

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES THYMUS UND DES
PERIPHEREN IMMUNSYSTEMS BEI DER TCDD-
VERMITTELTEN IMMUNSUPPRESSION**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marc Majora

aus

Neuss

Mai 2006

II

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. C. Esser

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.06

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	XIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus.....	3
1.2 Emigration und Zirkulation der T-Zellen.....	9
1.3 Die Induktion von Immunantworten durch dendritische Zellen (DZs).....	11
1.4 Die Beeinflussung von Thymus und peripherem Immunsystem durch halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAKs).....	13
1.5 Der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) als Vermittler der HAK-Toxizität.....	16
1.6 Fragestellung.....	18
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Versuchstiere.....	21
2.2 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.3 Puffer und Kulturmedium.....	21
2.4 Antikörper und Microbeads.....	22
2.5 Zellbiologische Methoden.....	24
2.5.1 Zentrifugation von Zellen.....	24
2.5.2 Bestimmung der Zellzahl.....	24
2.5.3 Fötale Thymusorgankultur (FTOC).....	24
2.5.3.1 Isolation von fötalen Thymusemigranten.....	25

2.5.3.2	Isolation von fötalen Thymuslappenzellen (Thymozyten).....	25
2.5.4	Herstellung von Milz-, Thymus- und Lymphknoten-Zellsuspensionen.....	26
2.5.5	Isolation von Immunzellen aus dem Blut neugeborener Mäuse.....	26
2.5.6	Magnetische Zellseparation.....	27
2.5.6.1	Isolation von antigenpräsentierenden Zellen (APZ).....	27
2.5.6.2	Isolation von CD4 ⁺ -T-Zellen.....	27
2.5.6.3	Isolation von fötalen CD4 ⁻ CD8 ⁻ (DN)-Emigranten und Thymozyten.....	28
2.5.6.4	Isolation von fötalen DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten und Thymozyten.....	28
2.5.7	Proliferationstests.....	29
2.5.7.1	Radioaktive Messung der Proliferation.....	29
2.5.7.2	Messung der Proliferation mit CFSE.....	30
2.6	Immunfluoreszenz	30
2.6.1	Zellfärbung mit fluorochromgekoppelten Antikörpern.....	30
2.6.2	Apoptose-Messung mit Annexin V.....	31
2.6.3	Durchflusszytometrische Analyse.....	32
2.7	Molekularbiologische Methoden	33
2.7.1	RNA-Isolation aus fötalen DN-Emigranten.....	33
2.7.2	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	34
2.7.3	Gelelektrophoretische Qualitätskontrolle der RNA.....	34
2.7.4	RNA-Amplifikation.....	34
2.7.5	Probenvorbereitung und Genexpressionsanalyse mit der Affymetrix- Microarray-Technik.....	36
2.7.6	Auswertung der Microarrays.....	37
2.8	<i>In vivo</i>-Behandlung von Mäusen	37
2.8.1	TCDD-Injektion.....	37
2.8.2	Thymektomie von adulten Mäusen (ATX).....	38
2.8.3	Induktion der Kontaktsensibilisierung (CHS-Reaktion).....	38
2.7.3.1	Zellzyklus-Analyse im aurikulären LN während der CHS-Reaktion....	39
2.8.4	Intrathymische FITC-Injektion und Detektion der Emigranten.....	40
2.8.5	<i>In vivo</i> -Migrations-Assay für dendritische Zellen (DZs).....	41
2.9	Statistische Analyse	42

