei den drei Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen ist der relative Anteil der Lymphozyten in Darm, Knochenmark und Milz geringer als bei IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen, signifikant ist der Unterschied nur in der Milz. Entgegen der Erwartungen ist der Anteil der Lymphozyten in Leber und Lunge in Abwesenheit von IL-7 höher. Im Alter von 12 Monaten ist die Anzahl der Lymphozyten bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant niedriger in KM, Milz und Lunge, im Darm etwa gleich wie bei IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen. Eine höhere Lymphozytenanzahl im Vergleich zum Wildtyp wird in der Leber der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse gemessen. Im Altersverlauf zeigt sich beim Wildtyp eine gleichbleibende bzw. wenig zunehmende Anzahl, bei IL-7<sup>-/-</sup> eine sinkende Zahl der Lymphozyten in Knochenmark, Lunge und Milz, eine Zunahme hingegen in Darm und Leber im Alter von 12 Monaten (Tabelle 4.2).

	3 Monate			12 Monate		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>
Darm	15,0 ± 5,7 (14,8)	12,9 ± 6,3 (9,4)	0,5979	15,8 ± 9,2 (18,7)	15,3 ± 5,0 (17,3)	0,9109
KM	31,5 ± 7,0 (33,8)	26,6 ± 3,6 (27,2)	0,2014	28,9 ± 2,8 (30,3)	22,2 ± 5,9 (20,4)	0,0483*
Leber	13,8 ± 8,8 (8,7)	17,0 ± 5,0 (14,1)	0,4996	18,9 ± 8,3 (14,6)	20,4 ± 6,3 (18,0)	0,7626
Lunge	32,9 ± 9,5 (33,7)	38,7 ± 10,7 (40,9)	0,3977	49,8 ± 2,7 (48,7)	15,6 ± 16,0 (8,0)	0,0015*
Milz	64,6 ± 5,5 (65,3)	41,3 ± 3,3 (40,0)	0,00004*	63,5 ± 10,4 (67,8)	33,0 ± 5,2 (31,8)	0,0004*

Tabelle 4.2: Vergleich der relativen Anzahl der Lymphozyten in % aus Einzelzellsuspension in den Organen. Die Zahlen wurden mit einem Zellcounter ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung, in Klammern ist der Median angegeben. Mit Hilfe des Student t-Tests ermittelte p-Werte beziehen sich auf die angegebenen Mittelwerte. Signifikant ist ein p-Wert  $\leq 0,05$ . Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet.

Weiterhin sieht man im Vergleich der absoluten Zellzahlen der Organe im Alter von drei Monaten lediglich in der Milz eine deutlich geringere Zellzahl bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen. Im Alter von 12 Monaten zeigt sich eine gleiche Zellzahl bei IL-7<sup>-/-</sup> und IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen in der Lunge, und in den übrigen Organen (Darm, Knochenmark, Leber und Milz) eine geringere Lymphozytenzahl. Im Altersvergleich ist bei den IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen eine Vermehrung des Lymphozytenpools zu beobachten, bei den IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen sind die Zahlen im Alter von drei und 12 Monaten in etwa gleichbleibend.

	3 Monate			12 Monate		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>
Darm	1314±1158 (996)	2416±3006 (1128)	0,4662	3209±2309 (2382)	4414±2707 (3633)	0,4705
KM	4602±1701 (4993)	2287±1498 (2151)	0,0518	5460±1346 (4848)	5320±2992 (24332)	0,9265
Leber	5340±6906 (1907)	5478±3702 (5289)	0,9695	16370±8098 (13056)	7513±4286 (5688)	0,0626
Lunge	703±562 (532)	689±558 (472)	0,9692	2038±1399 (1413)	2538±2356 (6630)	0,6936
Milz	94252±48120 (81900)	8030±4862 (6715)	0,0040*	66978±20430 (65088)	10483±1682 (10461)	0,0003*
Lymphozyten gesamt	106211	16725		94055	30268	

Tabelle 4.3: Vergleich der absoluten Anzahl der Lymphozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) der Organe. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung, in Klammern ist der Median angegeben. Mit Hilfe des Student t-Tests ermittelte Signifikanzen beziehen sich auf die angegebenen Mittelwerte.

## 4.2 Verteilung der Lymphozytensubpopulationen in den einzelnen Organen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> in Darm, Leber, Knochenmark, Lunge und Milz zum Zeitpunkt des Lebensalters von drei und 12 Monaten untersucht. Von je  $n = 5$  Mäusen wurden die jeweiligen Organe entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt (Kap. 3.3.3).

Nach Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern wurden diese durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der absoluten Zahlen mit seiner Standardabweichung sowie der jeweils zugehörige relative Anteil der Population an der Gesamtzahl der Lymphozyten im jeweiligen Organ.

### 4.2.1 Lymphozyten im Knochenmark drei Monate alter Mäuse

Zellen im Knochenmark	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]			relativ [%]		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	$p$	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	$p$
TCR $\alpha\beta^+$	800 $\pm$ 516	259 $\pm$ 145	0,0539	17,3	11,5	0,1513
TCR $\gamma\delta^+$	239 $\pm$ 155	61 $\pm$ 40	0,0382*	5,4	2,6	0,0566
Reife CD4	321 $\pm$ 92	104 $\pm$ 71	0,0031*	7,7	4,1	0,0663
naive	130 $\pm$ 46	29 $\pm$ 28	0,0029*	2,9	1,0	0,0012*
Gedächtnis	190 $\pm$ 88	75 $\pm$ 48	0,0331*	4,7	3,1	0,3470
Reife CD8	198 $\pm$ 191	53 $\pm$ 43	0,0119*	4,6	2,1	0,0485*
naive	143 $\pm$ 31	21 $\pm$ 13	0,00004*	3,5	0,8	0,0031*
Gedächtnis	56 $\pm$ 63	32 $\pm$ 29	0,4739	1,1	1,3	0,7989
DN-T-Zellen	344 $\pm$ 192	127 $\pm$ 76	0,0460*	7,5	6,3	0,4923
B-Vorläuferzellen	627 $\pm$ 218	230 $\pm$ 162	0,0114*	15,4	10,1	0,2474
neue B-Zellen	356 $\pm$ 213	42 $\pm$ 27	0,0113*	7,8	1,9	0,0786
reife B-Zellen	1992 $\pm$ 1791	20 $\pm$ 17	0,0005*	43,0	0,8	2,0 $\cdot 10^{-8}$ *
NK-like T-Zellen	126 $\pm$ 45	51 $\pm$ 45	0,0278*	3,0	3,0	0,9925
Reife NK-Zellen	314 $\pm$ 74	171 $\pm$ 109	0,0420*	7,5	8,3	0,3310
Lymphozyten	4602	2287	0,0518	31,5	26,6	0,2014

Tabelle 4.4: Lymphozytensubpopulationen im Knochenmark drei Monate alter Mäuse bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>.

Im Knochenmark der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse fällt eine Lymphopenie auf, die sich im Alter von drei Monaten für fast alle untersuchten Subpopulationen zeigt. Man misst signifikant niedrigere Anteile an reifen TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen, reifen-, naiven- und Gedächtnis-CD4 Zellen, reifen- und naiven CD8 Zellen, DN-T Zellen, B-Vorläufer- und reifen B-Zellen. Die niedrigere Anzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen ist durch das Fehlen der naiven CD8<sup>+</sup> Zellen bedingt. Auch die Anzahl der NK-T- und reifen NK-Zellen ist bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant niedriger. Insbesondere der relative Anteil an der Gesamtlmphozytenzahl der reifen B-Zellen und naiven B-Zellen ist bei ko-Mäusen signifikant niedriger als bei IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen (reife B-Zellen:  $p = 0,00000002$ ). Die Anzahl der TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen ist in Abwesenheit von IL-7 signifikant niedriger ( $p = 0,0382$ ) (Abbildungen 4.1, 4.2).

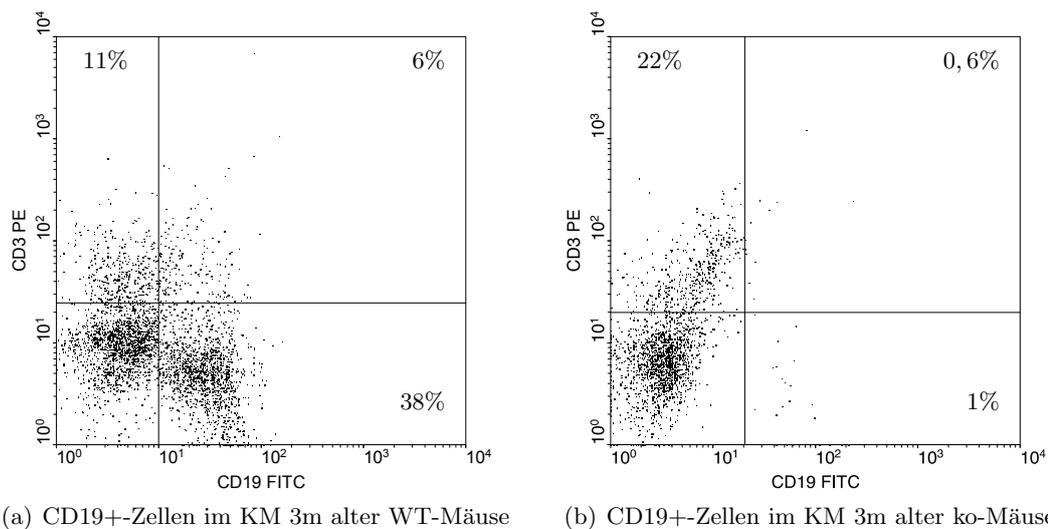


Abbildung 4.1: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks im Alter von drei Monaten von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und CD19<sup>+</sup>-B-Zellen. Der rechte untere Quadrant zeigt die CD19<sup>+</sup>-B-Zellen.

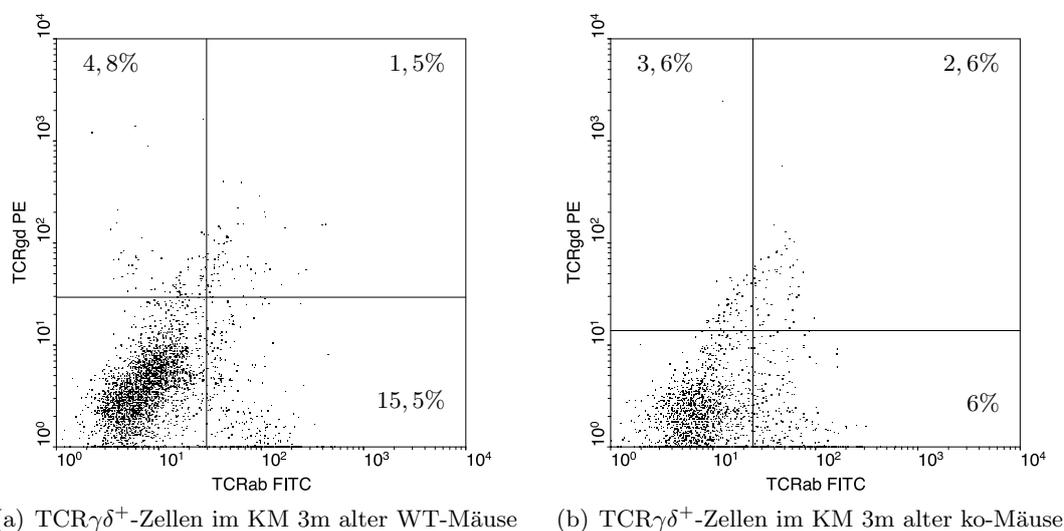


Abbildung 4.2: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des KM im Alter von 3 Monaten bzgl. TCR $\gamma\delta$ . Der linke obere Quadrant zeigt die TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen.

## 4.2.2 Lymphozyten im Knochenmark einjähriger Mäuse

Zellen im Knochenmark	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]		<i>p</i>	relativ [%]		<i>p</i>
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>		IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	
TCR $\alpha\beta^+$	922 $\pm$ 460	1063 $\pm$ 525	0,6645	16,8	21,3	0,3474
TCR $\gamma\delta^+$	283 $\pm$ 69	266 $\pm$ 229	0,8784	5,3	4,5	0,5306
Reife CD4	400 $\pm$ 84	1154 $\pm$ 948	0,1148	7,5	19,3	0,0216*
naive	129 $\pm$ 62	909 $\pm$ 887	0,0854	2,6	14	0,0164*
Gedächtnis	275 $\pm$ 101	294 $\pm$ 217	0,86532	5	6,4	0,4776
Reife CD8	203 $\pm$ 54	265 $\pm$ 175	0,4708	3,8	5,2	0,4335
naive	142 $\pm$ 26	145 $\pm$ 120	0,9530	2,8	3	0,8208
Gedächtnis	61 $\pm$ 48	191 $\pm$ 135	0,0768	1,1	3,5	0,0683
DN-T-Zellen	426 $\pm$ 355	381 $\pm$ 123	0,7952	7,6	8,4	0,7680
Naive B-Zellen	251 $\pm$ 149	85 $\pm$ 51	0,0468*	4,4	1,8	0,1040
Reife B-Zellen	1505 $\pm$ 449	122 $\pm$ 133	0,0002*	27,6	2,1	0,0391*
NK-like T-Zellen	164 $\pm$ 74	166 $\pm$ 95	0,9634	3,0	3,5	0,5915
Reife NK-Zellen	415 $\pm$ 216	339 $\pm$ 167	0,5500	7,5	7	0,7832
Lymphozyten	5460	5320	0,9265	28,9	22,2	0,0483*

Tabelle 4.5: Lymphozyten im Knochenmark einjähriger Mäuse bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>.

Die Gesamtlymphozytenzahl von IL-7<sup>-/-</sup> und IL-7<sup>+/+</sup> im Knochenmark 12 Monate alter Mäuse ist fast identisch. Im Knochenmark der 12 Monate alten Mäuse findet sich, wie im Alter von 3 Monaten, eine signifikante Reduktion der Anzahl der reifen B-Zellen und deren relativen Anteils (Tabelle 4.5, Abbildungen 4.3(a), 4.3(b)). Im Altersvergleich ist im Alter von 12 Monaten eine Zunahme der Lymphozyten insgesamt erfolgt, besonders CD4<sup>+</sup> und in geringem Maße auch CD8<sup>+</sup> Zellen sowohl beim Wildtyp, als auch beim IL-7<sup>-/-</sup> Typ. Die Anzahl und auch der relative Anteil der CD4- und CD8-Populationen ist bei IL-7<sup>-/-</sup> höher als beim Wildtyp. Es ist eine Zunahme der B-Vorläufer-Zellen im Knochenmark der 12 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zum Alter von drei Monaten zu beobachten, sowie auch der reifen B-Zellen. Die Anzahl der NK-T- und reifen NK-Zellen ist bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> gleich.

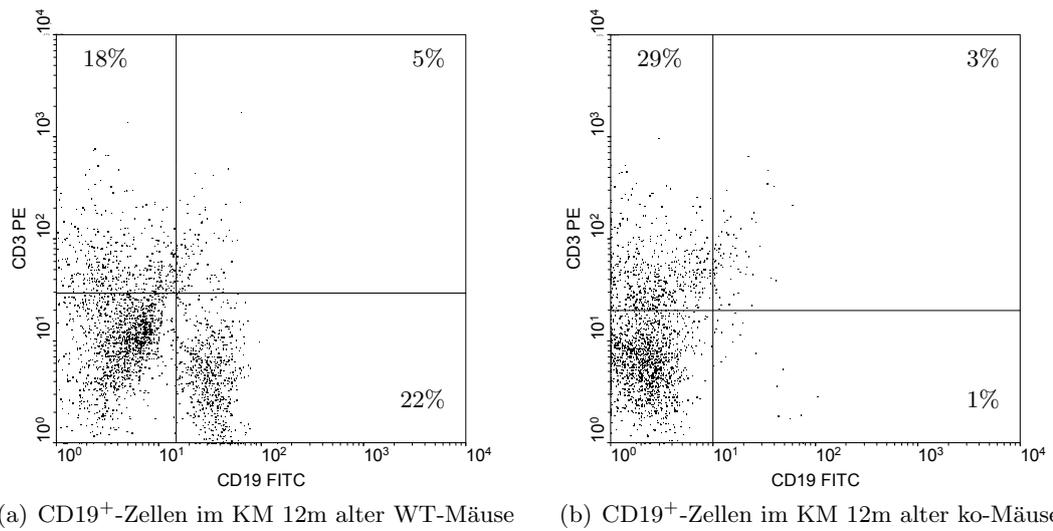


Abbildung 4.3: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des KM im Alter von 12 Monaten bzgl. CD19. Der rechte untere Quadrant zeigt die CD19<sup>+</sup> B-Zellen.

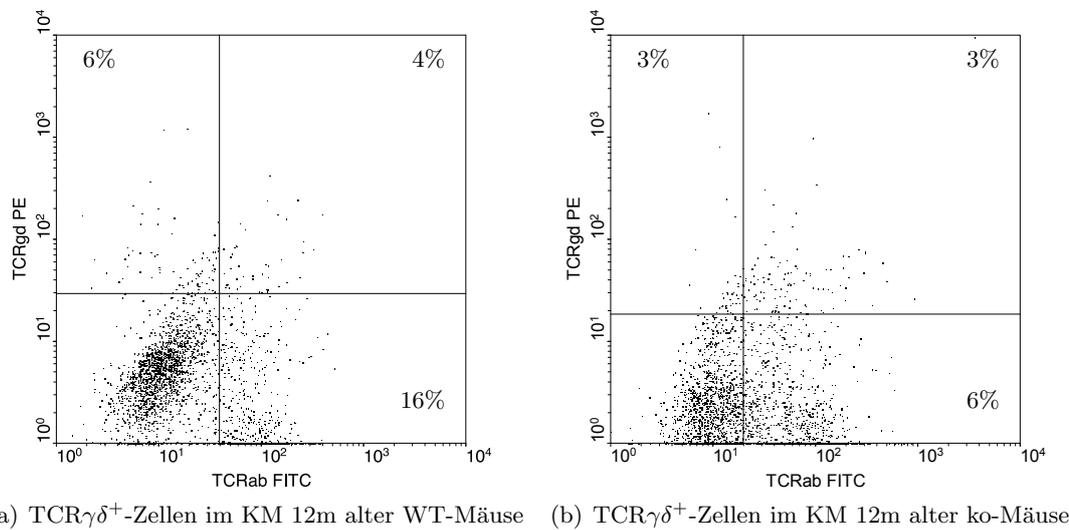


Abbildung 4.4: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des KM im Alter von 12 Monaten bzgl. TCRγδ. Der linke obere Quadrant zeigt die TCRγδ<sup>+</sup> T-Zellen.

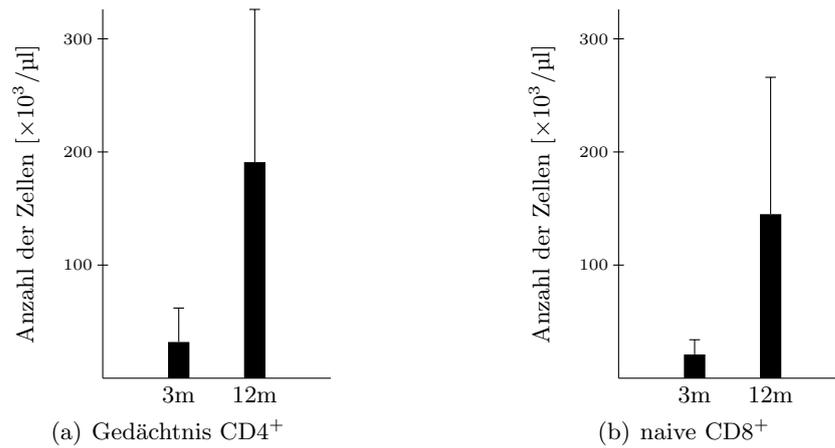


Abbildung 4.5: Altersabhängige signifikante Zunahme der Anzahl der Gedächtnis  $CD4^+$  und naiven  $CD8^+$  Lymphozyten im Knochenmark bei  $IL-7^{-/-}$  Mäusen ( $p_{\text{Gedächtnis } CD4^+} = 0,0328$ ;  $p_{\text{naive } CD8^+} = 0,0500$ ).

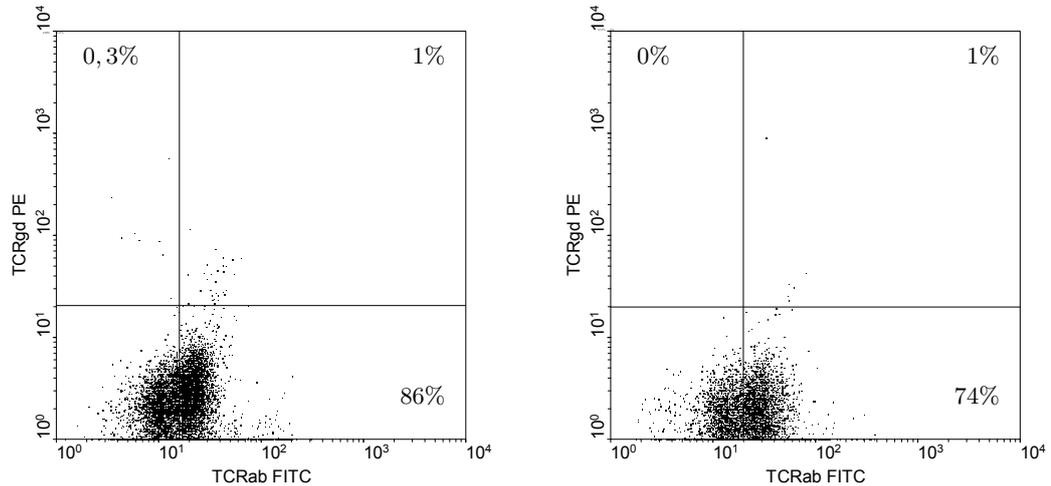
### 4.2.3 Lymphozyten in der Leber drei Monate alter Mäuse

Zellen in der Leber	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]			relativ [%]		
	$IL-7^{+/+}$	$IL-7^{-/-}$	$p$	$IL-7^{+/+}$	$IL-7^{-/-}$	$p$
$TCR\alpha\beta^+$	$3670 \pm 3730$	$4285 \pm 3370$	0,7013	83,3	72,8	0,2778
$TCR\gamma\delta^+$	$7 \pm 6$	$0 \pm 0$	0,0416*	0,2	0	0,0013*
Reife $CD4$	$129 \pm 80$	$56 \pm 41$	0,1069	4,8	1,0	0,0189*
naive	$33 \pm 32$	$10 \pm 6$	0,1588	0,9	0,2	0,0050*
Gedächtnis	$96 \pm 49$	$45 \pm 37$	0,1009	3,8	0,8	0,0251*
Reife $CD8$	$60 \pm 46$	$87 \pm 62$	0,4553	2,0	1,5	0,4191
naive	$49 \pm 39$	$59 \pm 50$	0,7330	1,6	0,9	0,1825
Gedächtnis	$10 \pm 7$	$278 \pm 14$	0,0424*	0,4	0,6	0,1387
DN-T-Zellen	$1635 \pm 1796$	$4013 \pm 3248$	0,1899	65,4	67,4	0,9138
Reife B-Zellen	$167 \pm 126$	$14 \pm 16$	0,0273*	6,4	0,3	0,0383*
NK-like T-Zellen	$58 \pm 21$	$88 \pm 42$	0,0081*	2,5	0,3	0,3468
Reife NK-Zellen	$95 \pm 61$	$103 \pm 60$	0,8406	3,4	2,3	0,8590
Lymphozyten	5339	5478	0,9695	13,8	17,0	0,4996

Tabelle 4.6: Lymphozytensubpopulationen in der Leber drei Monate alter Mäuse bei  $IL-7^{+/+}$  und  $IL-7^{-/-}$ .

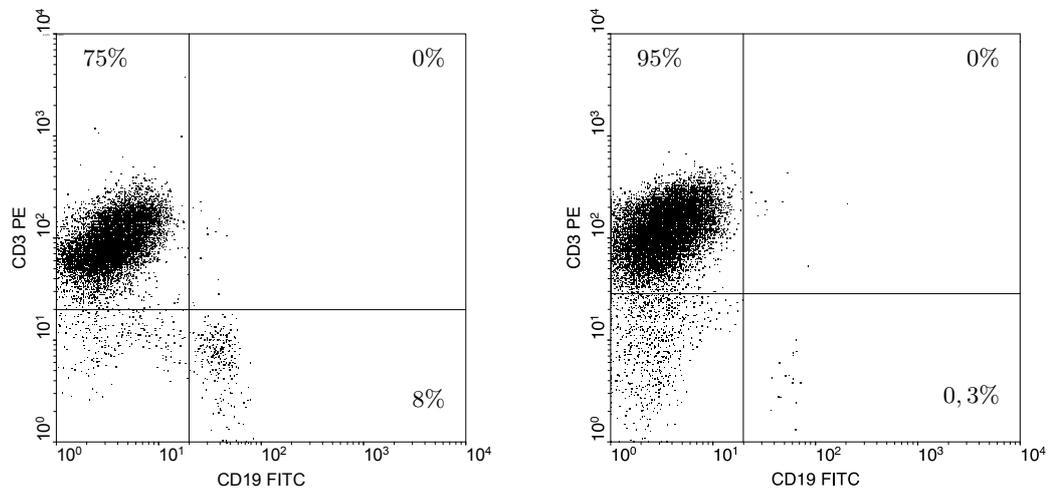
In der Leber zeigt sich eine geringe Zunahme der Gesamtlymphozytenzahl, der  $TCR\alpha\beta^+$  T-Zellen, Gedächtnis- $CD8^-$ , B-Vorläufer-, NK-like und reifen NK-Zellen beim  $IL-7^{-/-}$  Typ. Das Verhältnis  $CD4^+/CD8^+$  verschiebt sich zugunsten der  $CD8^-$  Zellpopulation von etwa 2:1 zu 1:1,5. Bei Betrachtung der T-Zellpopulationen in der Leber zeigt sich sowohl eine Reduktion der Anzahl der reifen  $CD4^+$ -Zellen als auch der Anzahl der naiven und Gedächtnis- $CD4^+$  Zellen in Abwesenheit von IL-7. Hingegen

beobachtet man eine Zunahme der reifen  $CD8^+$ -Zellen und auch eine Zunahme der naiven und Gedächtnis- $CD8^+$ -Zellen. Nicht nur für die Leber sondern auch für Milz und Lunge gilt, dass bei  $IL-7^{-/-}$  Mäusen keine  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen gemessen werden können. Exemplarisch haben wir eine Abbildung der untersuchten Lymphozyten aus der Leber dargestellt (Abbildung 4.6). Auch die Anzahl der reifen  $CD19^+$  B Zellen ist signifikant niedriger.



(a)  $TCR\gamma\delta^+$ -Zellen der Leber 3m alter WT-Mäuse (b)  $TCR\gamma\delta^+$ -Zellen der Leber 3m alter ko-Mäuse

Abbildung 4.6: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Leber im Alter von 3 Monaten von  $TCR\alpha\beta^+$  T-Zellen und  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen. Der linke obere Quadrant zeigt die  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen.



(a)  $CD19^+$  Zellen der Leber 3m alter WT-Mäuse (b)  $CD19^+$  Zellen der Leber 3m alter ko-Mäuse

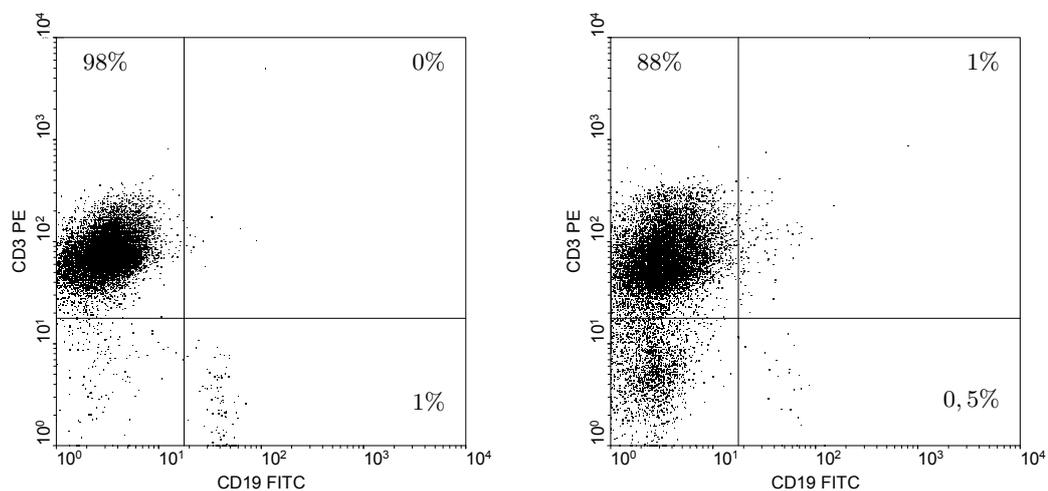
Abbildung 4.7: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des Leber im Alter von drei Monaten. Der rechte untere Quadrant zeigt die  $CD19^+$  B-Zellen. Im Vergleich zum Wildtyp werden bei  $IL-7^{-/-}$  keine  $CD3^+$  T-Zellen gemessen.

### 4.2.4 Lymphozyten in der Leber einjähriger Mäuse

Zellen in der Leber	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]			relativ [%]		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>
TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	12924 ± 6923	7136 ± 4301	0,1509	77,6	94,1	0,0019*
TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>	44 ± 32	0 ± 0	0,0148*	0,4	0,0	0,0439*
Reife CD4	378 ± 234	203 ± 76	0,1494	2,6	3,1	0,5319
Reife CD8	300 ± 152	817 ± 871	0,2278	2,1	12,8	0,2070
DN-T-Zellen	11944 ± 6412	6249 ± 4037	0,1314	71,8	81,1	0,3283
Reife B-Zellen	766 ± 465	58 ± 35	0,0094*	6,9	0,8	0,0537
NK-like T-Zellen	212 ± 179	218 ± 180	0,9598	1,2	2,9	0,1220
Reife NK-Zellen	296 ± 250	204 ± 156	0,5055	1,8	2,6	0,1657
Lymphozyten	16370	7513	0,0626	18,9	20,4	0,7626

Tabelle 4.7: Lymphozytensubpopulationen in der Leber einjähriger Mäuse bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>.

In der Leber der 12 Monate alten Mäuse findet sich eine Reduktion der Gesamtlymphozytenzahl bei IL-7<sup>-/-</sup> im Vergleich zu IL-7<sup>+/+</sup>. Eine signifikante Reduktion der reifen B-Zellen (Abbildungen 4.8(a), 4.8(b)), ebenso eine Reduktion der reifen T-Zellen und B-Vorläuferzellen ist bei den IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen zu sehen. TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen werden bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen nicht gefunden. Bei den T-Zellen fällt neben der Reduktion der reifen T-Zellen auch eine kleinere Population der reifen CD4<sup>+</sup>-Zellen auf, aber die Anzahl der reifen CD8<sup>+</sup> Zellen ist höher als beim Wildtyp. In den CD4<sup>+</sup> und CD8 Subpopulationen bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und ko-Mäusen.



(a) CD19<sup>+</sup>-Zellen in der Leber 12m alter WT-Mäuse (b) CD19<sup>+</sup>-Zellen in der Leber 12m alter ko-Mäuse

Abbildung 4.8: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Leber im Alter von 12 Monaten bzgl. CD19. Der rechte untere Quadrant zeigt die reifen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>).

#### 4.2.4.1 Alterseffekte der Lymphozytensubpopulationen in der Leber bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>

In Abbildungen 4.9, 4.10 und 4.11 sind die Lymphozytensubpopulationen in der Leber dargestellt, deren Anzahl bei einjährigen Mäusen signifikant höher ist als bei denen im Alter von drei Monaten. Sowohl bei den Wildtyp, als auch bei den ko-Mäusen nimmt die Anzahl der Lymphozyten insgesamt im Alter von 12 Monaten im Vergleich zum Alter von drei Monaten zu (Tabellen 4.6, 4.7).

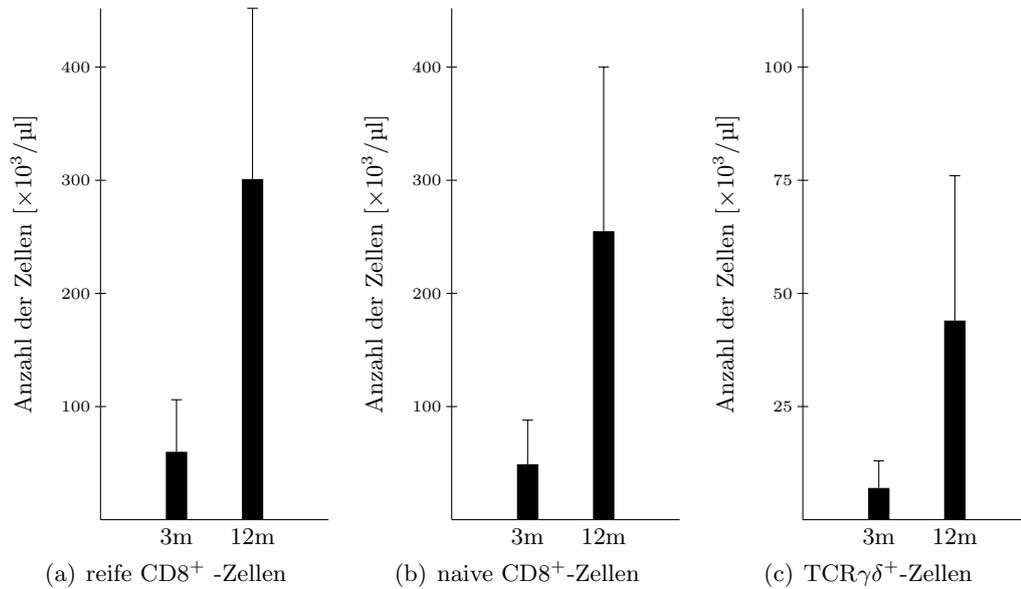


Abbildung 4.9: Dargestellt sind die Anzahl der Lymphozyten im Vergleich zwischen drei und 12 Monaten reifer CD8<sup>+</sup>, TCR $\gamma\delta^+$  und naiver CD8<sup>+</sup> Lymphozyten der Leber bei IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen. Es findet eine signifikante altersabhängige Expansion der Lymphozytensubpopulationen der Leber statt. ( $p_{\text{reife CD8}^+} = 0,0096$ ;  $p_{\text{TCR}\gamma\delta^+} = 0,0350$ ;  $p_{\text{naive CD8}^+} = 0,0155$ )

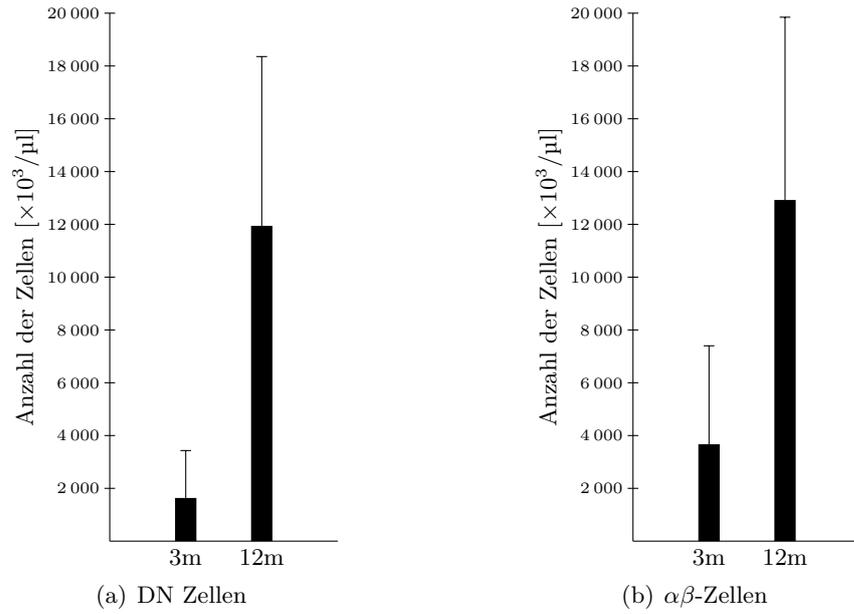


Abbildung 4.10: Dargestellt sind im Vergleich die signifikanten altersabhängigen Unterschiede der Anzahl DN- ( $p = 0,0085$ ) und reifer  $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten der Leber bei IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen. ( $p_{\text{DN}} = 0,0085$ ;  $p_{\alpha\beta} = 0,0373$ )

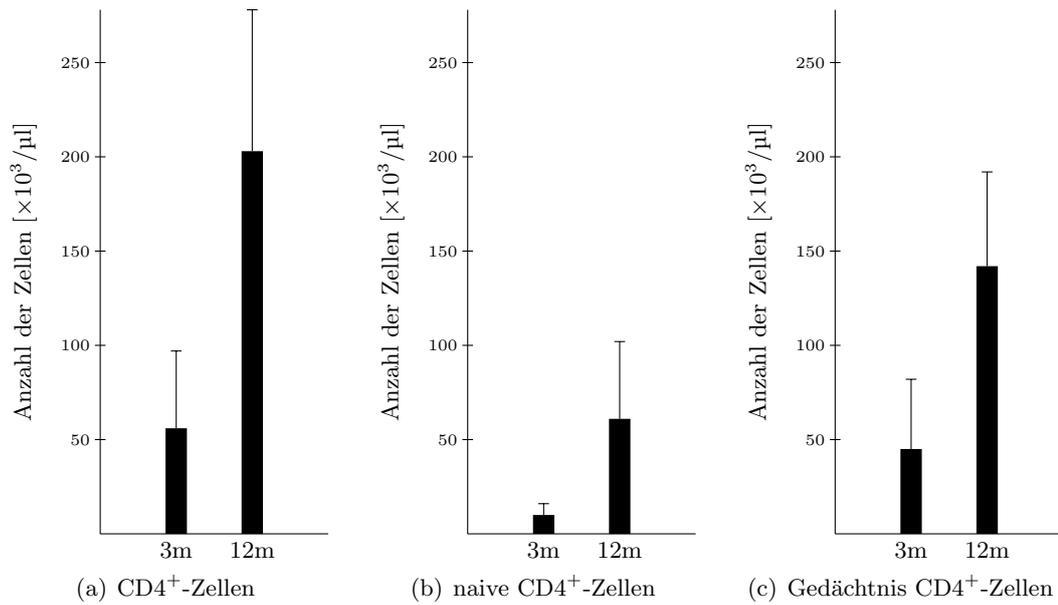


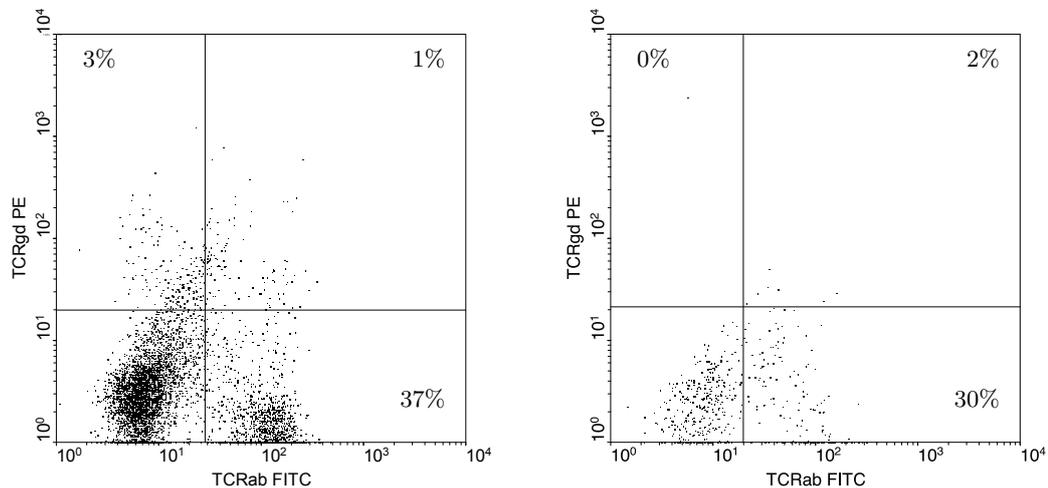
Abbildung 4.11: Dargestellt sind im Vergleich die Anzahl der altersabhängigen signifikanten Unterschiede der CD4-Subpopulationen in der Leber bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen. ( $p_{\text{reife CD4}^+} = 0,0051$ ;  $p_{\text{naive CD4}^+} = 0,0252$ ;  $p_{\text{Gedächtnis CD4}^+} = 0,0084$ )

### 4.2.5 Lymphozyten in der Milz drei Monate alter Mäuse

Zellen in der Milz	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]			relativ [%]		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>
TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	33723 ± 19910	2049 ± 1103	0,0075*	35,0	26,0	0,0031*
TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>	1841 ± 677	18 ± 16	0,0004*	3,1	0,2	0,0297*
Reife CD4	19411 ± 10598	999 ± 577	0,0047*	21,0	12,6	0,0157*
naive	4563 ± 3175	209 ± 140	0,0155*	4,8	2,5	0,0474*
Gedächtnis	14847 ± 7546	789 ± 440	0,0032*	16,2	10,0	0,0122*
Reife CD8	11389 ± 6862	696 ± 400	0,0083*	12,2	8,8	0,0846
naive	10284 ± 7015	353 ± 202	0,0133*	11,1	4,4	0,0240*
Gedächtnis	1169 ± 1217	346 ± 221	0,1747	1,2	4,2	0,0020*
DN-T-Zellen	1614 ± 783	612 ± 389	0,0336*	1,7	7,7	0,0015*
B-Vorläuferzellen	5038 ± 8145	1133 ± 361	0,3154	4,2	15,9	0,0044*
Naive B-Zellen	2653 ± 891	567 ± 373	0,0013*	3,1	7,1	0,0279*
Reife B-Zellen	45970 ± 23066	1617 ± 1351	0,0026*	49,0	17,6	0,00002*
NK-like T-Zellen	668 ± 290	46 ± 41	0,0036*	0,8	1,9	0,0898
Reife NK-Zellen	4340 ± 2347	1494 ± 567	0,0299*	4,6	21	0,0010*
Lymphozyten	94252	8030	0,0040*	64,6	41,3	0,00004*

Tabelle 4.8: Lymphozyten in der Milz drei Monate alter Mäuse bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>.