3. ERGEBNISSE	43
3.1 TCDD induziert eine präferentielle Emigration von DN-Zellen in der FTOC.....	43
3.2 TCDD erhöht den relativen Anteil an TZR$\gamma\delta^+$-NKT-Zellen in fötalen DN-Thymozyten und Emigranten.....	49
3.3 TCDD induziert einen CD44^{stark}CD25^{int}-Phänotyp in DN-TZR$\gamma\delta^+$- und TZR$\gamma\delta^-$-Thymozyten und Emigranten.....	54
3.4 Emigrierte DN-TZR$\gamma\delta^+$-Zellen besitzen suppressive Eigenschaften <i>in vitro</i>.....	60
3.5 TCDD beeinflusst das Genexpressionsprofil von DN-Emigranten.....	64
3.6 TCDD führt <i>in vivo</i> nicht zu einer verstärkten Generierung von DN-TZR$\gamma\delta^+$- oder DN1b-Zellen im Thymus.....	68
3.7 ATX kann die TCDD-induzierte Suppression der CHS-Reaktion nicht verhindern.....	72
3.8 TCDD supprimiert die Aktivierung von T- und B-Zellen im drainierenden LN während der CHS-Reaktion.....	75
3.9 Die Immigration von Thymusemigranten (RTEs) in den drainierenden LN spielt eine untergeordnete Rolle für die Zunahme der Zellularität während der CHS-Reaktion.....	77
3.10 TCDD führt zu einer Reduktion dendritischer Zellen (DZs) und induziert in ihnen die Herabregulation von CD80 und CD86 im drainierenden LN während der CHS-Reaktion.....	79
3.11 Verminderte Proliferation oder verstärkte Apoptose im drainierenden LN spielen keine bedeutende Rolle für die TCDD-vermittelte Reduktion der DZs während der CHS-Reaktion.....	82
3.12 TCDD verhindert, dass Antigen-beladene DZs den drainierenden LN während der CHS-Reaktion erreichen.....	87

4. DISKUSSION	95
5. LITERATURVERZEICHNIS	125
6. ANHANG	155

ABKÜRZUNGEN

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
ACAID	Anterior-chamber associated immune deviation
ACT	Ammoniumchlorid-Tris
AhR	Arylhydrokarbonrezeptor
AICD	Activation-induced cell death
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ARNT	AhR-Nukleus-Translokator
ATX	Thymektomie im adulten Alter
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix
BrdU	Bromdesoxyuridin
cDNA	komplementäre DNA
CD	cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
CHS	Kontaktsensibilisierung
DMBA	9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DN	doppelt negativ (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DNFB	Dinitrofluorobenzol
DP	doppelt positiv (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
DRE	Dioxin-responsives Element
_{ds} cDNA	doppelsträngige cDNA
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ETO	effective thymic output
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

X

FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
FTOC	fötale Thymusorgankultur
FTS	synthetic thymic factor
α -GalCer	α -Galaktosylceramid
HAKs	halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
HSA	Hitze-stabiles Antigen (CD24)
i.p.	intraperitoneal
IEL	intestinale epitheliale Lymphozyten
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
LN	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnet-assisted cell sorter
MEST	Maus-Ohrschwellungstest
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
NK(T)-Zellen	Natürliche Killer(-T)-Zellen
NOD	non-obese diabetic
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RAG-1	Rekombinations-aktivierendes Gen 1
RT	Raumtemperatur
RTEs	Recent thymic emigrants
SD	Standardabweichung
SEM	Standard error of mean
Sensib.	Sensibilisierung
SP	einfach positiv (CD4 ⁺ oder CD8 ⁺)
SRBCs	sheep red blood cells
SSC	Seitwärtsstreulicht

TAE	Tris-Acetat-Puffer
TCB	3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TL	Thymuslappen
TZR	T-Zellrezeptor