Die Anzahl der Lymphozyten in der Milz ist bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen auf etwa ein Zehntel reduziert. Ebenso signifikant reduziert ist jeweils die Anzahl der Lymphozyten aller untersuchten Subpopulationen.

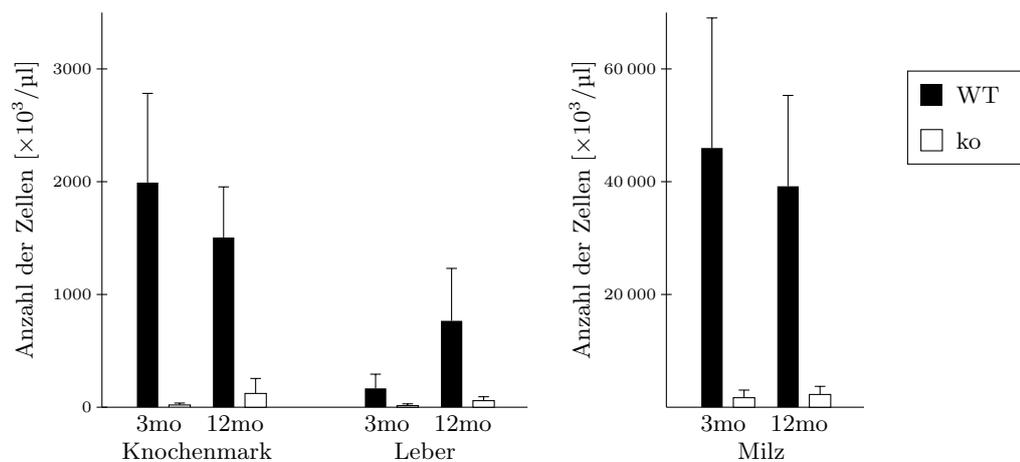


(a) TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen der Milz 3m alter WT-Mäuse (b) TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen der Milz 3m alter ko-Mäuse

Abbildung 4.12: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Milz im Alter von 3 Monaten. Der linke obere Quadrant zeigt die TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>T-Zellen, der rechte untere Quadrant die TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>T-Zellen.

## 4.2.6 Lymphozyten in der Milz einjähriger Mäuse

Zellen in der Milz	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]			relativ [%]		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>
TCR $\alpha\beta^+$	20781 $\pm$ 4472	3441 $\pm$ 1089	0,00003*	31,9	33,6	0,7710
TCR $\gamma\delta^+$	1636 $\pm$ 804	3 $\pm$ 6	0,0085*	2,5	2	0,7730
Reife CD4	11599 $\pm$ 2485	1260 $\pm$ 376	0,00002*	17,8	12,4	0,0375*
naive	2229 $\pm$ 1057	564 $\pm$ 242	0,0089*	3,5	5,3	0,1486
Gedächtnis	9363 $\pm$ 2018	696 $\pm$ 327	0,00001*	14,3	7,1	0,0049*
Reife CD8	7221 $\pm$ 2108	1705 $\pm$ 865	0,0006*	11,1	16,2	0,2137
naive	6494 $\pm$ 2472	549 $\pm$ 247	0,0007*	9,8	5,1	0,0118*
Gedächtnis	737 $\pm$ 475	1111 $\pm$ 822	0,4033	1,3	10,7	0,0312*
DN-T-Zellen	1982 $\pm$ 661	1143 $\pm$ 739	0,0951	3,3	10,6	0,0204*
B-Vorläuferzellen	1501 $\pm$ 717	1413 $\pm$ 264	0,8036	2,4	13,9	0,0002*
Naive B-Zellen	1589 $\pm$ 493	779 $\pm$ 486	0,0309*	2,6	9,4	0,4116
Reife B-Zellen	39185 $\pm$ 16115	2260 $\pm$ 1440	0,0009*	56,9	21,1	0,0004*
NK-like T-Zellen	712 $\pm$ 151	373 $\pm$ 419	0,1272	1,2	3,3	0,1785
Reife NK-Zellen	2221 $\pm$ 429	1283 $\pm$ 900	0,0686	3,6	11,8	0,0290*
Lymphozyten	66878	10483	0,0003*	63,5	33,0	0,0004*

 Tabelle 4.9: Lymphozyten in der Milz einjähriger Mäuse bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>.

 Abbildung 4.13: Darstellung der Anzahl der reifen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) bei WT- und ko-Mäusen im Alter von drei und 12 Monaten. Im Knochenmark, in der Leber und in der Milz ist die Anzahl der reifen B-Zellen bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen sowohl im Alter von drei, als auch im Alter von 12 Monaten signifikant erniedrigt.

Im Vergleich zum Alter von drei Monaten hat im Alter von 12 Monaten die Zahl der Lymphozyten bei IL-7<sup>+/+</sup> und bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen abgenommen. Auch im Alter von 12 Monaten findet man eine signifikante Lymphopenie mit einer Reduktion

der Lymphozyten auf ein Drittel bei  $IL-7^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Im weiteren fällt eine signifikant niedrigere Zellzahl der reifen  $TCR\alpha\beta^+$  T-Zellen,  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen ( $p = 0,0085$ ), naiven und reifen B-Zellen, reifen, naiven und Gedächtnis- $CD4^+$  und reifen- und naiven- $CD8^+$  Zellen auf (Abbildung 4.16 bis Abbildung 4.19).

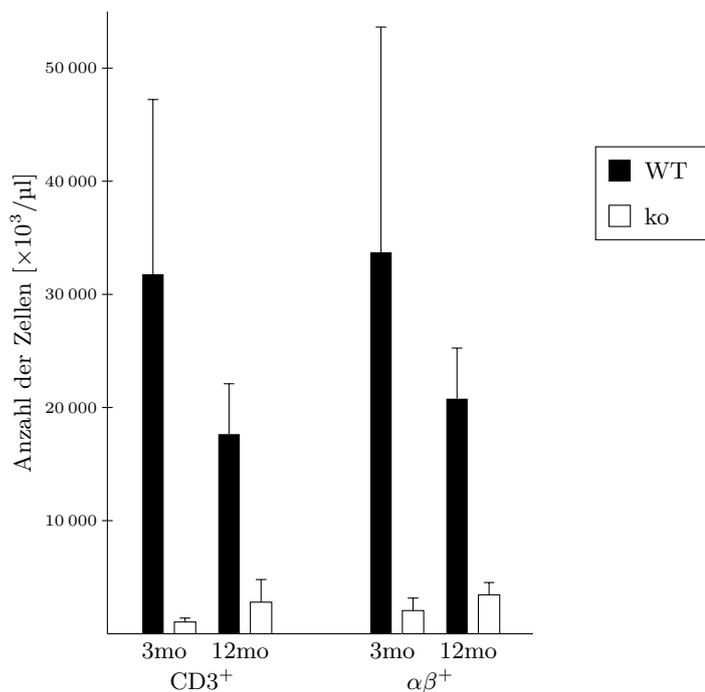
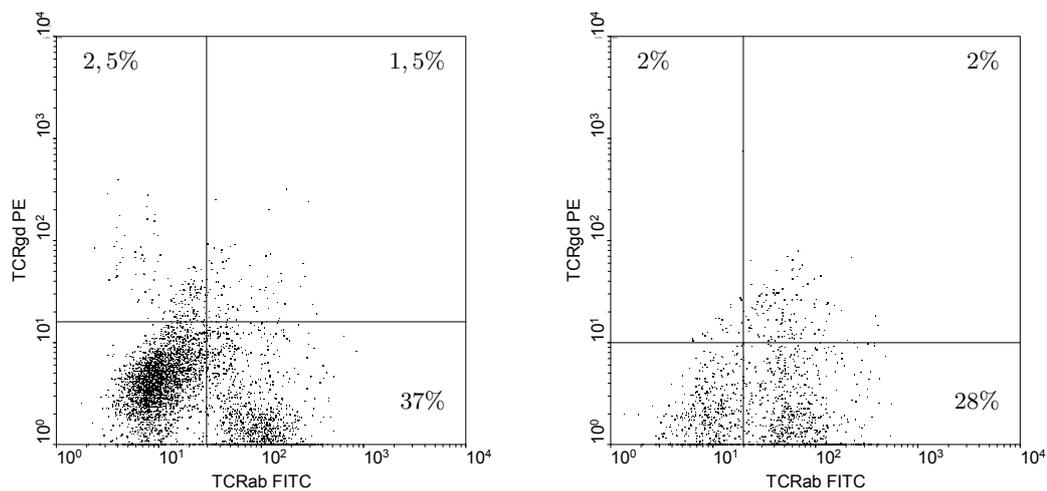


Abbildung 4.14: Darstellung der Anzahl der  $CD3^+$  und  $\alpha\beta^+$  Lymphozyten in der Milz bei Wildtyp- und ko-Mäusen im Alter von drei und 12 Monaten. Die Anzahl der  $CD3$  und  $\alpha\beta$  T-Zellen ist in der Milz der  $IL-7^{-/-}$  Mäuse signifikant erniedrigt.



(a)  $TCR\gamma\delta^+$ -Zellen der Milz 12m alter WT-Mäuse (b)  $TCR\gamma\delta^+$ -Zellen der Milz 12m alter ko-Mäuse

Abbildung 4.15: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Milz im Alter von 12 Monaten bzgl.  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$ . Der linke obere Quadrant zeigt die  $TCR\gamma\delta^+$  T-Zellen.

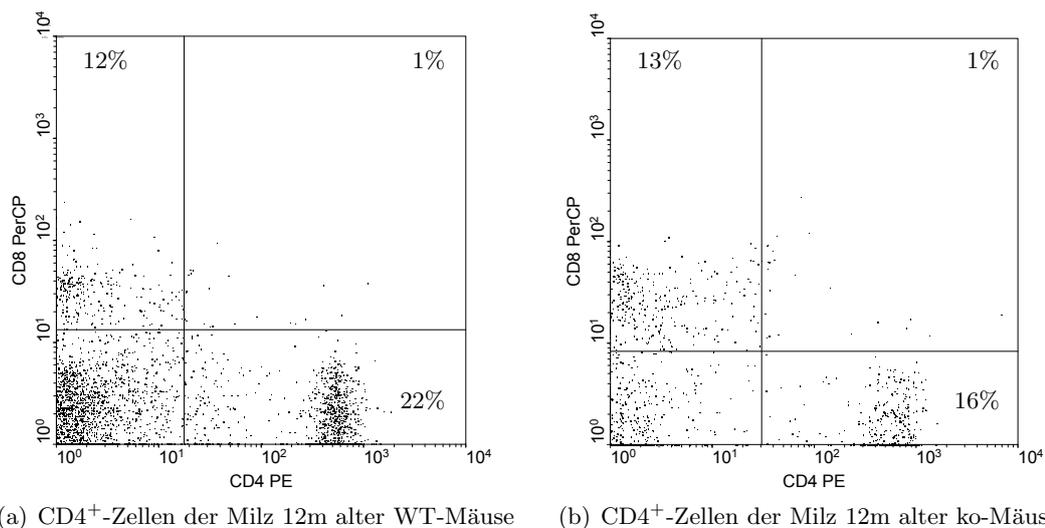


Abbildung 4.16: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Milz im Alter von 12 Monaten bzgl. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten. Der rechte untere Quadrant zeigt die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

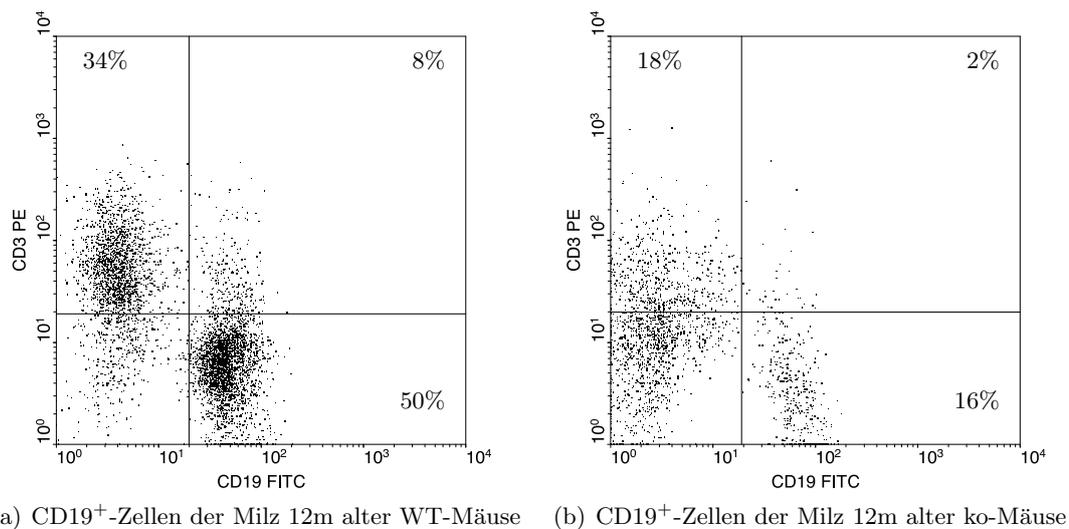
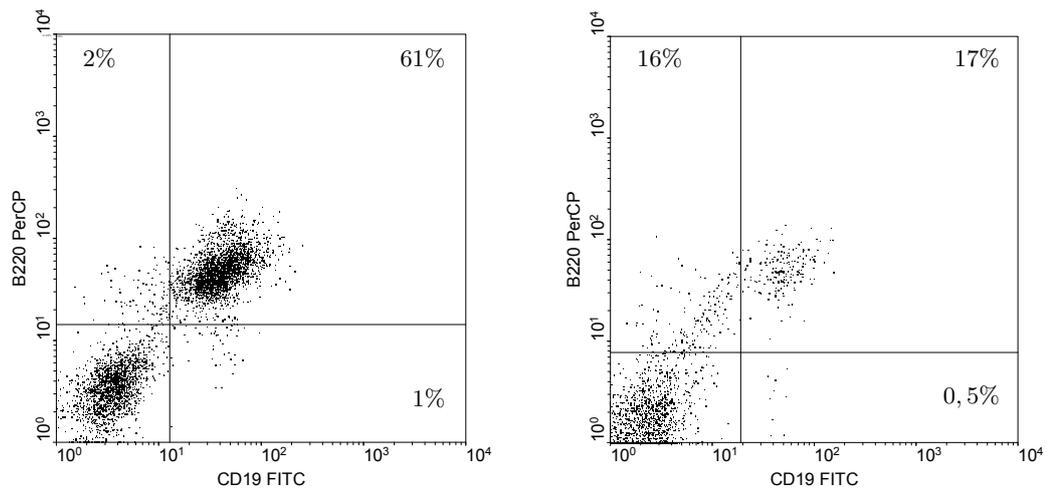


Abbildung 4.17: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Milz im Alter von 12 Monaten bzgl. CD19. Der rechte untere Quadrant zeigt die reifen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>).



(a) unreife B-Zellen Milz der Milz einjähriger IL-7<sup>+/+</sup> 12 Monate Mäuse (b) unreife B-Zellen Milz der Milz einjähriger IL-7<sup>-/-</sup> 12 Monate Mäuse

Abbildung 4.18: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Milz im Alter von 12 Monaten bzgl. CD19 und B220. Der linke obere Quadrant zeigt die unreifen B-Zellen (B220<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>).

#### 4.2.7 Lymphozyten in der Lunge drei Monate alter Mäuse

Die Gesamtlymphozytenpopulationen in der Lunge drei Monate alter Tiere sind bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen gleich groß. Die Anzahl der reifen B-Zellen ist bei Fehlen von IL-7 vermindert, TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen können gar nicht gemessen werden. NK-Zellen und DN-T-Zellen sind in etwa gleicher Zahl zu messen. Eine Zunahme gegenüber dem Wildtyp beobachtet man in der Population der unreifen B-Zellen. Signifikante Unterschiede der Lymphozytensubpopulationen in der Lunge im Alter von drei Monaten zwischen Wildtyp und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen bestehen nicht.

#### 4.2.8 Lymphozyten in der Lunge einjähriger Mäuse

In der Lunge zeigt sich bei einjährigen IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen ein Fehlen von TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen, sowie eine Reduktion der unreifen und reifen B-Zellen. Die Anzahl der DN T-Zellen ist bei IL-7<sup>-/-</sup> höher als beim Wildtyp-Mäusen, ebenso wie die Zahl der reifen NK-Zellen. Bei den reifen CD4<sup>+</sup> Zellen lässt sich kein Unterschied zwischen IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen feststellen. Signifikante Unterschiede der Lymphozytensubpopulationen zwischen einjährigen Wildtyp- und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen bestehen nicht.

#### 4.2.9 Lymphozyten im Darm drei Monate alter Mäuse

Auffallend im Darm ist die sehr stark variierende Anzahl Lymphozyten, was sowohl IL-7<sup>+/+</sup> als auch IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse betrifft (Abbildung 4.19).

Im Darm der drei Monate alten Population zeigt sich eine Zunahme der Anzahl sowohl der Lymphozyten insgesamt, als auch der  $\alpha\beta$  T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen

Zellen im Darm	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]			relativ [%]		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>
TCR $\alpha\beta^+$	243 $\pm$ 135	1891 $\pm$ 2328	0,1527	28,0	78,8	0,0016*
TCR $\gamma\delta^+$	138 $\pm$ 122	3 $\pm$ 4	0,0371*	10,9	0,1	0,0363*
Reife B-Zellen	561 $\pm$ 900	28 $\pm$ 24	0,2217	30,7	1,6	0,0448*
B-Vorläuferzellen	120 $\pm$ 75	199 $\pm$ 341	0,6284	17,5	5,6	0,3216
NK T-Zellen	41 $\pm$ 63	106 $\pm$ 119	0,9246	3,3	1,0	0,2116
Reife NK-Zellen	48 $\pm$ 70	53 $\pm$ 71	0,9150	3,3	1,0	0,4175
Lymphozyten	1314	2416	0,4662	15,0	12,9	0,5979

 Tabelle 4.10: Lymphozyten im Darm drei Monate alter Mäuse bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>.

und DN T-Zellen. Auch die Anzahl der reifen B-Zellen ist erhöht gegenüber den WT-Mäusen. Eine signifikante Abnahme der Zellzahl bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen ist in der Population der  $\gamma\delta$ T-Zellen zu beobachten ( $p = 0,0371$ ). Während sowohl die Anzahl der naiven CD4<sup>+</sup> als auch der naiven und Gedächtnis CD8<sup>+</sup> Lymphozyten zunimmt, sinkt die Anzahl der Gedächtnis CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Vergleicht man die relativen Anteile der Lymphozytensubpopulationen von IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Darm, so ist festzuhalten, dass in Abwesenheit von IL-7 die Anteile der reifen und naiven CD4<sup>+</sup> Zellen, TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen und reifen B-Zellen signifikant erniedrigt, die der reifen und naiven CD8<sup>+</sup> Zellen und TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen dagegen signifikant erhöht sind.

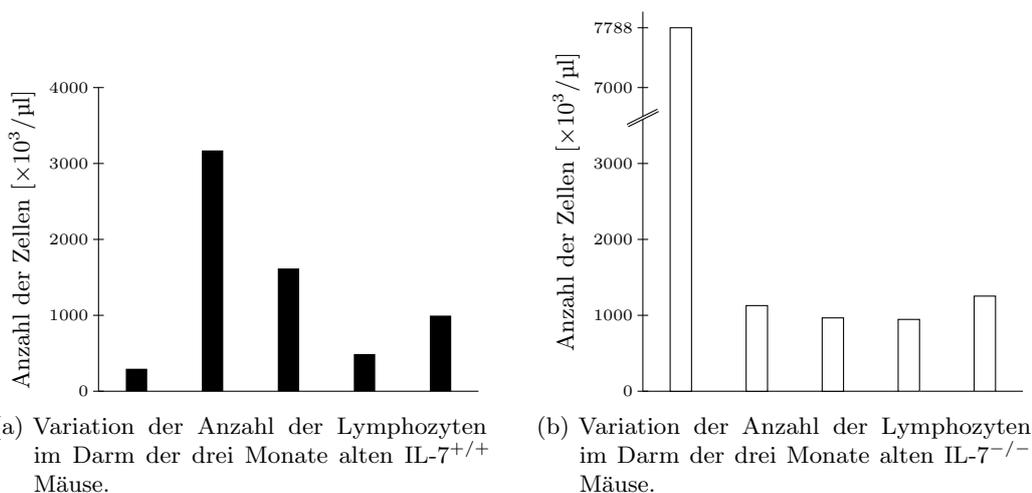
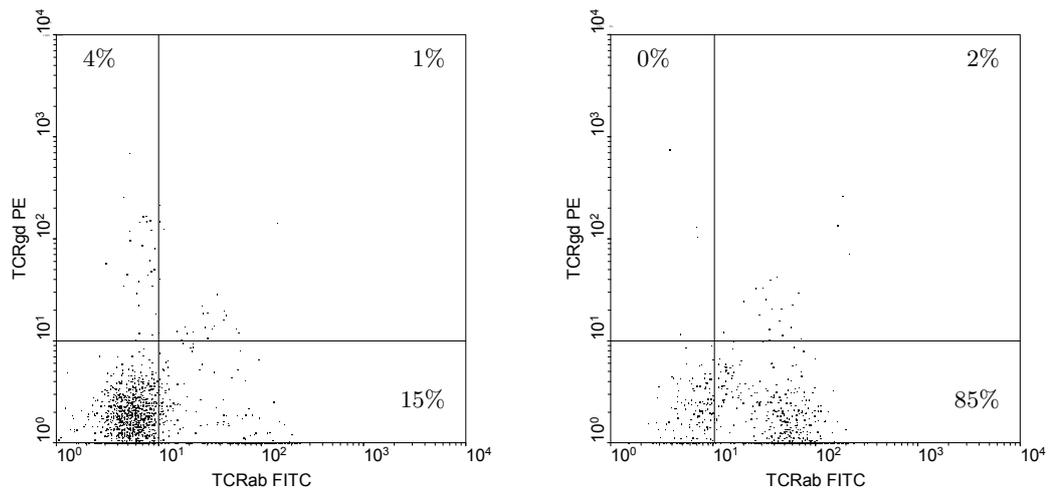


Abbildung 4.19

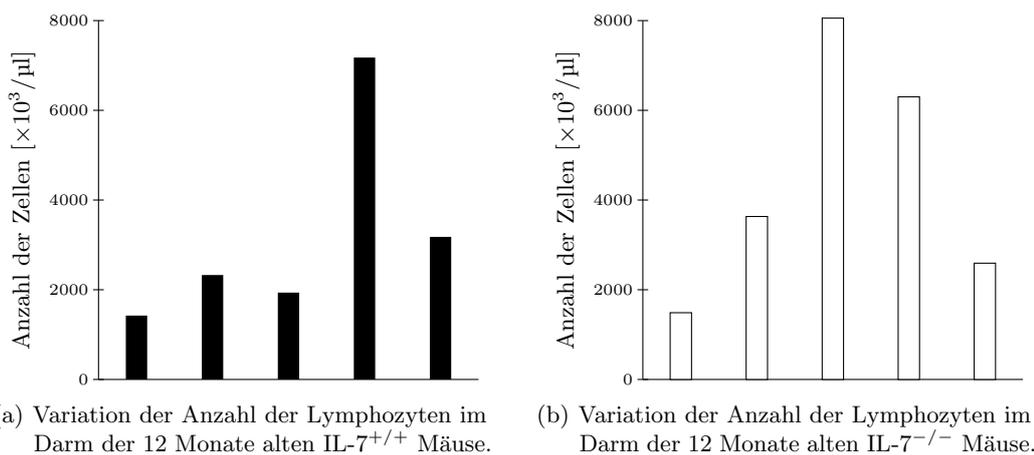


(a) TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen im Darm 3m alter WT-Mäuse (b) TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen im Darm 3m alter ko-Mäuse

Abbildung 4.20: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des Darms im Lebensalter drei Monate bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>. Der linke obere Quadrant zeigt die TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen. Diese sind bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erniedrigt. Der rechte untere Quadrant zeigt  $\alpha\beta$ -T-Zellen, diese sind bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen expandiert.

#### 4.2.10 Lymphozyten im Darm einjähriger Mäuse

Im Darm der 12 Monate alten Mäuse findet sich eine geringe Zunahme der Anzahl der Lymphozyten insgesamt in Abwesenheit von IL-7. Wie schon im Alter von drei Monaten variiert die Anzahl der aus dem Darm gewonnenen Lymphozyten untereinander erheblich (Abbildung 4.22). Signifikant reduziert ist die Anzahl der TCR $\gamma\delta^+$  und reifen CD19<sup>+</sup> B-Zellen (Abbildungen 4.22(a), 4.22(b), 4.23(a), 4.23(b)). Unreife B-Zellen, naive B-Zellen, TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen, CD8<sup>+</sup> Zellen, DN T-Zellen und NK Zellen sind in



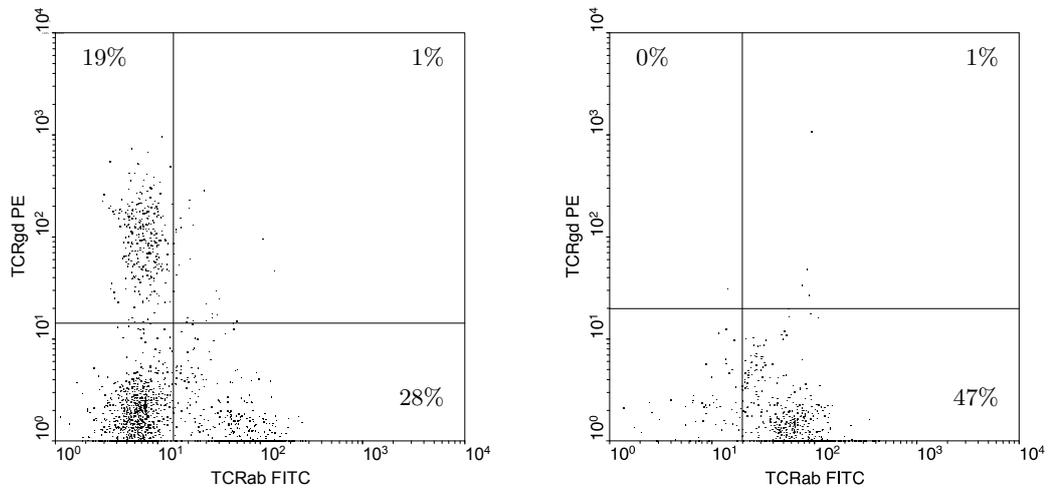
(a) Variation der Anzahl der Lymphozyten im Darm der 12 Monate alten IL-7<sup>+/+</sup> Mäuse.

(b) Variation der Anzahl der Lymphozyten im Darm der 12 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse.

Abbildung 4.21

Zellen im Darm	absolut [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]			relativ [%]		
	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>	IL-7 <sup>+/+</sup>	IL-7 <sup>-/-</sup>	<i>p</i>
TCR $\alpha\beta^+$	1072 $\pm$ 844	3063 $\pm$ 2113	0,0861	32,6	70,4	0,0011*
TCR $\gamma\delta^+$	623 $\pm$ 480	16 $\pm$ 19	0,0222*	18,6	0,3	0,0000*
Reife B-Zellen	810 $\pm$ 528	31 $\pm$ 29	0,0109*	27,3	0,6	0,0013*
B-Vorläuferzellen	250 $\pm$ 235	1027 $\pm$ 842	0,0821	7,2	33,8	0,0884
NK-like T-Zellen	14 $\pm$ 8	63 $\pm$ 91	0,2670	0,6	1,2	0,3128
Reife NK-Zellen	31 $\pm$ 14	73 $\pm$ 87	0,3272	0,6	1,2	0,5670
Lymphozyten	3209	4414	0,4705	15,8	15,3	0,9109

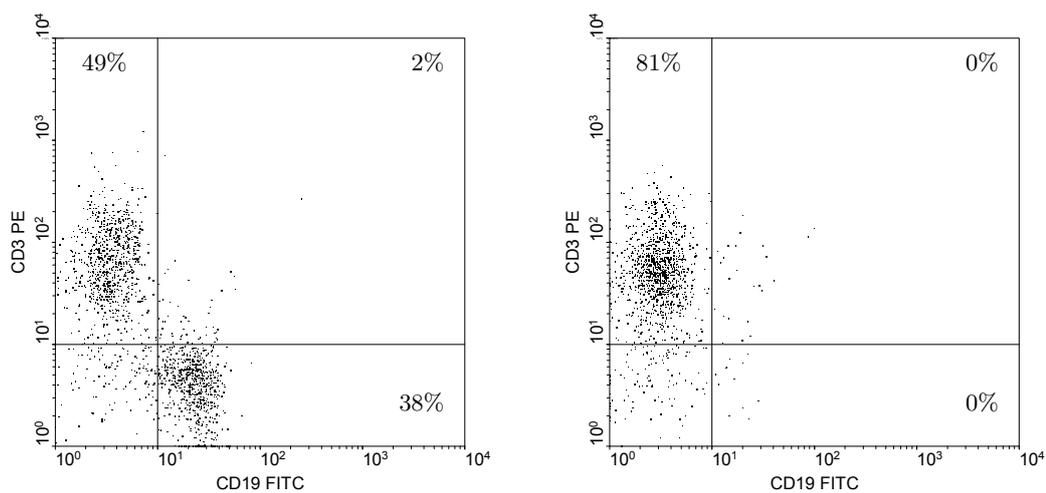
Tabelle 4.11: Lymphozyten im Darm einjähriger Mäuse bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup>.



(a) TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen im Darm 12m alter WT-Mäuse (b) TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen im Darm 12m alter ko-Mäuse

Abbildung 4.22: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des Darms einjähriger Mäuse. Der linke obere Quadrant zeigt die TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen.

größerer Anzahl als in Anwesenheit von IL-7 vorhanden.



(a) CD19<sup>+</sup> B-Zellen im Darm 12m alter IL-7<sup>+/+</sup> Mäuse (b) CD19<sup>+</sup> B-Zellen im Darm 12m alter IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse

Abbildung 4.23: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des Darms einjähriger Mäuse auf CD3 und CD19. Der rechte untere Quadrant zeigt die reifen B-Zellen.

### 4.2.11 Übersicht: Signifikante Unterschiede der Lymphozytensubpopulationen bei 3m und 12m alten IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen

Lokalisation	KM		Leber		Milz		Darm		Lunge	
Alter	3	12	3	12	3	12	3	12	3	12
$\alpha\beta$ T-Zellen					↓	↓				
$\gamma\delta$ T-Zellen	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓		
Reife CD4 naive Gedächtnis	↓				↓	↓				
Reife CD8 naive Gedächtnis	↓				↓	↓				↓
DN-T-Zellen	↓				↓			↓		
B-Vorläuferzellen										
naive B-Zellen	↓	↓			↓	↓				
reife B-Zellen	↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓		
reife NK-Zellen	↓				↓					
NK-like T-Zellen	↓		↓		↓					↓

Tabelle 4.12: Übersicht der signifikant unterschiedlichen Absolutwerte

Lokalisation Alter	KM		Leber		Milz		Darm		Lunge	
	3	12	3	12	3	12	3	12	3	12
$\alpha\beta$ T-Zellen				↑	↓		↑	↑		
$\gamma\delta$ T-Zellen			↓	↓	↓		↓	↓		
reife CD4		↑	↓		↓	↓	↓	↓		↓
naive	↓	↑	↓		↓					
Gedächtnis			↓		↓	↓	↓	↓		
reife CD8	↓				↓		↓			
naive	↓				↓	↓	↓			↓
Gedächtnis					↑	↑				↓
DN T-Zellen					↓	↑				
B-Vorläuferzellen		↑			↓	↑				↓
naive B-Zellen					↓		↓			
reife B-Zellen	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓		
reife NK Zellen					↑	↑				
NK-like T-Zellen	↓									

Tabelle 4.13: Übersicht der signifikant unterschiedlichen prozentualen Anteile

## 4.3 Immunhistochemie

Nach Abschluss der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten kryokonservierter Organe durchgeführt. Zunächst sollte anhand von Doppelfärbungen das Verhältnis von verschiedenen Lymphozytenpopulationen, z.B. T- und B-Zellen,  $\text{TCR}\alpha\beta$  sowie  $\text{TCR}\gamma\delta$  T-Zellen,  $\text{TCR}\alpha\beta$  und CD4 und  $\text{TCR}\alpha\beta$  und CD8 zusätzlich zu den in der Durchflusszytometrie gemessenen Zahlen dargestellt werden. Hier ergab sich jedoch das Problem, dass sich die Gewebe unspezifisch anfärbten und die Doppelfärbungen nicht gut auswertbar waren. Somit wurden Einzelfärbungen durchgeführt, bei denen weniger unspezifische Reaktionen mit dem Gewebe auftraten.

### 4.3.1 Einzelfärbungen

Im weiteren wurden Einzelfärbungen an den Gewebeschnitten der kryokonservierten Organe durchgeführt. Die Kryokonservierung hat den Nachteil, dass oft die Gewebestruktur durch die Technik des Färbens und teilweise auch schon bei der Herstellung der Gewebeschnitte leidet. Diese Methode wurde dennoch gewählt, da mehr Oberflächenmarker markiert werden und somit die Lymphozytensubpopulationen, die in der Durchflusszytometrie gemessen worden sind, in den Mausorganen dargestellt werden konnten. Hierbei wurden ausschließlich Antikörper verwendet, die nach Herstellerangaben für diese Methode geeignet waren. Eine Farbreaktion erfolgte mit dem roten Farbstoff AEC. Um auch das Gewebe darzustellen bzw. einen Farbkontrast zu erlangen, wurde anschließend eine Gegenfärbung mit dem blauen Farbstoff Hämatoxylin durchgeführt. An den jeweiligen Lymphozyten haben dann der primäre Antikörper und danach der AEC-Komplex gebunden. Durch einen Umsatz des Farbstoffkonzentrats durch den AEC-Komplex hat sich an diesen Zellen ein roter Niederschlag gebildet. Die übrigen Zellen sind durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau eingefärbt.

Zwar zeigt sich bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Lymphozyten aus dem Darm keine deutliche Reduktion der Gesamtlymphozytenzahl, im Gegenteil ist deren Anzahl sogar höher, jedoch ist nicht nur relativ, sondern auch absolut die Zahl der  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen im Darm von  $\text{IL-7}^{-/-}$  Mäusen signifikant niedriger. In beiden immunhistochemischen Präparaten des Darms, der Wildtyp- und ko-Maus, lassen sich  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen darstellen. In der Literatur ist eine immunhistochemische Untersuchung der  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen bisher nicht beschrieben. Auf den Aufnahmen ist unter anderem zu erkennen, dass die Gewebe das Schneiden auf dem Kryotom nicht immer ohne Schaden überstanden haben und auch die Methodik der Färbung dem Gewebe teilweise geschadet hat. Sowohl in der Wildtyp- als auch in der ko-Maus kommen im Dünndarm  $\text{CD19}^+$  Lymphozyten zur Darstellung, hier lässt sich das in etwa gleiche Verhältnis erkennen (Abbildungen 4.26, 4.27).

Schwieriger als der Darm war noch die Präparation der Leber, da sie ein eher weiches parenchymatöses Organ ist (Abbildungen 4.28, 4.29). In den dargestellten Schnitten sind neben vielen zerstörten Zellen auch wenige  $\text{CD19}^+$  Zellen dargestellt, die allerdings nicht eindeutig als dem Gewebe zugehörige Lymphozyten bezeichnet werden können.

Die Milz hingegen hat sich besser für die verwendete Technik geeignet. Hier zeigte

sich der typische Phänotyp der IL-7<sup>-/-</sup> Maus und der Unterschied zum Wildtyp am deutlichsten. So ließ sich schon durchflusszytometrisch eine signifikant niedrigere Anzahl reifer TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen messen, und auch in der Immunhistochemie lassen sich sichtbar weniger TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz der drei Monate alten ko-Mäuse darstellen (Abbildungen 4.30, 4.31). Die Färbung der TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz zeigte deutlich bessere Ergebnisse. In den Abbildung 4.32, 4.33 werden die Lymphozyten der Milz einer Wildtyp- und einer ko-Maus miteinander verglichen, wobei im Gewebe der ko-Maus keine TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Zellen zu finden sind. Leider lässt sich immunhistochemisch anhand der ausgewählten Bereiche nicht der signifikante Unterschied der CD19<sup>+</sup> Zellen in der Milz zwischen Wildtyp und IL-7<sup>-/-</sup> Maus erkennen, der durchflusszytometrisch gezeigt wurde (s.o.). CD19<sup>+</sup> Zellen kommen in der Milz der IL-7<sup>-/-</sup> Maus und IL-7<sup>+/+</sup> Maus zur Darstellung (Abbildungen 4.34, 4.35).

Bei einjährigen Wildtyp-Mäusen hat im Darm sowohl die Gesamtlymphozytenzahl als auch die Anzahl der TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Zellen zugenommen. Bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen hingegen ist keine Dynamik im Altersverlauf zu sehen. Die Zahl der TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen ist stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Im Alter von 3 Monaten sah man noch keinen Unterschied zwischen IL-7<sup>-/-</sup> und IL-7<sup>+/+</sup> was die CD19<sup>+</sup> Zellen im Darm betrifft. Bei einjährigen Mäusen hat die Zahl der CD19<sup>+</sup> Zellen im Darm beim Wildtyp zugenommen, bei IL-7<sup>-/-</sup> ist die Anzahl gegenüber im Alter von 3 Monaten und auch im Vergleich mit IL-7<sup>+/+</sup> signifikant niedriger.

Wie schon im Alter von drei Monaten lassen sich auch im Alter von einem Jahr in der Leber der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse keine TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmen. Die Gesamtlymphozyten und die TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen haben sich im Altersverlauf vermehrt. Die Gesamtlymphozytenzahl bei IL-7<sup>-/-</sup> ist im Alter von drei Monaten bzw. einem Jahr fast gleich. Der gesehene Trend setzt sich bei Betrachtung der CD19<sup>+</sup> Zellen der Leber fort. Durchflusszytometrisch konnte schon gezeigt werden, dass die reifen B-Zellen in geringerer Anzahl bei IL-7<sup>-/-</sup> vorkommen. In Abbildungen 4.40 und 4.41 sind die reifen CD19<sup>+</sup> B-Zellen rot gefärbt.

Wie schon im Alter von drei Monaten ist auch im Alter von einem Jahr die Anzahl der reifen CD19<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz der IL-7<sup>-/-</sup> signifikant niedriger als bei IL-7<sup>+/+</sup>. Während sich bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen die B-Zell-Population nicht weiter vergrößert, ist bei der IL-7<sup>+/+</sup> ein Zuwachs der Population der CD19<sup>+</sup> Zellen um ca. ein Drittel zu sehen (Abbildungen 4.8, 4.9). Die immunhistochemischen Färbungen bestätigen also die schon bereits durchflusszytometrisch gesehenen Unterschiede (Abbildung 4.43).

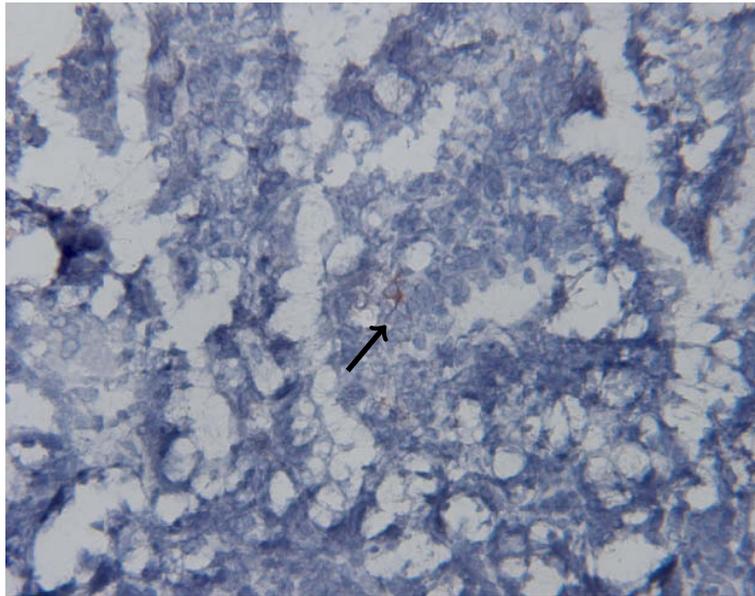


Abbildung 4.24: Gefrierschnitt des Dünndarms einer 3 Monate alten IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen (Pfeil) im Dünndarm, Vergrößerung 250-fach

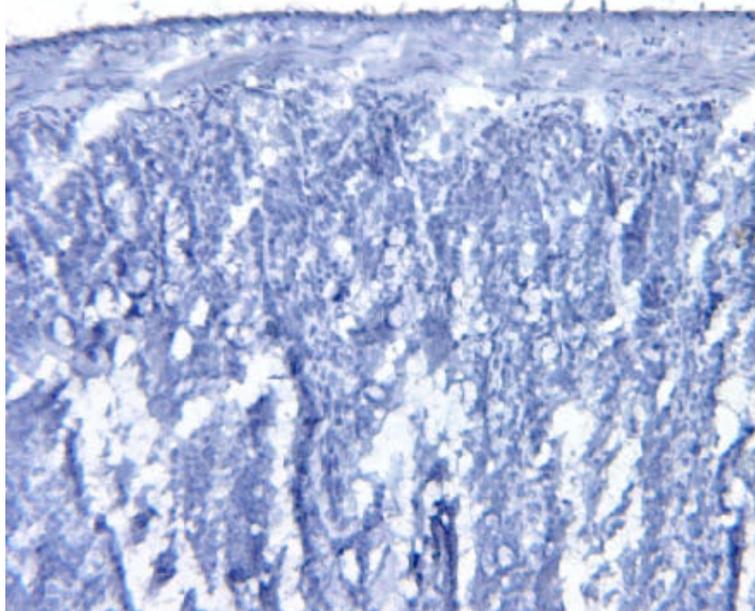


Abbildung 4.25: Gefrierschnitt des Dünndarms einer 3 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der TCR $\gamma\delta^+$ -Zellen (Pfeil) im Dünndarm, Vergrößerung 100-fach