ZUSAMMENFASSUNG

Die Exposition mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), dem giftigsten Vertreter der halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAKs), führt zu einer Schädigung des Immunsystems. Dabei kommt es u.a. zur Entstehung einer allgemeinen Immunsuppression und zur Beeinträchtigung einer Reihe von Prozessen im Thymus einschließlich Proliferation, Differenzierung, Selektion und Emigration. Bisherige Studien konnten nicht eindeutig klären, ob zwischen diesen beiden Phänomenen ein Zusammenhang besteht.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von TCDD auf die Differenzierung und Emigration von murinen Thymozyten in der fötalen Thymusorgankultur (FTOC) untersucht. Unter dem Einfluss von TCDD kommt es zu einer Entwicklungsstörung im fötalen Thymus, die zur Anreicherung einer ungewöhnlichen Population von CD44^{stark}CD25^{int}-Zellen (DN1b) unter den CD4⁻CD8⁻ („doppelt negativen“; DN) -Thymozyten führt, von denen viele T-Zell-Rezeptor (TZR) $\gamma\delta^+$ und im späteren Kulturverlauf auch NK1.1⁺ waren. Die TCDD-induzierte Differenzierungsblockade geht einher mit einer präferentiellen Emigration von DN1b-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen. Unabhängig davon, ob die DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten TCDD-behandelt oder unbelastet waren, konnten sie die Proliferation von ko-kultivierten aktivierten CD4⁺-T-Zellen infolge ihrer eigenen starken Teilungsaktivität *in vitro* moderat supprimieren. In neugeborenen Mäusen, die *in utero* mit TCDD exponiert worden waren, konnte dagegen weder im Thymus noch in der Peripherie eine Zunahme einer solchen Population gefunden werden. Viel mehr zeigten sowohl Lymphozyten als auch Granulozyten in Milz und Blut dieser Tiere eine reduzierte Expression von CD25, was indirekt auf eine TCDD-induzierte Minderung ihrer Immunfunktion schließen lässt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle des Thymus bei der TCDD-vermittelten Suppression der Kontaktsensibilisierung (CHS-Reaktion) anhand des Mausohrschwellungstests (MEST) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der Thymus nicht notwendig für die Entstehung der TCDD-induzierten Suppression, dagegen aber scheinbar wichtig für die Prävention einer Suppression dieser Immunantwort ist, da in thymektomierten Mäusen ebenfalls eine verminderte CHS-Reaktion detektiert wurde. Von entscheidender Bedeutung in diesem Zusammenhang ist offenbar, dass TCDD – ebenso wie die Entfernung des Thymus – Antigen-beladene dendritische Zellen (DZs) am Erreichen der drainierenden Lymphknoten (LN) hindert, was

dementsprechend zu einer Reduktion der LN-Zellularität und einer verringerten Ohrschwellung führt. Diese Resultate zeigen eine bisher unbekannte Funktion des Thymus und demonstrieren einen neuen Mechanismus, der von großer Bedeutung für die Erklärung der TCDD-induzierten Immunsuppression sein dürfte.

1. Einleitung

Zahlreiche Chemikalien sind in der Lage, im exponierten Organismus die Induktion von Immunreaktionen zu unterbinden bzw. eine Reihe unerwünschter und zum Teil schädlicher Immunreaktionen auszulösen, wodurch Allergien, Autoimmunität oder Immunsuppression die Folge sein können.

Im Mittelpunkt der Immuntoxikologie steht die Untersuchung der Auswirkung von Xenobiotika und exogenen Noxen auf das Immunsystem und die Frage, inwiefern diese mit den natürlich ablaufenden physiologischen Prozessen der partizipierenden Komponenten interferieren. Bekanntermaßen reagiert das Immunsystem auf zahlreiche Fremdstoffe bereits bei geringen Mengen außerordentlich empfindlich (1,2), was sich im exponierten Organismus beispielsweise in einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber bestimmten infektiösen Pathogenen äußern und sowohl den Verlauf von humoral als auch zellulär vermittelten Immunantworten beeinträchtigen kann. Eine immuntoxikologisch relevante Substanzklasse ist die Familie der halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAKs), deren prominentester – und zugleich auch giftigster – Vertreter 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) ist, das unter der Bezeichnung „Seveso-Gift“ Bekanntheit erlangte.

Der Thymus ist ein besonders empfindliches Organ für eine TCDD-Exposition. Er ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen und repräsentiert das zentrale primäre lymphatische Organ neben dem Knochenmark. Den reifen T-Zellen kommen nach ihrer Emigration aus dem Thymus als Effektorzellen in der Peripherie Schlüsselrollen bei der Vermittlung von humoralen und zellvermittelten Immunantworten – und somit für die Aufrechterhaltung der gesamten adaptiven Immunität – zu.