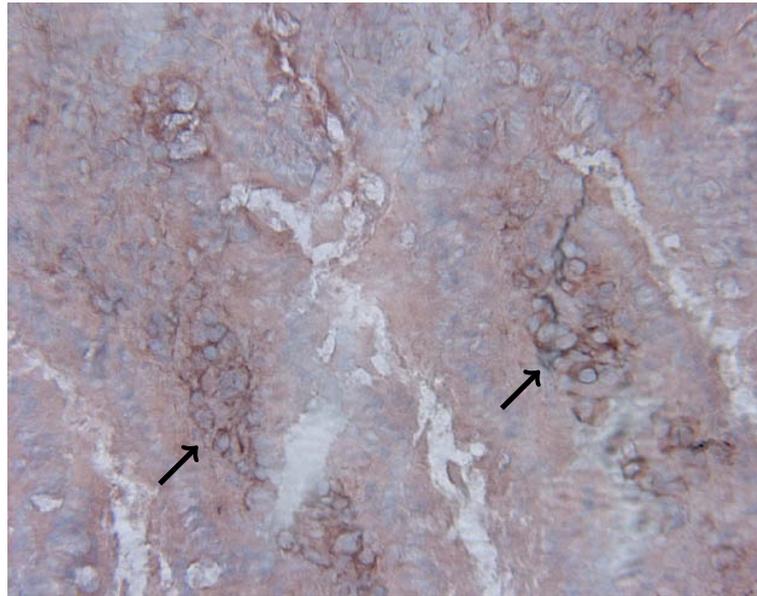


Abbildung 4.26: Gefrierschnitt des Dünndarms einer 3 Monate alten IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen im Darm, Vergrößerung 250-fach

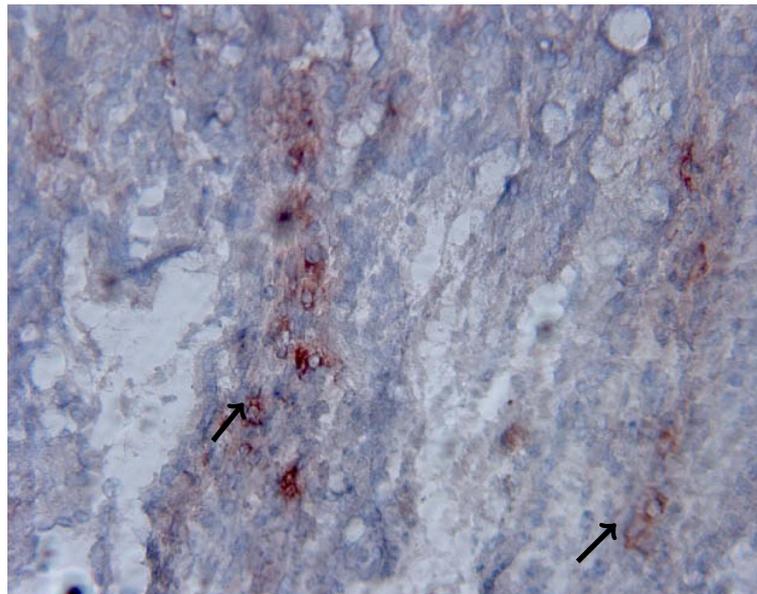


Abbildung 4.27: Gefrierschnitt des Dünndarms einer 3 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen im Darm, Vergrößerung 250-fach

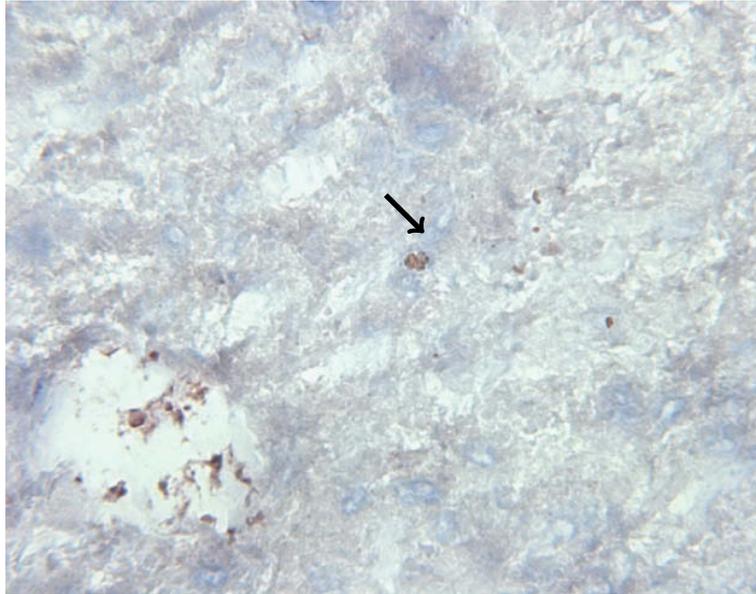


Abbildung 4.28: Gefrierschnitt der Leber einer 3 Monate alten IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen in der Leber, Vergrößerung 250-fach

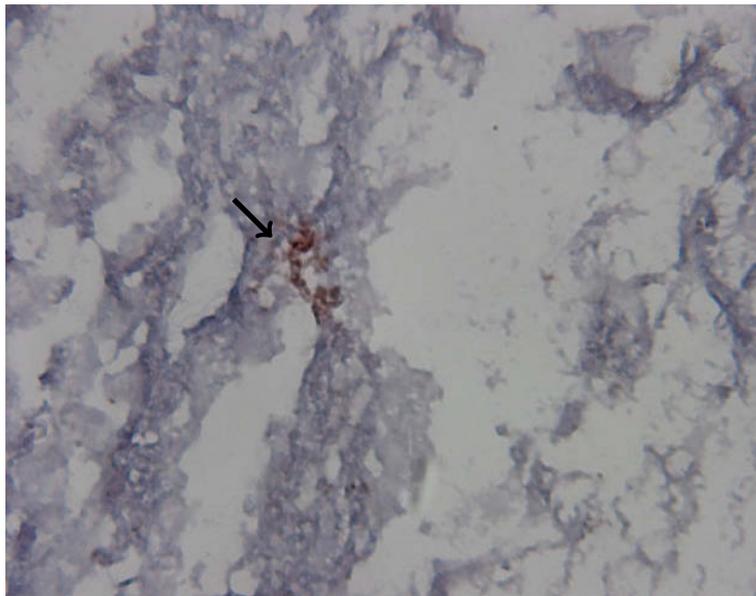


Abbildung 4.29: Gefrierschnitt der Leber einer 3 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen in der Leber, Vergrößerung 250-fach

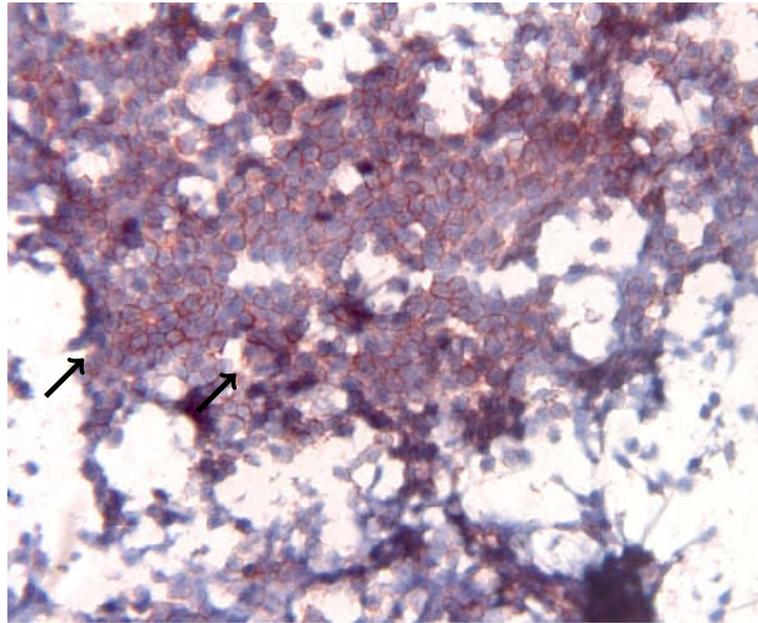


Abbildung 4.30: Gefrierschnitt der Milz einer 3 Monate alten IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-Zellen in der Milz, Vergrößerung 250-fach

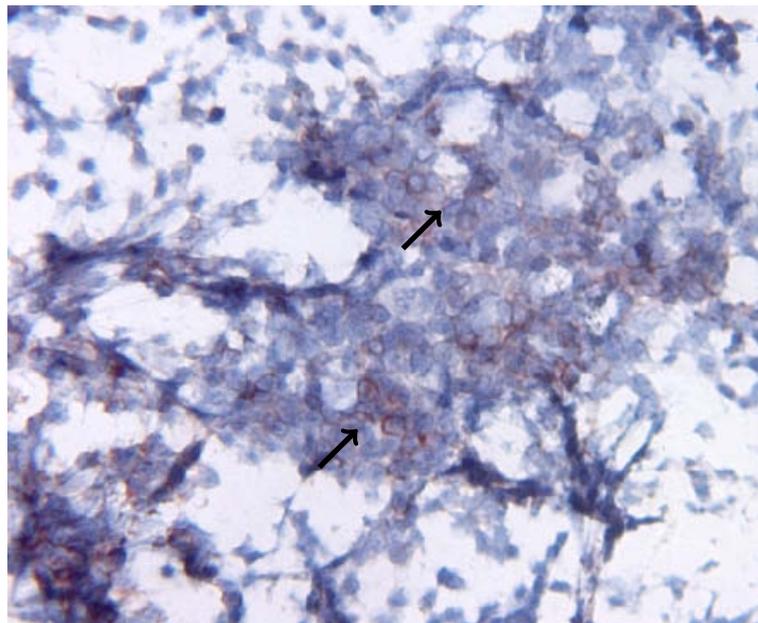


Abbildung 4.31: Gefrierschnitt der Milz einer 3 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-Zellen in der Milz, Vergrößerung 250-fach

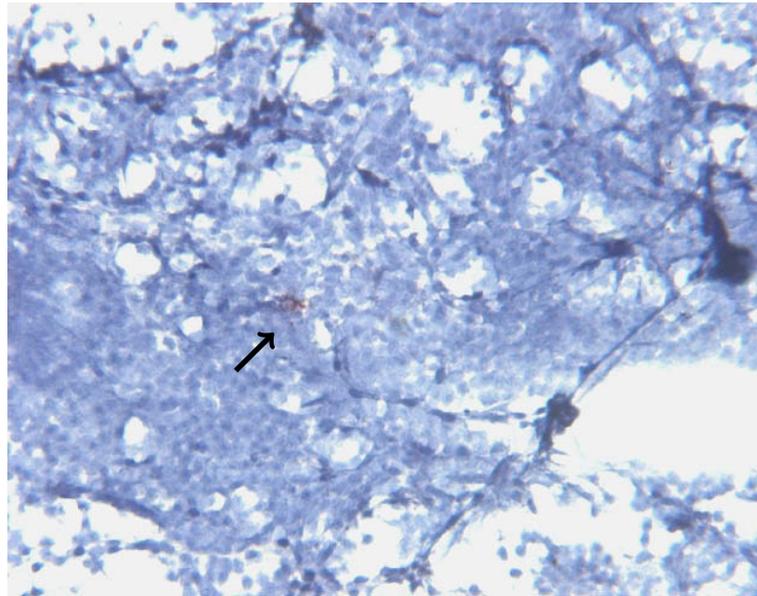


Abbildung 4.32: Gefrierschnitt der Milz einer 3 Monate alten IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen (Pfeil) in der Milz, Vergrößerung 250-fach

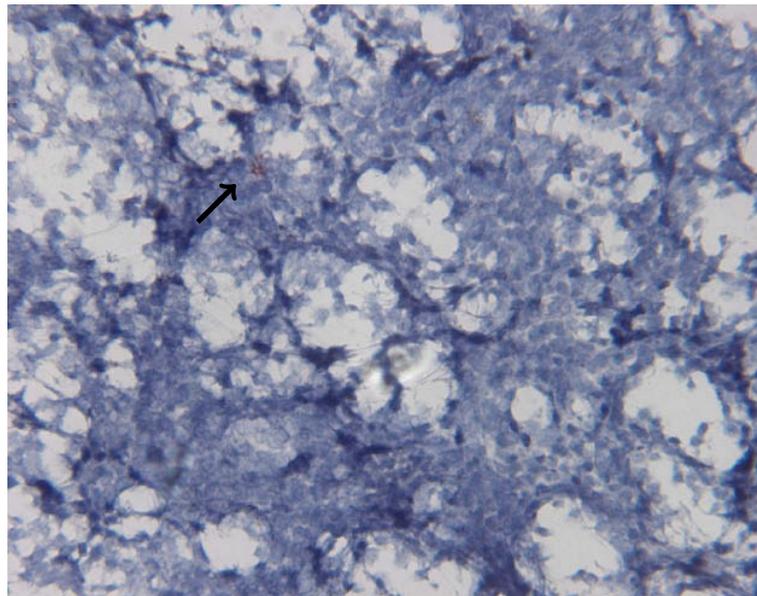


Abbildung 4.33: Gefrierschnitt der Milz einer 3 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen (Pfeil) in der Milz, Vergrößerung 250-fach

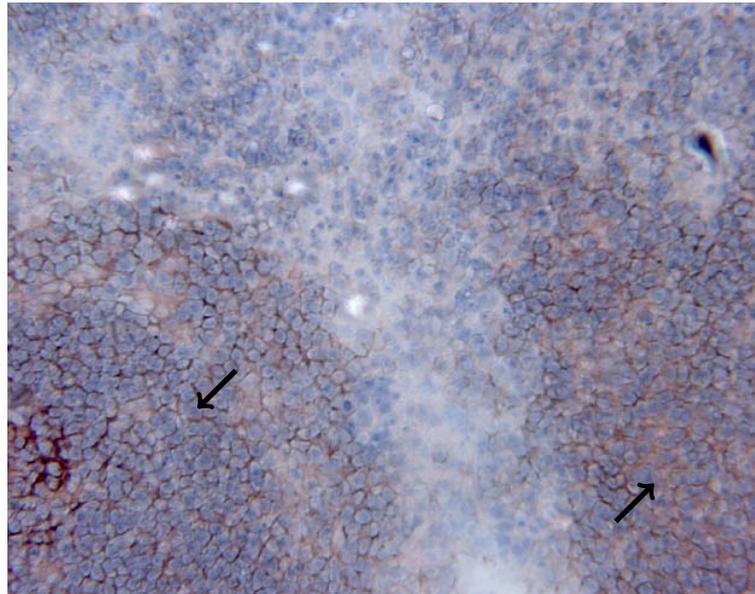


Abbildung 4.34: Gefrierschnitt der Milz einer 3 Monate alten IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen in der Milz, Vergrößerung 250-fach

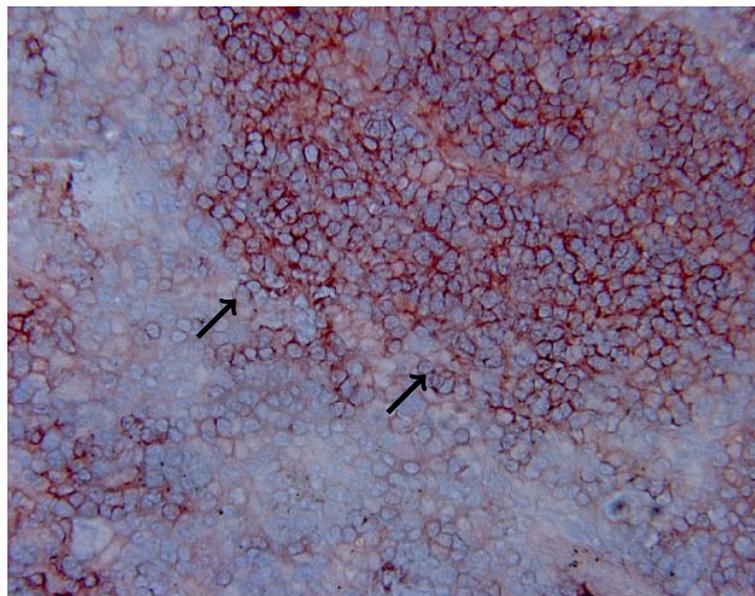


Abbildung 4.35: Gefrierschnitt der Milz einer 3 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen in der Milz, Vergrößerung 250-fach

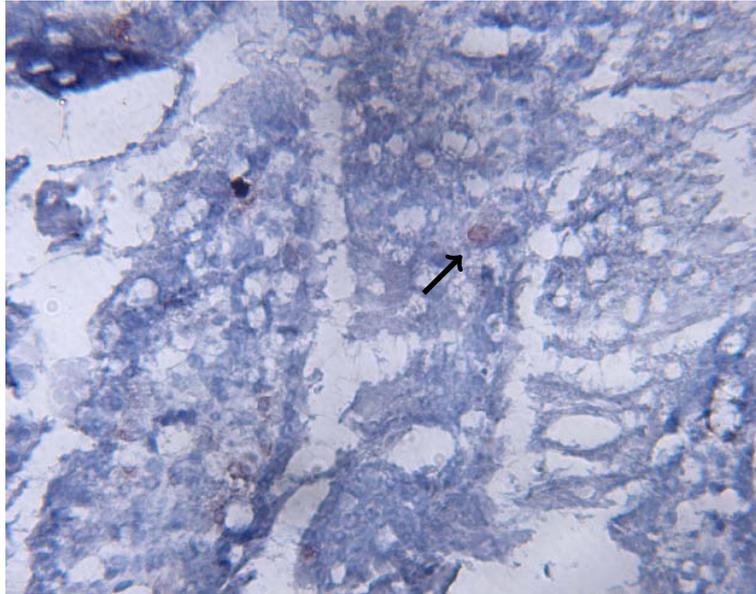


Abbildung 4.36: Gefrierschnitt des Dünndarms einer einjährigen IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen im Dünndarm, Vergrößerung 250-fach

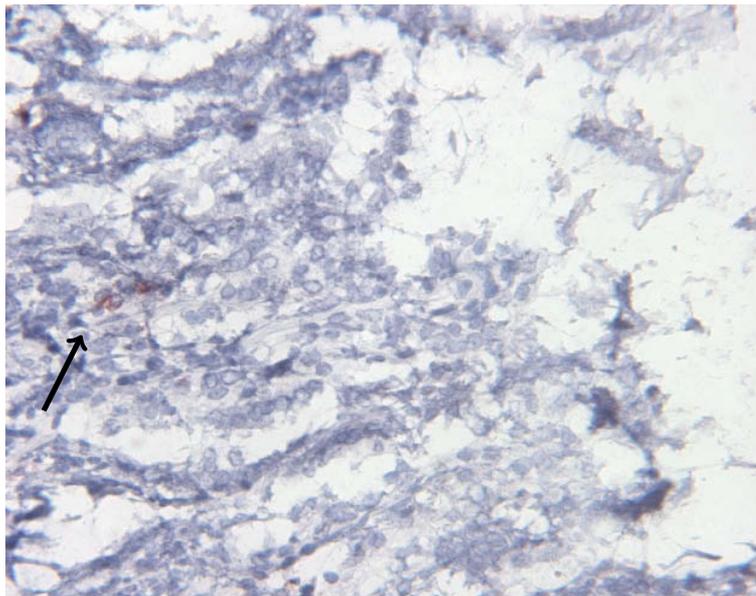


Abbildung 4.37: Gefrierschnitt des Dünndarms einer einjährigen IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen im Dünndarm, Vergrößerung 250-fach

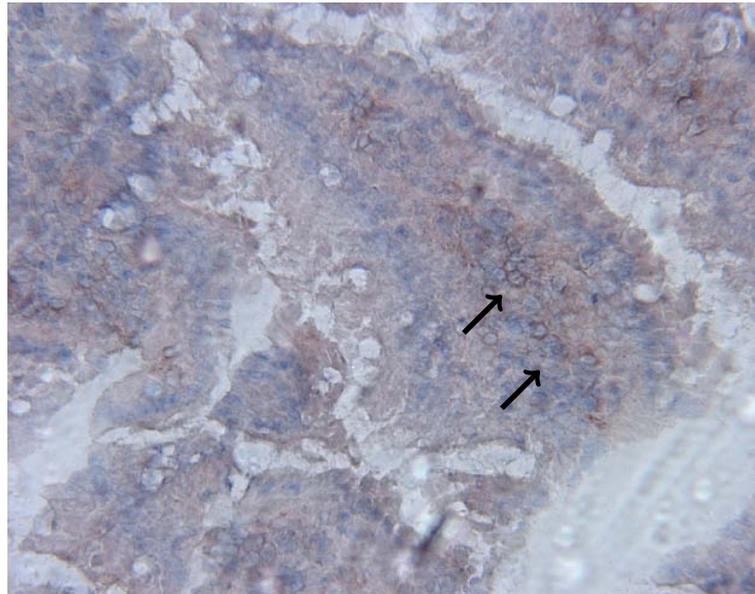


Abbildung 4.38: Gefrierschnitt des Dünndarms einer einjährigen IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen (Pfeile) im Dünndarm, Vergrößerung 250-fach