Zu den auffälligsten Effekten, die eine Exposition mit TCDD hervorruft und die bei einer Vielzahl unterschiedlicher Spezies nachgewiesen werden konnten, gehört zum einen die Atrophie der lymphatischen Organe – insbesondere des Thymus – und zum anderen eine allgemeine Immunsuppression. Man spricht von Immunsuppression, wenn das Immunsystem aufgrund gegebener Umstände (z.B. Einwirkung von γ -Strahlung oder immunsuppressiver Substanzen) weniger effizient als gewöhnlich funktioniert, was sich beispielsweise in einer gesteigerten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten oder der Entwicklung von Tumoren, aber auch in Form

eines verlängerten Krankheitszustandes äußern kann. Allerdings kann Immunsuppression auf der anderen Seite auch ein vorteilhafter Zustand für die betroffene Person sein und medizinisch bewusst herbeigeführt werden, um z.B. die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern bzw. die Leiden von Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Allergien zu lindern. Für die Messung der Immunsuppression stehen eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. Als geeignete Parameter zur funktionellen Analyse von T-Zellen kommen beispielsweise die Messung der IL-2- (oder generell Zytokin-) Produktion oder der Proliferationsfähigkeit in Frage, während für B-Zell-vermittelte Immunantworten neben der Proliferation vor allem die Quantifizierung der spezifischen Antikörper-Produktion von Bedeutung ist.

Obwohl das Phänomen der TCDD-induzierten Immunsuppression bereits seit mehr als 30 Jahren bekannt und seitdem Gegenstand intensiver Forschung geworden ist, konnte der oder die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nicht entschlüsselt werden. Mehrere Studien konnten zwar belegen, dass – neben den vielschichtigen toxischen Effekten auf den Thymus – sowohl T-Zellen als auch B-Zellen und dendritische Zellen (DZs) in der Peripherie direkte Angriffsziele von TCDD darstellen, aber dennoch traten immer wieder Diskrepanzen und (scheinbare) Widersprüche im Vergleich von *in vitro*- und *in vivo*-Daten auf, die es schwer machten, aus diesen Ergebnissen eine plausible Theorie für den Mechanismus der TCDD-vermittelten Immunsuppression zu erstellen. Nach wie vor ist unklar, ob der Thymus in irgendeiner Weise an der TCDD-vermittelten Immunsuppression beteiligt ist oder ob dieses Phänomen durch Effekte in der Peripherie zu erklären ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Hinweise für eine Beteiligung des Thymus an der TCDD-vermittelten Immunsuppression zu finden, bzw. eine solche zu widerlegen.

1.1 Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus

Der Thymus ist das wichtigste Organ für die Entwicklung von T-Zellen und die Aufrechterhaltung der Homöostase des peripheren T-Zell-Pools, auch wenn ein Teil der T-Zellen außerhalb des Thymus generiert wird (3). Er befindet sich im oberen vorderen Mediastinum, direkt über dem Herz, und besteht aus zwei miteinander verbundenen Lappen. Jeder Lappen wird von einer aus Bindegewebe bestehenden Kapsel umschlossen, von der zahlreiche Septen in den Innenraum hineinragen. Auf diese Weise wird jeder Thymuslappen in eine Vielzahl von miteinander in Verbindung stehenden Kammern unterteilt, den Lobuli. Jeder Lobulus lässt sich wiederum in eine äußere Rindenregion (Kortex) und das zentral liegende Mark (Medulla) unterteilen.