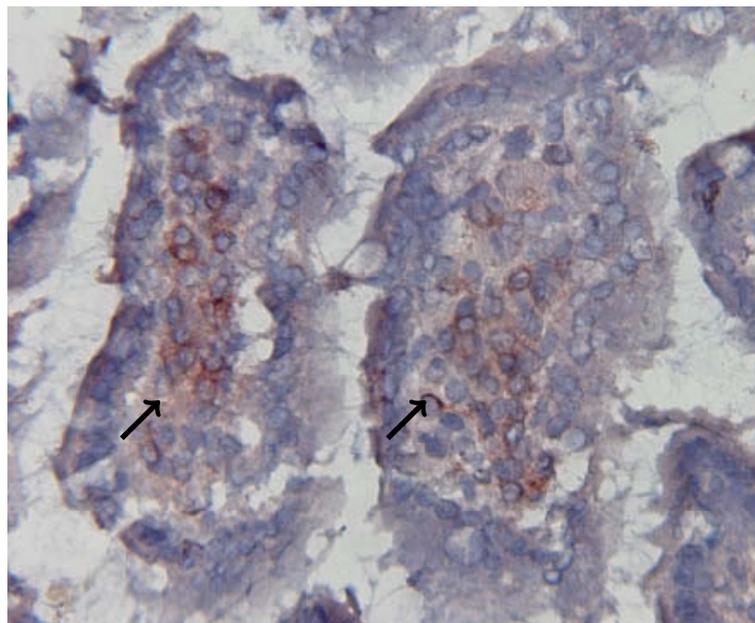


Abbildung 4.39: Gefrierschnitt des Dünndarms einer einjährigen IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen im Dünndarm, Vergrößerung 250-fach

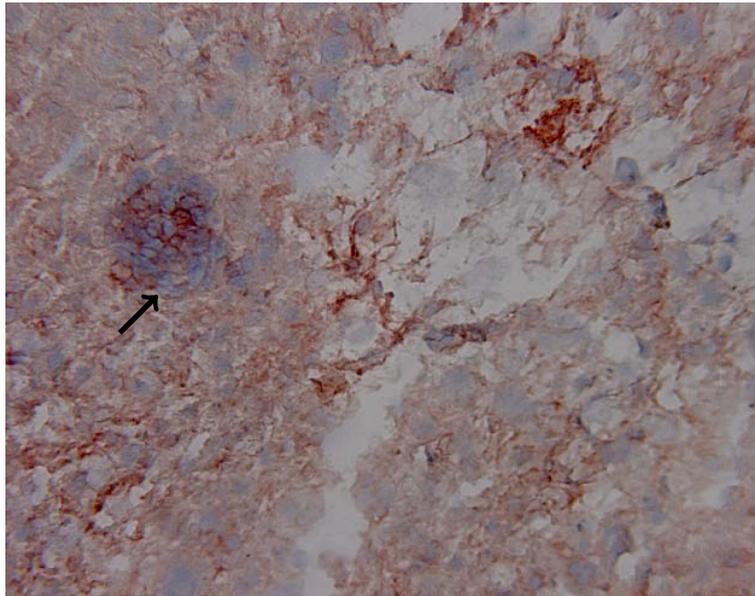


Abbildung 4.40: Gefrierschnitt der Leber einer einjährigen IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen der Leber, Vergrößerung 250-fach

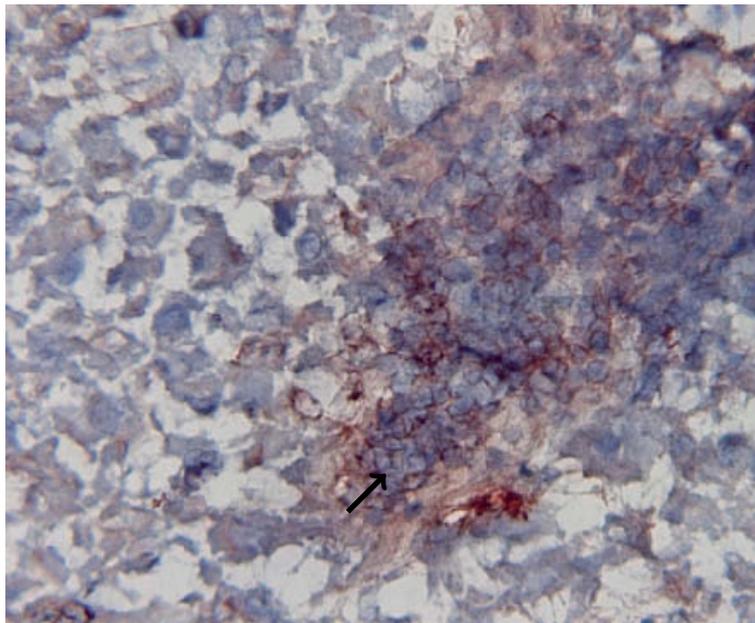


Abbildung 4.41: Gefrierschnitt der Leber einer einjährigen IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen der Leber, Vergrößerung 250-fach

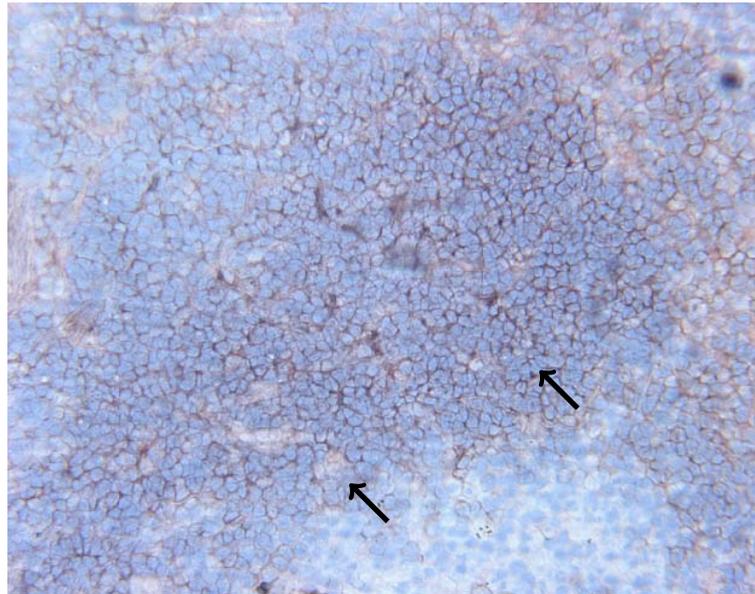


Abbildung 4.42: Gefrierschnitt der Milz einer einjährigen IL-7<sup>+/+</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen der Milz, Vergrößerung 250-fach

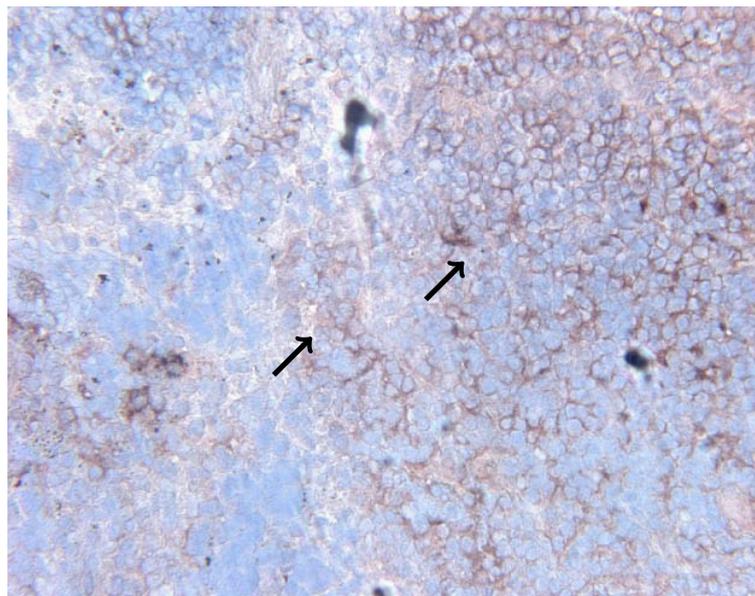


Abbildung 4.43: Gefrierschnitt der Milz einer einjährigen IL-7<sup>-/-</sup> Maus. Einfachfärbung der CD19<sup>+</sup>-Zellen der Milz, Vergrößerung 250-fach

## 5 Diskussion

Primär wurde IL-7 als Wachstumsfaktor von prä-B-Zellen beschrieben, der von Stromazellen des Knochenmarks produziert wird [Namen et al., 1988b; Goodwin et al., 1989; Sudo et al., 1989]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-7 bei der Maus ebenso ein Wachstumsfaktor für Thymozyten, nicht jedoch für Granulozyten und Monozyten, ist [Okazaki et al., 1989; Chantry et al., 1989; Morrissey et al., 1989]. Bei fehlendem IL-7 oder IL-7R $\alpha$  ist der Thymus deutlich kleiner [von Freeden-Jeffry et al., 1995; Peschon et al., 1994], und T-Zellen sind in ihrer Anzahl stark reduziert [Sudo et al., 1993; Grabstein et al., 1993]. In einer früheren Arbeit mit IL-7 $^{-/-}$  Mäusen wurden reduzierte Zellzahlen im peripheren Blut, in der Milz und im Thymus und eine im Vergleich zum Wildtyp normale Zellzahl im Knochenmark gemessen [von Freeden-Jeffry et al., 1995], Leber, Lunge und Darm wurden allerdings nicht untersucht, obwohl dort ein wesentlicher Teil der Lymphozyten residiert. In der vorliegenden Arbeit werden organbezogenen Lymphozytensubpopulationen bei IL-7 $^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen beschrieben.

Die Größe der Milz der IL-7 $^{-/-}$  Mäuse war kleiner als die der Wildtyp-Mäuse und Peyer's Patches waren nicht vorhanden, dies wurde schon in einer vorherigen Arbeit beschrieben, und auch für den Thymus wurde eine geringere Organgröße beschrieben [von Freeden-Jeffry et al., 1995]. In unseren Untersuchungen waren die Größe von Leber und Lunge der IL-7 $^{-/-}$  Maus kleiner als beim Wildtyp, dies ist bisher noch nicht beschrieben worden. Insgesamt ist das Wachstum der IL-7 $^{-/-}$  Maus vermindert (Tabelle 4.1). Eine Abnahme der Lymphozytenzahl in den Organen aufgrund verminderter Lymphozytenbildung könnte ein Grund für die geringere Größe der Organe sein. Die Überlegung, dass hierfür möglicherweise der Immundefekt im Sinne von rezidivierenden oder chronischen Infektionen ursächlich ist, ist eher zu vernachlässigen, denn unter konventioneller Haltung wurde keine höhere Infektanfälligkeit der IL-7 $^{-/-}$  Mäuse beobachtet. Es ist wahrscheinlich auch keine Folge der Transgenität, denn dann müssten Größe und Gewicht der Organe und das Körpergewicht auch bei anderen transgenen Mäusen verringert sein, dies ist jedoch nicht durchweg der Fall (persönliche Mitteilung von K. Tenbrock, A. Schippers). Allerdings weisen die IL-7 $^{-/-}$  Mäuse eine verkürzte Lebensspanne auf (ca. 1 Jahr gegenüber ca. 3 Jahren bei Wildtypen) und zeichnen sich durch eine verringerte Fertilität aus, d.h. sie haben insgesamt weniger Würfe mit zusätzlich abnehmender Wurfgröße. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine frühzeitige oder schnellere Alterung der IL-7 $^{-/-}$  Mäuse.

Auch bei Fehlen der IL-2R $\gamma$ -Kette ist eine Lymphopenie im peripheren Blut des Menschen beschrieben [DiSanto et al., 1994]. Eine weniger ausgeprägte Lymphozytopenie besteht in der Maus, wenn nur IL-2 und/oder IL-4 inaktiviert sind [Schorle et al., 1991; Kühn et al., 1991; Sadlack et al., 1994], so dass wahrscheinlich ein anderes Zytokin die schwere Lymphopenie bedingt. Am ehesten kommt hier IL-7 in Betracht, da IL-7 bei Mäusen auch an die  $\gamma$ -Kette des IL-2R bindet.

In Vorarbeiten wurde eine genaue Phänotypisierung des peripheren Blutes und eine weniger genaue Phänotypisierung des Knochenmarks durchgeführt, ebenso wurden bereits verschiedene murine Organe hinsichtlich ihrer Lymphozytenanteile mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht [von Freeden-Jeffry et al., 1995; Carvalho et al., 2001; Peschon et al., 1994]. In den meisten dieser Arbeiten wurden Tiere einer großen Altersspanne (z.B. 5–11 Monate) und nicht zu einem definierten Zeitpunkt untersucht, so dass mögliche altersabhängige Effekte nicht erkannt wurden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals die gezielte Untersuchung einer Gruppe junger Mäuse im Alter von drei Lebensmonaten und einer adulten Mausgruppe im Alter von einem Jahr, wobei sich eine unterschiedliche Verteilung der Lymphozytensubpopulationen u.a. auch in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse zeigte.

## 5.1 Der IL-7<sup>-/-</sup>-Phänotyp

Im Vergleich der IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse im Alter von drei Monaten zeigte sich bezüglich des Gewichts der Tiere kein Unterschied, wohingegen bei den Mäusen im Alter von einem Jahr schon bei der Betrachtung auffiel, dass die IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse schwächlicher waren als die IL-7<sup>+/+</sup> Mäuse. Der Gewichtsunterschied von durchschnittlich zehn Gramm (Tabelle 4.1) war allerdings nicht signifikant. Da der Gewichtsunterschied mit zunehmendem Alter zunimmt, könnte dies wiederum ein Hinweis auf eine schnellere Alterung der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse sein. Festzuhalten ist, dass sich die typische Organstruktur nicht unterschied, wie mit den immunhistochemischen Präparaten gezeigt werden konnte (Kapitel 4.3). Es war somit kein direkter Einfluss auf die Organogenese erkennbar.

## 5.2 Verteilung der Lymphozyten auf die Organe

In Untersuchungen des peripheren Blutes der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse durch von Freeden-Jeffry et al. hinsichtlich der weißen Blutzellen hatte sich eine signifikante Reduktion der Leukozytenanzahl gezeigt, während die übrigen Parameter des Blutbildes unveränderte Werte hatten. Die Leukozytopenie war vor allem durch eine Lymphozytopenie bedingt. Weitere Untersuchungen des Knochenmarks, des Thymus und der Milz auf ihren Lymphozytengehalt zeigten ebenfalls reduzierte Lymphozytenzahlen für Thymus und Milz und eine normale Zellularität des Knochenmarks [von Freeden-Jeffry et al., 1995]. In unseren Untersuchungen zeigte sich im Gegensatz zu den anderen untersuchten Organen in Dünndarm und Lunge eine normale Zellularität (Tabelle 4.3). Dies deutet darauf hin, dass die Auswirkungen durch das Fehlen von IL-7 in den lymphatischen Organen stärker sind.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir eine schwere Lymphopenie der Milz im Alter von 3 und 12 Monaten feststellen (Tabelle 4.8). Ein Einfluss von IL-7 scheint vor allem im Knochenmark und in der Milz im Vordergrund zu stehen. Im Darm und im Knochenmark schien der Einfluss im Alter von einem Jahr geringer zu sein. Hingegen war in Leber und Lunge der Effekt von IL-7 geringer, in der Leber war erst mit zunehmendem Alter ein Einfluss bei dann auftretender Lymphopenie zu erkennen, bei deutlich geringerer Anzahl der Lymphozyten in IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu

einjährigen Wildtyp-Mäusen (Tabellen 4.3, 4.2). Aufgrund des Fehlens von IL-7 kommt es zu einer schweren Lymphopenie sowohl der B- als auch der T-Lymphozyten in den peripheren Organen und im peripheren Blut [Carvalho et al., 2001]. Es kann vermutet werden, dass IL-7 insbesondere von Stromazellen der Milz und des Knochenmarks gebildet wird, so dass bei Fehlen dieses Zytokins primär in diesen Organen ein Unterschied zur Wildtyp-Maus ersichtlich ist. Teilweise finden sich höhere relative Anteile der Lymphozyten bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen, z.B. in der Leber der 12 Monate alten Tiere und der Lunge der 3 Monate alten Tiere, wobei die absolute Anzahl der Lymphozyten in den Organen gegenüber dem Wildtyp jeweils vermindert ist. Der niedrigere relative Anteil im Darm bei höherer absoluter Lymphozytenzahl lässt eine Umverteilung der Lymphozyten aus den lymphatischen in die nicht-lymphatischen Organe vermuten (Tabelle 4.3). Die gemessenen Lymphozytenzahlen von Darm und Lunge wiesen jedoch eine hohe Streuung auf. Eine Beurteilung bzw. Einordnung der Messwerte der Lymphozyten aus Leber und Lunge ist schwierig, da auch von Wildtyp-Mäusen keine Referenzwerte vorliegen. In Arbeiten mit IL-7-transgenen Mäusen wurden auch unterschiedliche Phänotypen des Thymus mit stark unterschiedlicher Zellularität unter gleichen Bedingungen beschrieben [Fry and Mackall, 2005].

Mit Hilfe der Immunhistochemie als einer zweiten Methode konnten wir den Nachweis erbringen, dass die in den Suspensionen per FACS gemessenen Lymphozytensubpopulationen auch tatsächlich im Gewebe vorhanden waren. Die Regionen, in denen die Lymphozyten gesehen wurden, unterschieden sich jedoch nicht von denen beim Wildtyp. Somit scheint IL-7 keinen Einfluss auf die Verteilung der Lymphozyten innerhalb des jeweiligen Organs zu haben, sondern für die Verteilung der Lymphozyten innerhalb eines Organs sind anscheinend auch oder ausschließlich andere Zytokine verantwortlich. Wichtiger für die Organverteilung als die Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktionen sind die Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen und ihren Liganden. Hier kommen insbesondere VCAM-1 und MAd-CAM-1, sogenannte Adhäsionsmoleküle, in Frage. In einem Knochenmarktransplantationsmodell wurde deren Expression sowie der Einfluss einer Blockade von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf das Homing in Knochenmark und Milz mittels elektronischer Immuno-Mikroskopie untersucht. Direkt nach der KMT war die Expression von VCAM-1 und MAd-CAM-1 reduziert, nach 12–24 Stunden kam es zu einer Erholung. Die Anzahl der Homing-Zellen im Knochenmark und in der Milz war, abhängig von der Menge der eingesetzten Antikörper gegen  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, reduziert [Tada et al., 2008]. Interessant wäre eine Untersuchung der Expression von VCAM-1 und MAd-CAM-1 in Abwesenheit von IL-7 mit der Frage, ob es dann zu einer vermehrten Expression kommt.

## 5.3 T-Lymphozyten

### 5.3.1 T-Lymphozyten im Thymus

Untersuchungen an IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen den Phänotyp einer stark reduzierten Zellularität des Thymus [von Freeden-Jeffry et al., 1995]. Bei der Untersuchung dieser Thymozyten zeigt sich ein normales Verhältnis der Oberflächenmarker CD3, CD4 und

CD8, was darauf schließen lässt, dass Interleukin-7 insbesondere auf die Bildung der Thymozyten Einfluss nimmt. Der Block in der T-Lymphopoese ist auf dem Niveau der TN-Thymozyten vor der Stufe der CD44<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>-T-Zellen. Zudem kommt es zu einer deutlichen Erniedrigung des bcl-2, was in einer erhöhten Apoptoserate von Thymozyten resultiert [von Freeden-Jeffry et al., 1997; Kim et al., 1998].

### 5.3.2 TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten in den Organen

Bezüglich der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten konnten wir die Ergebnisse vorheriger Untersuchungen für die Milz vollkommen bestätigen, für das Knochenmark allerdings nur teilweise. Wir sahen im Knochenmark eine ähnliche Anzahl TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten im Vergleich zum Wildtyp, jedoch nur im Alter von 12 Monaten, während im Alter von 3 Monaten eine Reduktion auffällt. Möglicherweise wird das Fehlen von IL-7 hier zum Teil kompensiert und das „Defizit“ an TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten im Laufe der Entwicklung ausgeglichen. Auch in anderen Organen scheint das Fehlen von IL-7 kompensiert zu werden, bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen sahen wir in der Leber sogar eine höhere Zellzahl der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> Zellen im Alter von 12 Monaten, im Dünndarm sowohl im Alter von 3 als auch im Alter von 12 Monaten im Vergleich zum Wildtyp.

### 5.3.3 CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den Organen

Die Untersuchungen zeigten, dass die Anzahl reifer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark der drei Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant niedriger war als bei IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen, es fehlten vor allem naive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. Bei einjährigen Mäusen bestand kein signifikanter Unterschied mehr, im Gegenteil, die Anzahl der naiven CD4<sup>+</sup> und memory CD8<sup>+</sup> Lymphozyten war erhöht im Vergleich zu 3 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> und 12 Monate alten Wildtypen. In Dünndarm, Leber und Lunge konnten wir keinen Unterschied der Anzahl der CD4<sup>+</sup> Zellen zwischen IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen messen, auch die Anzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen im Dünndarm und Lunge zeigte keinen Unterschied. Während zwischen der Anzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen der Leber von IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von drei Monaten kein Unterschied bestand, war deren Anzahl bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von 12 Monaten gegenüber den Wildtyp-Mäusen signifikant erniedrigt, die der Gedächtnis CD8<sup>+</sup> Zellen erhöht. Eine signifikante Reduktion der Anzahl der reifen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen war in der Milz im Alter von drei und 12 Monaten vorhanden. Die Anzahl der naiven und Gedächtnis CD4<sup>+</sup> und naiven CD8<sup>+</sup> Zellen der Milz der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse war signifikant niedriger als bei IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen, nur bei Gedächtnis CD8<sup>+</sup> Zellen war kein Unterschied zu messen, so dass deren Entwicklung tatsächlich nicht nur abhängig von IL-7 ist, wie zuvor bereits gezeigt wurde, sondern wahrscheinlich auch IL-15 die Homöostase der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten wesentlich reguliert [Tan et al., 2002; Guimond et al., 2005].