Die Besiedelung des Thymus mit hämatopoetischen Zellen während der Ontogenese der Maus beginnt nach ca. 12 Trächtigkeitstagen mit der Immigration von pluripotenten Prothymozyten, die zunächst aus dem embryonalen Dottersack und später aus der fötalen Leber in das Gewebe einwandern (4). In der adulten Maus stammen die Prothymozyten aus dem Knochenmark. Schätzungsweise 50-100 dieser Vorläuferzellen gelangen pro Tag über das Blut in die kortikalen Regionen des Thymus (5). Im Thymus bilden epitheliale Zellen, Makrophagen und DZs ein auch als Stroma bezeichnetes Netzwerk, das eine einzigartige Umgebung für die T-Zell-Entwicklung bietet (siehe Ref. 6 für eine Übersicht). Interessanterweise beeinflussen die unreifen T-Zellen in diesem Zusammenhang selbst die Ausbildung des für ihre eigene Reifung benötigten kortikalen Thymusmilieus (6,7), ein Phänomen, das auch als „thymic crosstalk“ bezeichnet wird und dessen biologische Grundlagen zur Zeit noch völlig unklar sind. Im Thymus verlieren die eingewanderten Prothymozyten das Potential, sich zu B-Zellen (8) oder NK-Zellen zu entwickeln (9). In diesem frühen Entwicklungsstadium fehlen den Zellen noch die für reife T-Zell-Rezeptor (TZR) $\alpha\beta$ -positive T-Zellen charakteristischen Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8. Man bezeichnet solche Zellen deshalb auch als „doppelt negativ“ (DN). Die unreifen DN-Thymozyten repräsentieren eine heterogene Zellpopulation, die anhand der Expression der Marker CD25 (IL-2-Rezeptor- α -Kette) und CD44 in vier Subklassen unterschiedlichen Reifegrades differenziert werden kann. Der generell akzeptierte Ablauf der Entwicklung beginnt mit dem $CD44^+CD25^-$ -Stadium (DN1), verläuft über $CD44^+CD25^+$ (DN2) und $CD44^-CD25^+$ (DN3) bis zum $CD44^-CD25^-$ -Phänotyp (DN4)

(10). In einer aktuellen Studie ist es darüber hinaus gelungen, DN1-Thymozyten aufgrund des Expressionsmusters von CD24 und CD117 (c-kit) in fünf weitere Subpopulationen mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften zu unterteilen (11). Aus den unreifen DN-T-Zellen können sich in einem komplexen Prozess aus Proliferation und Differenzierung sowohl Zellen entwickeln, die den TZR $\alpha\beta$ exprimieren, als auch solche, die den TZR $\gamma\delta$ tragen (12). Die DN-Zellen differenzieren über CD4^{schwach}CD8⁻- bzw. CD4⁻CD8^{schwach}-Stadien (13) zum CD4⁺CD8⁺-Phänotyp („doppelt positiv“; DP). In diesem Stadium exprimieren die Zellen erstmals in geringer Dichte den TZR $\alpha\beta$ auf ihrer Oberfläche (14,15), sofern sie zuvor die Rekombination der α - und β -Kettengene erfolgreich durchgeführt haben. Die DP-TZR $\alpha\beta$ -T-Zellen interagieren mit kortikalen epithelialen Thymuszellen, die große Mengen an MHC (Major histocompatibility complex)-Klasse I- und II-Molekülen in Assoziation mit körpereigenen (Selbst-) Peptiden auf ihrer Oberfläche tragen (16). Das Schicksal der DP-Thymozyten hängt von der Art des Signals ab, das durch die Interaktion des TZR mit diesen Selbst-Peptid-MHC-Liganden zustande kommt (12,17). Dabei erhalten nur diejenigen DP-Thymozyten ein Überlebenssignal, deren TZR an Selbst-Peptid-MHC-Komplexe binden kann. Man bezeichnet diesen von den kortikalen Epithelzellen des Thymus vermittelten Prozess als positive Selektion (18). Zellen, die nur schwach oder gar nicht mit den Selbst-Peptid-MHC-Liganden interagieren, sterben innerhalb von drei bis vier Tagen durch Apoptose (19), ein Phänomen, das auch als „Tod durch Vernachlässigung“ bezeichnet wird. Im Rahmen der positiven Selektion regulieren die DP-Zellen in Abhängigkeit davon, welche Art von MHC-Molekülen sie erkennen, entweder die Expression des CD4- oder des CD8-Korezeptors herunter (20). Die resultierenden TZR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻-T-Zellen (T-Helfer-Zellen) erkennen Antigene, die von MHC-Molekülen der Klasse II präsentiert werden, während die TZR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁺-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) für die Antigenerkennung in Kombination mit MHC-Molekülen der Klasse I restringiert sind. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass im Thymus allerdings auch noch eine kleine Population von TZR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻-T-Zellen entsteht (so genannte CD4⁺CD25⁺-Zellen; ~ 5% aller reifen CD4⁺-Thymozyten), die nicht zu den T-Helfer-Zellen zählt und stattdessen mittels ihrer regulatorische Fähigkeiten an der Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt ist. Periphere Toleranz beschreibt einen Zustand, der gewährleistet, dass körpereigene Strukturen nicht zum Angriffsziel des Immunsystems werden. Depletion oder Fehlfunktion regulatorischer

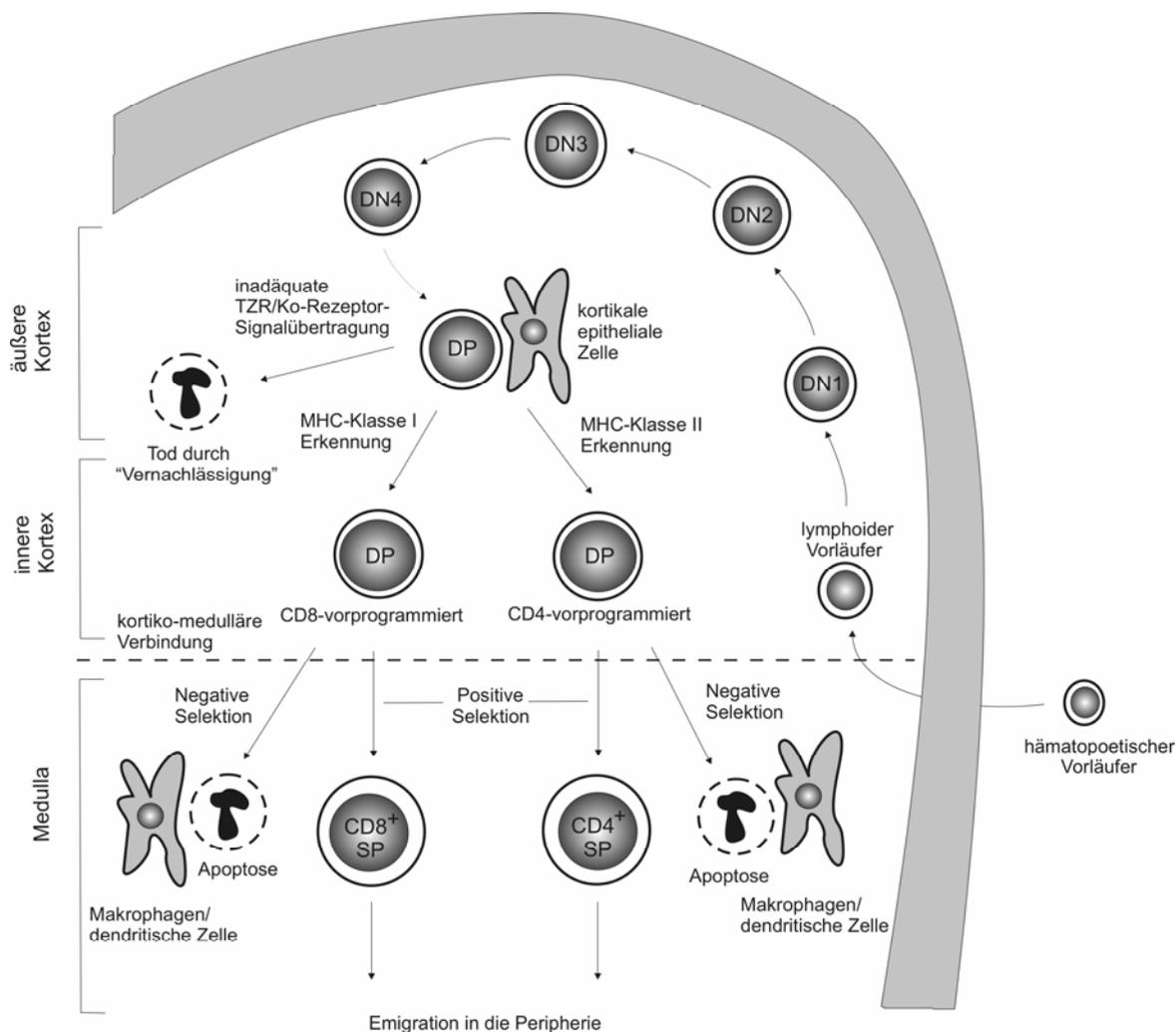


Abb. A: Die T-Zell-Entwicklung im Thymus. Die Vorläufer der T-Zellen entstehen im Knochenmark und wandern in den Thymus ein. In diesem frühen Stadium exprimieren diese Zellen weder den TZR noch CD4 oder CD8 und werden als „doppelt negativ (DN)“ bezeichnet. DN-Thymozyten können in vier Subpopulationen unterschiedlichen Differenzierungsgrades unterteilt werden (DN1, $CD44^+CD25^-$; DN2, $CD44^+CD25^+$; DN3, $CD44^-CD25^+$; DN4, $CD44^-CD25^-$). Nach erfolgreicher Rekombination der α - und β -Kettengene exprimieren die T-Zellen sowohl CD4 als auch CD8 [„doppelt positiv (DP)“] und werden der positiven und negativen Selektion unterzogen. Die überlebenden T-Zellen emigrieren als einfach positive $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -Zellen aus dem Thymus in die Peripherie (modifiziert nach Germain, 2002).

Zellen führt zur Durchbrechung der peripheren Toleranz, verbunden mit der Ausprägung eines variierenden Spektrums an Autoimmunerkrankungen (21,22).

Unter den T-Zellen, die die positive Selektion überstehen, befindet sich auch eine kleine Fraktion (ca. 5%), deren TZR eine hohe Affinität für Selbst-Peptid-MHC-Komplexe bzw. für Selbst-MHC-Moleküle allein aufweist (16). Da solche T-Zellen