### 5.3.4 TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen

Im Dünndarm zeigten die Untersuchungen bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikante Reduktion der TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen gegenüber IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen sowohl im Alter von 3 als auch 12 Monaten, dies korrespondiert zu Daten vorhergehender Arbeiten, die dies für das periphere Blut und Knochenmark zeigen. Auch für den Dünndarm ist

eine TCR $\gamma\delta^+$  T-Zell-Reduktion vorbeschrieben [Moore et al., 1996]. Wie schon aus früheren Untersuchungen des Knochenmarks bekannt ist, hat das Fehlen von IL-7 weniger Einfluss auf die TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen des Knochenmarks. In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass im Knochenmark drei Monate alter Mäuse die Anzahl an TCR $\gamma\delta^+$  Lymphozyten signifikant gegenüber dem Wildtyp reduziert war, bei einjährigen Mäusen bestand dann aber interessanterweise bezüglich der TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen kein Unterschied mehr zwischen IL-7 $^{+/+}$  und IL-7 $^{-/-}$  Mäusen. In Leber, Lunge und Milz konnten weder im Alter von drei noch im Alter von zwölf Monaten TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen gemessen werden. Diese Beobachtungen bestätigen die Vermutung, dass IL-7 direkten Einfluss auf die Bildung der TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen hat. Im Knochenmark kann das Fehlen von IL-7 anscheinend kompensiert werden. Hier werden die lymphatischen Vorstufen gebildet, die Ausreifung der Subpopulationen erfolgt u.a. im Knochenmark, Thymus und Dünndarm [Moore et al., 1996]. Möglicherweise kommt es in Abwesenheit von IL-7 zur vermehrten Produktion anderer Zytokine im Knochenmark, die die Funktion von IL-7 teilweise kompensieren können, eventuell kommt TSLP in Betracht, da TSLP auch über den IL7R $\alpha$  bindet, oder aber IL-15, das auch eine wichtige Rolle in der TCR $\gamma\delta^+$  T-Zell-Homöostase einnimmt [French et al., 2005].

### 5.3.5 DN-T-Lymphozyten im Blut

In den IL-7 $^{-/-}$  Mäusen kommt es zu einer signifikanten Zunahme der DN T-Zellen im peripheren Blut gegenüber der Wildtypmaus [Feyen et al., 2006], es werden signifikant höhere Zahlen an DN T-Zellen gegenüber der IL-7 $^{+/+}$  Maus gemessen. Deshalb haben die DN T-Zellen für das Überleben von IL-7 $^{-/-}$  Mäusen möglicherweise eine wichtige Bedeutung. Beschrieben ist eine verminderte Expression des TCR $\alpha\beta$  auf diesen Zellen, was auf eine T-Zell-Selektion außerhalb des Thymus hindeuten könnte [Fritsch et al., 1998; Feyen et al., 2006]. Auch im peripheren Blut des Menschen wird diese T-Zell-Population beschrieben [Niehues et al., 1994, 1999; Zhang et al., 2001]. Die exakte Funktion dieser Zellpopulation ist noch unbekannt. Möglicherweise sind DN T-Zellen an der Regulation von Autoimmunprozessen und Transplantationsfolgen, im Sinne der Verhinderung einer Transplantatabstoßung, beteiligt. Vielleicht stellen sie auch eine Art „immunkompensatorische“ Subpopulation dar, so sind sie bei Mäusen und Menschen mit Apoptosedefekt und Autoimmunität (CD95-Mutation, ALPS) deutlich expandiert.

### 5.3.6 DN-T-Lymphozyten in den Organen

Es fiel eine Zunahme der Anzahl der DN T-Zellen der Lunge auf fast das Doppelte im Alter von zwölf Monaten bei IL-7 $^{-/-}$  gegenüber dem Wildtyp auf. Auch im Dünndarm der IL-7 $^{-/-}$  Mäuse war die Anzahl der DN T-Zellen im Alter von drei und zwölf Monaten gegenüber den IL-7 $^{+/+}$  Mäusen höher, dies könnte eine extrathymische Selektion der T-Lymphozyten vermuten lassen. Diesbezüglich sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um z.B. die Lunge als Ort extrathymischer Lymphopoese zu bestätigen oder auszuschließen. Eine diesbezügliche Fragestellung könnte in einem nude/IL-7 $^{-/-}$  Maus-Modell beantwortet werden. Auch in der Leber von IL-7 $^{-/-}$

Mäusen konnten wir einen größeren Anteil DN T-Zellen im Alter von 12 Monaten als im Alter von 3 Monaten messen. Im Knochenmark wurde im Alter von 12 Monaten kein Unterschied bzgl. der DN T-Zellen zwischen Wildtyp- und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen gemessen, nachdem im Alter von drei Monaten eine signifikant geringere Anzahl gemessen wurde, so dass wiederum im Knochenmark das Fehlen von IL-7 mit zunehmendem Alter kompensiert werden kann. Ein ebenfalls signifikant höherer Anteil der DN T-Zellen, bei allerdings im Vergleich zum Wildtyp geringeren absoluten Werten, wurde in der Milz im Alter von drei und zwölf Monaten gemessen. Da die Absolutwerte niedriger sind, ist dies eher im Rahmen einer unterschiedlichen Zusammensetzung des Lymphozytenpools zu interpretieren und nicht im Sinne eines zusätzlichen Entstehungsortes der T-Lymphozyten in der Milz.

## 5.4 NK- und NK-like T-Zellen

Ein Unterschied der Anzahl der NK- und NK-like T-Zellen zwischen IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen wurde nicht gemessen. Allerdings wurde zuvor schon gezeigt, dass NK-like T-Zellen (TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/NK1.1<sup>+</sup>) in IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen funktionell defekt sind [Vicari et al., 1996]. Es wird postuliert, dass TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen eine Vorstufe der NK-like T-Zellen sind [Fritsch et al., 1998]. Diese Vermutung konnten wir aufgrund der signifikant niedrigeren Anzahl bzw. des Fehlens von TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen in den IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen bei gleichzeitigem Vorhandensein von NK- und NK-like T-Zellen nicht bestätigen.

## 5.5 B-Lymphozyten

In IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen werden höhere Immunglobulinspiegel als bei Wildtypen gemessen, der auslösende Pathomechanismus ist jedoch nicht vollständig geklärt [Carvalho et al., 2001; von Freeden-Jeffry et al., 1995]. Ein Grund könnte eine Dysregulation infolge der T-Zell-Lymphopenie sein. Dagegen spricht allerdings, dass rein T-Zell-lymphopenische Mäuse keine erhöhten Immunglobulinspiegel haben. Carvalho et al. konnten zeigen, dass es zu einer Proliferation von aktivierten B1-Zellen der Marginalzone, die während der frühen Entwicklung gebildet werden, kommt.

Im Knochenmark zeigte sich bei fehlendem IL-7 eine signifikante Reduktion der B-Zellen, die auch schon in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte [Carvalho et al., 2001]. Wenn auch die Zahl der B-Lymphozyten im Alter gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert ist, ergibt sich die Frage, ob die B-Lymphopoese bzw. -Homöostase erhalten bleibt. In Untersuchungen des Knochenmarks wird bis zu einem Alter der Mäuse von 7 Wochen eine zunehmende Reduktion der B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>-Zellen beschrieben [Carvalho et al., 2001]. Die Oberflächenmarker B220 und CD19 werden von den B-Zellen von der pro-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle exprimiert. In einer früheren Arbeit wurde eine Reduktion der Zahl der B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>-Zellen bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von drei Monaten beobachtet, im Alter von einem Jahr waren sie fast komplett abwesend. Der Stopp in der Entwicklung scheint also schon vor dem Übergang von der pro- zur prä-B-Zelle stattzufinden [Carvalho et al., 2001]. Bei unseren Untersuchungen der B-Lymphozyten des Dünndarms und der Leber ergab sich, dass

die Anzahl der CD19<sup>+</sup> B-Zellen sowohl bei drei Monate alten als auch bei einjährigen IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu IL-7<sup>+/+</sup> Mäusen reduziert war, kein Unterschied hingegen bestand bei den B-Vorläuferzellen (CD19<sup>-</sup>/B220<sup>+</sup>). Im Knochenmark war die Anzahl der B-Vorläufer, naiven B-Zellen und reifen B-Zellen bei den ko-Mäusen im Alter von drei Monaten gegenüber dem Wildtyp niedriger. Bei der Untersuchung der B-Lymphozytenpopulationen der Lunge zeigten sich zwischen IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikanten Unterschiede. Ist kein IL-7 vorhanden, so ist die B-Zell-Entwicklung auf der Stufe der pro-B-Zelle unterbrochen, die schon B220 exprimiert. Unsere Untersuchungen zeigten eine Reduktion der reifen B-Zellen der Milz im Alter von drei Monaten auf ein Zehntel. Die Anzahl der B-Zellen war auch im Alter von einem Jahr signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Bei Betrachtung der B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen der Milz sah man im Alter von drei Monaten eine Reduktion auf ein Zehntel bei IL-7<sup>-/-</sup>, die auch bei adulten Mäusen gemessen wird. Die Anzahl der B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen im Wildtyp nimmt mit dem Alter zu, die der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse bleibt auf dem ursprünglichen Niveau. Dies ist konsistent mit einer früheren Arbeit, in der untersucht wurde, ob die Lymphopenie der B-Zellen mit zunehmendem Alter fortbesteht [Carvalho et al., 2001]. Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe wurden B220<sup>+</sup> B-Lymphozyten von der Geburt bis zum Alter von sieben Monaten bestimmt. Zu jedem Zeitpunkt war die Zahl der B-Lymphozyten der Milz der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse etwa auf ein Zehntel der Kontrollgruppe reduziert [Carvalho et al., 2001]. In unseren Untersuchungen führt das Fehlen von IL-7 insbesondere in Knochenmark, Dünndarm und Milz zur signifikanten Reduktion der B-Zell-Populationen in jedem Alter, so dass wir folgern, dass IL-7 besonders in diesen Organen Einfluss auf die B-Zell-Lymphopoese nimmt und hier auch nicht ersetzt werden kann. Hier zeigt sich ein wesentlicher Unterschied zu den T-Zellen, die sich im Alter von einem Jahr nicht wesentlich zwischen Wildtyp- und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen unterscheiden. Dies bestärkt die für die B-Zell-Lymphopoese und -Homöostase wichtige und nicht-redundante Funktion von IL-7.

## 5.6 Einfluss des Alterungseffektes auf Lymphozytensubpopulationen bei IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen

Ob der Alterungseffekt bei WT- und ko-Mäusen eine ähnliche Rolle spielt oder ob es Unterschiede gibt, wird im folgenden betrachtet: Die Gesamtlymphozytenzahl der einzelnen Organe nimmt sowohl bei WT-, als auch bei ko-Mäusen zu, eine Ausnahme ist die WT-Milz, in der es zu einer Abnahme der Lymphozytengesamtzahl kommt. Die in unseren Messungen erhobenen Werte fanden Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen, z.B. bezüglich der Lymphozytenzahl und Anzahl der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> Zellen der Milz, des Knochenmarks und Daten zu TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen [von Freedon-Jeffrey et al., 1995]. Bezüglich der Subpopulationen der einzelnen Organe stellen wir fest, dass die Zellularität des Knochenmarks der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse im Alter von 3 Monaten gegenüber WT-Mäusen reduziert war, im Alter von 12 Monaten war die Zellularität nicht mehr unterschiedlich. Wir sahen eine Zunahme der Anzahl der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen, reifer CD4<sup>+</sup> Zellen und naiver B-Zellen mit zunehmendem Alter.

Die Anzahl der reifen B-Zellen und NK-like T-Zellen war allenfalls leicht reduziert, ebenso die Gedächtnis-CD4<sup>+</sup> Zellen. Bei den IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen ist eine Zunahme der Zellzahl fast aller Subpopulationen zu messen. Besonders zu erwähnen sind die TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen der IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse, deren Anzahl mit 12 Monaten deutlich höher ist als im Alter von 3 Monaten. Während wir im Alter von 3 Monaten eine signifikante Reduktion der TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Knochenmark messen, nimmt deren Anzahl im Alter zu, so dass zum WT kein signifikanter Unterschied mehr besteht. Hieraus können wir schließen, dass die  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zell-Entwicklung nicht nur durch IL-7, sondern auch durch andere Zytokine erfolgt. Zu nennen ist hier IL-15, das eine wichtige Rolle in der  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zell-Homöostase einnimmt [French et al., 2005]. Außerdem besteht eine deutliche Expansion der naiven CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bei IL-7<sup>-/-</sup> im Vergleich zum Alter von 3 Monaten und im Vergleich zum WT, sowie eine Expansion der Anzahl der Gedächtnis CD4<sup>+</sup>, naiven CD8<sup>+</sup> und Gedächtnis CD8<sup>+</sup> Zellen bis zum Alter von 12 Monaten. Diese beschriebenen altersabhängigen Veränderungen sind IL-7 spezifisch. Die eigentliche Funktion von IL-7 kann möglicherweise im Laufe der Entwicklung entweder direkt im Knochenmark durch andere Zytokine, wie z.B. im Falle von CD4 durch TSLP oder im Falle von CD8 durch IL-15, kompensiert werden, oder die Lymphozyten wandern von peripher ins Knochenmark ein [Al-Shami et al., 2004]. Bereits vermutet wurde, dass bei Depletion der CD4-Zellen IL-7 vermehrt für CD8-Zellen zur Verfügung steht [Schluns et al., 2005]. In Abwesenheit von IL-7 ist ein ähnlicher Mechanismus vorstellbar, so dass ohne CD4-Zellen andere Zytokine dann möglicherweise ausschließlich auf CD8-Zellen wirken können.

Die Lymphozytensubpopulationen der Leber sind bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Es wurde eine Zunahme aller Subpopulationen in der Leber sowohl bei WT-, als auch bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem Alter gemessen. Besonders fällt die Expansion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten bei IL-7<sup>-/-</sup> im Vergleich zum WT auf. Im Alter von 3 Monaten ist die Anzahl der DN T-Zellen bei IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen größer als beim WT, im Alter von 12 Monaten hat sich das Verhältnis umgekehrt. Möglicherweise haben DN T-Zellen die Rolle sogenannter *filler cells*. Alternativ könnte es auch zu einer Expansion dieser Zellen aufgrund einer Infektion kommen, jedoch wurden in Abwesenheit von IL-7 keine vermehrten Infektionen gegenüber dem WT beobachtet. In der Milz der WT-Mäuse nimmt mit zunehmendem Alter nicht nur die Gesamtlymphozytenzahl, sondern auch die Anzahl der Lymphozyten der Subpopulationen ab, eine Ausnahme bilden die DN T-Zellen und NK-like T-Zellen, deren Anzahl zunimmt.

Bei den IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen wurde im Alter von 12 Monaten überraschenderweise eine Zunahme der Lymphozyten fast aller Subpopulationen gemessen, nur die Anzahl der CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen blieb reduziert. Es stellt sich die Frage, wie es hierzu im IL-7<sup>-/-</sup> Modell kommt. Eine mögliche Erklärung könnte der Einfluss eines oder mehrerer anderer Zytokine sein, so wie z.B. die Homöostase der CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen unter dem Einfluss von IL-15 steht [Baccala et al., 2005]. Im Alter von 3 Monaten bestand in der Milz der IL-7<sup>-/-</sup> Maus eine Reduktion der Lymphozyten auf ca. ein Zehntel im Vergleich zum WT, auch die Subpopulationen sind fast alle signifikant gegenüber dem WT reduziert. Im Alter von 12 Monaten war die Anzahl der Lymphozyten der Subpopulationen, mit Ausnahme der CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen, immer noch

reduziert im Vergleich zum WT, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Organen.

Vergleicht man die Lymphozytensubpopulationen der Lunge, nimmt die Anzahl der DN T-Zellen im Alter von 12 Monaten deutlich im Vergleich zum WT und im Vergleich zu den jüngeren Mäusen zu (Abschnitt 4.2.7, 4.2.8), möglicherweise auch im Sinne von *filler cells*.

Die im Dünndarm erhobenen Daten zeigten eine Zunahme der Lymphozyten der einzelnen Subpopulationen der  $\text{TCR}\alpha\beta$ ,  $\text{TCR}\gamma\delta$ , reifen B-Zellen und B-Vorläuferzellen beim Wildtyp. In beiden Altersgruppen fiel eine deutliche Zunahme der  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  T-Zellen in Abwesenheit von IL-7 im Vergleich zum WT auf (Tabellen 4.10, 4.11), was aufgrund der Funktion, die IL-7 in der T-Zell-Differenzierung und -Homöostase einnimmt, erstaunt und auch hier den Einfluss anderer Zytokine (z.B. IL-15, TSLP) in Abwesenheit von IL-7 vermuten lässt.

Wir können die These, dass IL-7 ein nicht-redundantes Zytokin für die murine Lymphopoese ist, für die B-Lymphozyten aber nicht für T-Lymphozyten bestätigen. Mit zunehmendem Alter gibt es bezüglich der T-Zellen keine Unterschiede mehr zwischen Wildtyp- und  $\text{IL-7}^{-/-}$  Mäusen. Eine Sonderstellung nehmen die NK- und NK-like T-Zellen ein, die keine Abhängigkeit von IL-7 zeigen. Die erhöhte Anzahl DN T-Zellen in der Lunge und in der Leber gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen, ob das bronchial assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) und das gastrointestinal assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) dieser Organe möglicherweise weitere Bildungsorte für DN T-Lymphozyten neben dem Thymus sind. Um dies zu klären, sind weitere Untersuchungen insbesondere der Lunge nötig, hierfür gibt es bisher keine Daten.

$\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen sind in Abwesenheit von IL-7 in Leber, Lunge und Milz nicht vorhanden, im Darm der jungen und alten Mäuse signifikant reduziert, im Knochenmark bei 3 Monate alten  $\text{IL-7}^{-/-}$  Mäusen ebenfalls signifikant reduziert, aber im Alter von 12 Monaten ist im Knochenmark im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied mehr erkennbar. Diese  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zell-Population des Knochenmarks sollte hinsichtlich ihres genauen Rezeptoraufbaus untersucht werden. Es ist zu vermuten, dass dies um eine Untergruppe der  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen handelt, wie es z.B. auch schon für  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen in der Haut ( $\text{V}\gamma_3$ ), der Zunge ( $\text{V}\gamma_4$ ), in Lymphknoten, Milz und peripherem Blut ( $\text{V}\gamma_{1+2}$ ) bekannt ist. Aus dem Dünndarm isolierte  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen sind durch  $\text{V}\gamma_5$  charakterisiert [Baccala et al., 2005].

Die Funktion von IL-7 in Bezug auf die B-Lymphopoese scheint zumindest teilweise von anderen Zytokinen kompensiert zu werden, denn es können unter anderem reife B-Zellen in allen untersuchten Organen gemessen werden. Deren Anzahl ist in Dünndarm, Leber und Milz im Alter von 3 und 12 Monaten, im Knochenmark nur bei 3 Monate alten  $\text{IL-7}^{-/-}$  Mäusen stark reduziert, in der Lunge jedoch unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise kommt hierfür TSLP in Betracht, da es über den IL-7R bindet. Im Knochenmark detektierte reife B-Zellen könnten aus der Peripherie wieder eingewanderte B1-Zellen der Marginalzone sein. Vermutet wird, dass diese aus B1-Zellen, die peritoneal im Fötus gebildet werden, entstehen [Carvalho et al., 2001]. Um diese Hypothese zu prüfen, sind weitere Untersuchungen notwendig, z.B. die Untersuchung von Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks auf spezifische Oberflächenmarker von B1-Zellen bzw. Isolierung von B1-Zellen aus dem Knochen-

mark.

Es kann spekuliert werden, ob die Zytokine wie TSLP, die an Untereinheiten des IL-7 Rezeptors binden, Teilfunktionen von IL-7 kompensieren. Um zu klären, wie die Lymphozytenhomöostase der Organe beeinflusst wird, wenn IL-7 nicht zur Verfügung steht, sind weitere Untersuchungen notwendig. Möglicherweise hilfreich wäre die Erstellung eines organbezogenen Zytokinprofils und Zytokinrezeptorprofils in IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Es gibt einige offene Fragen: Wie verändert sich die Expression von IL-7R $\alpha$  und IL-7R $\gamma$ ? Wie verändert sich die Expression der Rezeptoren der anderen Lymphopoetine, insbesondere TSLP und IL-15? Um eine mögliche frühzeitige Alterung zu untersuchen, sollten die Daten der 12 Monate alten IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse mit Daten von ca. 3 Jahre alten Wildtypmäusen verglichen werden, dann befinden sich die Mäuse jeweils im gleichen Altersabschnitt, denn IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse werden ca. 1 Jahr, Wildtypmäuse ca. 3 Jahre alt.

## 6 Zusammenfassung

IL-7 ist ein essentielles Zytokin für die Lymphopoese. Seine bedeutende Rolle zeigt sich in der IL-7<sup>-/-</sup> Maus in einer deutlichen Reduktion der T- und B-Zellen im peripheren Blut. Es wurde eine Reduktion der TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen und ein Fehlen der TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut und Knochenmark beschrieben. Aus Dünndarmepithel von IL-7<sup>-/-</sup> Mäusen konnten jedoch TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Zellen isoliert werden. Bisher nicht beschrieben war die Verteilung der Lymphozyten in Abhängigkeit von IL-7 in anderen Organen, wie Lunge und Leber, sowie die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen in Abhängigkeit vom Alter. In dieser Arbeit wurden aus Dünndarm, Knochenmark, Lunge, Leber und Milz der IL-7<sup>+/+</sup> und IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse im Alter von 3 und 12 Monaten Einzelzellsuspensionen gewonnen und durchflusszytometrisch auf den Lymphozytengehalt untersucht. Nach Kryokonservierung der Organe, mit Ausnahme des Knochenmarks, erfolgten immunhistochemische Färbungen.

Die IL-7<sup>-/-</sup> Mäuse und ihre Organe waren deutlich untergewichtiger. Innerhalb der Organe unterschied sich die Verteilung der Lymphozyten nicht vom Wildtyp, wie die immunhistochemischen Färbungen zeigten. Die Verteilung auf die einzelnen Organe bzw. die Lymphozytensubpopulationen differierten hingegen deutlich. In fast allen Organen bestand eine Lymphopenie, jedoch nicht in der Leber und Lunge drei Monate alter Mäuse und der Lunge einjähriger Mäuse. Die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen waren in der Milz und im Knochenmark reduziert. Im Knochenmark nahm allerdings deren Anzahl, vor allem die der Gedächtniszellen, mit dem Alter bei den ko-Mäusen stärker zu als bei den Wildtypen, so dass in Abwesenheit von IL-7 auch andere Zytokine, z.B. TSLP oder IL-15, zu wirken scheinen. Auch in der Leber kommt es zu einem Zuwachs der CD4- und CD8-Subpopulationen. Die unveränderte Lymphozytenzahl in der Lunge wird durch die stark erhöhte Anzahl der DN-T Zellen erreicht, auch im Dünndarm kommt es zu einer Expansion. In der Milz, die sich im Vergleich zum WT durch eine Zytopenie auszeichnet, expandieren die DN- und NK-like T-Zellen mit dem Alter vermutlich reaktiv im Sinne sogenannter *filler cells*. Aufgrund einer verminderten Expression des TCR $\alpha\beta$  auf DN-T-Zellen wird eine extrathymische Selektion vermutet, der genaue Mechanismus ist noch zu klären. Ein weiteres Merkmal der IL-7<sup>-/-</sup>-Maus ist das Fehlen von TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T-Zellen. Dies konnten wir auch für Leber, Milz und Lunge zeigen. Im Knochenmark und im Dünndarm ist deren Anzahl stark reduziert, im Knochenmark der einjährigen Tiere jedoch auf gleichem Niveau wie beim Wildtyp. Um zu überprüfen, ob in Abwesenheit von IL-7 andere Zytokine vermehrt produziert werden oder die Lymphopoese fördern, könnte die Bestimmung eines Zytokinprofils sinnvoll sein. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten sahen wir eine von IL-7 unabhängige Verteilung und Entwicklung der NK- und NK-like T-Zellen. Die Anzahl der reifen B-Zellen ist in allen Organen reduziert. Eine nicht-redundante Abhängigkeit der Lymphopoese von IL-7 haben wir für alle untersuchten Organe, jedoch in ganz unterschiedlichem Ausmaß, bestätigen können. Unsere Daten zeigen, dass insbesondere die B- und teilweise die T-Lymphopoese abhängig von IL-7 sind, und IL-7 für reife B-Zellen weitgehend nicht-redundant ist.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AK	Antikörper
AP	Alkaline Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
BALT	bronchus associated lymphoid tissue
CD	Cluster of Differentiation
CVID	common variable immunodeficiency
DN	Doppelt-Negativ
DP	Doppelt-Positiv
FACS	Fluorescence Activated Cell sorting
GALT	gut associated lymphoid tissue
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
ko	knockout
m	männlich
MFI	main fluorescens intensity (Hauptfluoreszenzintensität)
MNC	mononuclear cell (Mononukleäre Zellen)
MW	Mittelwert
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
PB	Peripheres Blut
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SCID	severe combined immunodeficiency
Syn.	Synonym
SZT	Stammzelltransplantation
TCR	T-Zellrezeptor
TN	Tripel-Negativ
TSLP	thymic stromal derived lymphopietin
w	weiblich

## Literaturverzeichnis

- A Al-Shami, R Spolski, J Kelly, T Fry, PL Schwartzberg, A Pandey, CL Mackall, and WJ Leonard. A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development. *J Exp Med*, 200(2):159–168, Jul 2004. (Not cited.)
- R Baccala, D Witherden, R Gonzalez-Quintial, W Dummer, CD Surh, WL Havran, and AN Theofilopoulos. Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. *J Immunol*, 174(8):4606–4612, Apr 2005. (Not cited.)
- D Benjamin, V Sharma, T Knobloch, R Armitage, M Dayton, and R Goodwin. B cell IL-7. Human B cell lines constitutively secrete IL-7 and express IL-7 receptors. *J Immunol*, 152(10):4749–57, May 1994. (Not cited.)
- R Buckley, R Schiff, S Schiff, M Markert, L Williams, T Harville, J Roberts, and J Puck. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr*, 130(3):378–87, Mar 1997. (Not cited.)
- T Carvalho, T Mota-Santos, A Cumano, J Demengeot, and P Vieira. Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J Exp Med*, 194(8):1141–50, Oct 2001. (Not cited.)
- D Chantry, M Turner, and M Feldmann. Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta. *Eur J Immunol*, 19(4):783–6, Apr 1989. (Not cited.)
- B de Saint-Vis, I Fugier-Vivier, C Massacrier, C Gaillard, B Vanbervliet, S Ait-Yahia, J Banchereau, Y Liu, S Lebecque, and C Caux. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol*, 160(4):1666–76, Feb 1998. (Not cited.)
- S Dias, H Silva, A Cumano, and P Vieira. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med*, 201(6):971–9, Mar 2005. (Not cited.)
- J DiSanto, F Rieux-Laucat, A Dautry-Varsat, A Fischer, and G de Saint Basile. Defective human interleukin 2 receptor gamma chain in an atypical X chromosome-linked severe combined immunodeficiency with peripheral T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(20):9466–70, Sep 1994. (Not cited.)
- J Emile, A Durandy, FL Deist, A Fischer, and N Brousse. Epidermal Langerhans' cells in children with primary T-cell immune deficiencies. *J Pathol*, 183(1):70–4, Sep 1997. (Not cited.)

- K Eulenburg. *Die Rolle von IFN gamma in der Immunregulation*. PhD thesis, 2007. (Not cited.)
- O Feyen, U Göbel, D Schneider, SEG Burdach, and T Niehues. Long-term haematopoietic reconstitution and survival without interleukin-7 in a murine syngeneic bone marrow transplantation model. *Scand J Immunol*, 64(6):601–8, Dec 2006. (Not cited.)
- O Feyen. *Die Bedeutung von Interleukin-7 für die hämatopoetische Rekonstitution nach Knochenmarktransplantation*. PhD thesis, 2004. (Not cited.)
- JD French, CL Roark, WK Born, and RL O’Brien. Gamma-delta T cell homeostasis is established in competition with alpha-beta T cells and NK cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(41):14741–14746, Oct 2005. (Not cited.)
- M Fritsch, A Andersson, K Petersson, and F Ivars. A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4- CD8- alpha beta+ T cells from gamma delta T cell precursors. *Eur J Immunol*, 28(3):828–37, Mar 1998. (Not cited.)
- TJ Fry and CL Mackall. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol*, 174(11):6571–6576, Jun 2005. (Not cited.)
- T Fry, E Connick, J Falloon, M Lederman, D Liewehr, J Spritzler, S Steinberg, L Wood, R Yarchoan, J Zuckerman, A Landay, and C Mackall. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*, 97(10):2983–90, May 2001. (Not cited.)
- L Golden-Mason, A Kelly, O Traynor, G McEntee, J Kelly, J Hegarty, and C O’Farrelly. Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine*, 14(3):143–51, May 2001. (Not cited.)
- R Goodwin, S Lupton, A Schmierer, K Hjerrild, R Jerzy, W Clevenger, S Gillis, D Cosman, and A Namen. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(1):302–6, Jan 1989. (Not cited.)
- K Grabstein, T Waldschmidt, F Finkelman, B Hess, A Alpert, N Boiani, A Namen, and P Morrissey. Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. *J Exp Med*, 178(1):257–64, Jul 1993. (Not cited.)
- M Guimond, TJ Fry, and CL Mackall. Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J Immunother*, 28(4):289–294, 2005. (Not cited.)
- J Gutierrez-Ramos, C Olsson, and R Palacios. Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokine-mediated positive and negative regulation. *Exp Hematol*, 20(8):986–90, Sep 1992. (Not cited.)
- R Hardy, C Carmack, S Shinton, J Kemp, and K Hayakawa. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, 173(5):1213–25, May 1991. (Not cited.)

- S Hayashi, T Kunisada, M Ogawa, T Sudo, H Kodama, T Suda, S Nishikawa, and S Nishikawa. Stepwise progression of B lineage differentiation supported by interleukin 7 and other stromal cell molecules. *J Exp Med*, 171(5):1683–95, May 1990. (Not cited.)
- Y He and T Malek. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med*, 184(1):289–93, Jul 1996. (Not cited.)
- C Heufler, G Topar, A Grasseger, U Stanzl, F Koch, N Romani, A Namen, and G Schuler. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med*, 178(3):1109–14, Sep 1993. (Not cited.)
- R Hofmeister, A Khaled, N Benbernou, E Rajnavolgyi, K Muegge, and S Durum. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10(1):41–60, Mar 1999. (Not cited.)
- AM Holm, P Aukrust, JK Damås, F Müller, B Halvorsen, and SS Frøland. Abnormal interleukin-7 function in common variable immunodeficiency. *Blood*, 105(7):2887–90, Apr 2005. (Not cited.)
- Q Jiang, WQ Li, FB Aiello, R Mazzucchelli, B Asefa, AR Khaled, and SK Durum. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(4-5): 513–533, 2005. (Not cited.)
- P JM and VN S. *An Introduction to Immunocytochemistry: Current Techniques and Problems*, chapter 5.1. Oxford University Press, Oxford, 1987. (Not cited.)
- P Jourdan, J Vendrell, M Huguet, M Segondy, J Bousquet, J Pène, and H Yssel. Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells. *J Immunol*, 165(2):716–24, Jul 2000. (Not cited.)
- K Kim, C Lee, T Sayers, K Muegge, and S Durum. The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol*, 160(12):5735–41, Jun 1998. (Not cited.)
- C Kittipatarin and AR Khaled. Interlinking interleukin-7. *Cytokine*, 39(1):75–83, Jul 2007. (Not cited.)
- M Kondo, T Takeshita, M Higuchi, M Nakamura, T Sudo, S Nishikawa, and K Sugamura. Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. *Science*, 263(5152):1453–4, Mar 1994. (Not cited.)
- R Kühn, K Rajewsky, and W Müller. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 254(5032):707–10, Nov 1991. (Not cited.)
- K Laky, L Lefrançois, E Lingenheld, H Ishikawa, J Lewis, S Olson, K Suzuki, R Tigelaar, and L Puddington. Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of

- gammadelta T cells and Peyer's patches. *J Exp Med*, 191(9):1569–80, May 2000. (Not cited.)
- L Lefrançois and L Puddington. Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality? *Immunol Today*, 16(1):16–21, Jan 1995. (Not cited.)
- WJ Leonard. Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(1):42–3, 2005. (Not cited.)
- S Lupton, S Gimpel, R Jerzy, L Brunton, K Hjerrild, D Cosman, and R Goodwin. Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol*, 144(9):3592–601, May 1990. (Not cited.)
- D Lynch and R Miller. Interleukin 7 promotes long-term in vitro growth of antitumor cytotoxic T lymphocytes with immunotherapeutic efficacy in vivo. *J Exp Med*, 179(1):31–42, Jan 1994. (Not cited.)
- C Mackall, T Fry, C Bare, P Morgan, A Galbraith, and R Gress. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*, 97(5):1491–7, Mar 2001. (Not cited.)
- L Madrigal-Estebas, R McManus, B Byrne, S Lynch, D Doherty, D Kelleher, D O'Donoghue, C Feighery, and C O'Farrelly. Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol*, 58(2):83–90, Dec 1997. (Not cited.)
- K Maki, S Sunaga, Y Komagata, Y Kodaira, A Mabuchi, H Karasuyama, K Yokomuro, J Miyazaki, and K Ikuta. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gamma-delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(14):7172–7, Jul 1996. (Not cited.)
- CD Milne, HE Fleming, and CJ Paige. Frontline: IL-7 does not prevent pro-B/pre-B cell maturation to the immature/sIgM(+) stage. *Eur J Immunol*, 34(10):2647, Oct 2004a. (Not cited.)
- CD Milne, HE Fleming, Y Zhang, and CJ Paige. Mechanisms of selection mediated by interleukin-7, the preBCR, and hemokinin-1 during B-cell development. *Immunol Rev*, 197:75–88, Feb 2004b. (Not cited.)
- T Moore, U von Freeden-Jeffry, R Murray, and A Zlotnik. Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7  $-/-$  mice. *J Immunol*, 157(6):2366–73, Sep 1996. (Not cited.)
- P Morrissey, R Goodwin, R Nordan, D Anderson, K Grabstein, D Cosman, J Sims, S Lupton, B Acres, and S Reed. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *J Exp Med*, 169(3):707–16, Mar 1989. (Not cited.)
- P Morrissey, P Conlon, S Braddy, D Williams, A Namen, and D Mochizuki. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol*, 146(5):1547–52, Mar 1991. (Not cited.)

- A Namen, S Lupton, K Hjerrild, J Wignall, D Mochizuki, A Schmierer, B Mosley, C March, D Urdal, and S Gillis. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*, 333(6173):571–3, Jun 1988a. (Not cited.)
- A Namen, A Schmierer, C March, R Overell, L Park, D Urdal, and D Mochizuki. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med*, 167(3):988–1002, Mar 1988b. (Not cited.)
- T Niehues, B Gulwani-Akolkar, P Akolkar, W Tax, and J Silver. Unique phenotype and distinct TCR V beta repertoire in human peripheral blood alpha beta TCR+, CD4-, and CD8- double negative T cells. *J Immunol*, 152(3):1072–81, Feb 1994. (Not cited.)
- T Niehues, D Eichelbauer, and E Schneider. Functional characteristics of human peripheral blood alpha/betaTCR+, CD4- and CD8- double-negative (DN) T cells. *Microbiol Immunol*, 43(2):153–9, 1999. (Not cited.)
- H Okazaki, M Ito, T Sudo, M Hattori, S Kano, Y Katsura, and N Minato. IL-7 promotes thymocyte proliferation and maintains immunocompetent thymocytes bearing alpha beta or gamma delta T-cell receptors in vitro: synergism with IL-2. *J Immunol*, 143(9):2917–22, Nov 1989. (Not cited.)
- J Peschon, P Morrissey, K Grabstein, F Ramsdell, E Maraskovsky, B Gliniak, L Park, S Ziegler, D Williams, and C Ware. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*, 180(5):1955–60, Nov 1994. (Not cited.)
- A Puel, S Ziegler, R Buckley, and W Leonard. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*, 20(4):394–7, Dec 1998. (Not cited.)
- C Roifman, J Zhang, D Chitayat, and N Sharfe. A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency. *Blood*, 96(8):2803–7, Oct 2000. (Not cited.)
- B Sadlack, R Kühn, H Schorle, K Rajewsky, W Müller, and I Horak. Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4. *Eur J Immunol*, 24(1):281–4, Jan 1994. (Not cited.)
- T Sakata, S Iwagami, Y Tsuruta, H Teraoka, Y Tatsumi, Y Kita, S Nishikawa, Y Takai, and H Fujiwara. Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol*, 48(3):205–12, Sep 1990. (Not cited.)
- KS Schluns, T Stoklasek, and L Lefrançois. The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol*, 37(8):1567–1571, Aug 2005. (Not cited.)

- H Schorle, T Holtshcke, T Hünig, A Schimpl, and I Horak. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*, 352 (6336):621–4, Aug 1991. (Not cited.)
- J Schwarzkopf. *Die Rolle von Interferon gamma bei der Tumorabwehr*. PhD thesis, 2001. (Not cited.)
- R Sorg, A McLellan, B Hock, D Fearnley, and D Hart. Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology*, 198(5):514–26, Mar 1998. (Not cited.)
- T Suda and A Zlotnik. IL-7 maintains the T cell precursor potential of CD3-CD4-CD8-thymocytes. *J Immunol*, 146(9):3068–73, May 1991. (Not cited.)
- T Sudo, M Ito, Y Ogawa, M Iizuka, H Kodama, T Kunisada, S Hayashi, M Ogawa, K Sakai, and S Nishikawa. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med*, 170(1):333–8, Jul 1989. (Not cited.)
- T Sudo, S Nishikawa, N Ohno, N Akiyama, M Tamakoshi, H Yoshida, and S Nishikawa. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19):9125–9, Oct 1993. (Not cited.)
- T Tada, N Inoue, DT Widayati, and K Fukuta. Role of MAdCAM-1 and its ligand on the homing of transplanted hematopoietic cells in irradiated mice. *Exp Anim*, 57(4):347–356, Jul 2008. (Not cited.)
- JT Tan, B Ernst, WC Kieper, E LeRoy, J Sprent, and CD Surh. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med*, 195(12):1523–32, Jun 2002. (Not cited.)
- B Thomas, editor. *Immunohistochemical Staining Methods*. DAKO Corporation, 3rd edition, 2001. (Not cited.)
- Trinder and Markus. *Interleukin-7*, chapter 13, pages 305–345. Elsevier Science Ltd., 2004. (Not cited.)
- A Vicari, A Herbelin, ML de Moraes, UV Freeden-Jeffry, R Murray, and A Zlotnik. NK1.1+ T cells from IL-7-deficient mice have a normal distribution and selection but exhibit impaired cytokine production. *Int Immunol*, 8(11):1759–66, Nov 1996. (Not cited.)
- U von Freeden-Jeffry, P Vieira, L Lucian, T McNeil, S Burdach, and R Murray. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med*, 181(4):1519–26, Apr 1995. (Not cited.)
- U von Freeden-Jeffry, N Solvason, M Howard, and R Murray. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*, 7(1):147–54, Jul 1997. (Not cited.)

- J Watson, P Morrissey, A Namen, P Conlon, and M Widmer. Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. *J Immunol*, 143(4):1215–22, Aug 1989. (Not cited.)
- M Wiles, P Ruiz, and B Imhof. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol*, 22(4):1037–42, Apr 1992. (Not cited.)
- Z Zhang, K Young, and L Zhang. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med*, 79(8):419–27, Aug 2001. (Not cited.)
- S Ziegler, K Morella, D Anderson, N Kumaki, W Leonard, D Cosman, and H Baumann. Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction. *Eur J Immunol*, 25(2):399–404, Feb 1995. (Not cited.)

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Astrid Ganzow, geb. Stienen

Geboren am 11.04.1979 in Rheinberg  
verheiratet, deutsch

## Schulbildung

08/1985 – 06/1989 Grundschule, Duisburg-Baerl

08/1989 – 06/1999 Gymnasium Adolfinum, Moers, Abschluss: Abitur

## Studium

10/1999 – 09/2004 Studium der Humanmedizin, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

10/2004 – 09/2005 Studium der Humanmedizin, RWTH Aachen

08/2001 Physikum

08/2002 Erstes Staatsexamen

08/2004 Zweites Staatsexamen

09/2005 Drittes Staatsexamen

## Praktisches Jahr

10/2004 – 01/2005 Kinder und Jugendmedizin, UK Aachen

02/2005 – 05/2005 Chirurgie, Spital Riggisberg, Schweiz

05/2005 – 08/2005 Innere Medizin, Kreuzspital Chur, Schweiz

## Berufliche Laufbahn

12/2005 – 06/2009 Assistenzärztin, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UK Aachen

07/2009 – 06/2011 Forschungsrotation; Laboratory of lymphocyte signaling, Prof. Tarakhovsky, Rockefeller University, New York, NY

seit 07/2011 Assistenzärztin, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UK Aachen

Aachen, 3. August 2011

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Tim Niehues danken für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche und persönliche Betreuung während der gesamten Arbeit.

Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt und seinem Vorgänger Prof. Dr. med. Ulrich Göbel danke ich für die Möglichkeit an der Klinik für Kinderonkologie, - Hämatologie und Klinische Immunologie promovieren zu dürfen und für die Bereitstellung der dazu notwendigen Ressourcen.

Mein großer Dank gilt dem Team des Kinder-Immunlabors im Schlossmannhaus, besonders Herrn Dr. rer. nat. Oliver Feyen für die Einweisung in die experimentelle Methodik sowie für die immer freundliche Hilfestellungen in Organisation und Durchführung der Untersuchungen, sowie Herrn Sven Bellert für die nette Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey danke ich für die Übernahme der Korreferats und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor.

Danke meinem Mann und bestem Freund Tobias für die vielen tröstenden und aufbauenden Worte, seine Unterstützung zu jeder Zeit und für die Hilfe mit  $\text{\LaTeX}$ .

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich meinen Weg haben gehen lassen und immer an mich geglaubt haben.