potentiell autoreaktiv sind und deshalb körpereigenes Gewebe schädigen können, muss ihre Emigration in die Peripherie nach Möglichkeit verhindert werden. Dies geschieht im wesentlichen durch einen als negative Selektion bezeichneten Mechanismus, der durch DZs und Makrophagen in der Medulla des Thymus vermittelt wird (23) und die akute Apoptose der entsprechenden T-Zellen zur Folge hat. Schätzungen zufolge sterben 99% aller sich entwickelnden T-Zellen im Thymus durch Apoptose, weil sie entweder die Selektion nicht überstehen oder keine produktive TZR-Gen-Rekombination durchführen konnten (19). Durch die beiden Selektionsprozesse im Thymus wird zum einen gewährleistet, dass die emigrierenden T-Zellen Selbst-MHC-restringiert, also voll funktionstüchtig sind, und zum anderen, dass sie selbsttolerant sind und deshalb keine Autoimmunreaktionen hervorrufen. Der Prozess der T-Zell-Entwicklung ist stark vereinfacht in Abb. A dargestellt.

Neben den T-Zellen, die den TZR $\alpha\beta$ exprimieren, können im Thymus auch solche entstehen, die den TZR $\gamma\delta$ auf ihrer Oberfläche tragen, wobei sich die Vorläufer dieser beiden T-Zell-Klassen innerhalb der unreifen DN-Population befinden (24,25). Die TZR $\gamma\delta$ -Zellen unterscheiden sich von den TZR $\alpha\beta$ -Zellen in mehrfacher Hinsicht. Untersuchungen an fötalen Thymozyten lassen darauf schließen, dass die Rekombination der γ - und δ -TZR-Gene früher abgeschlossen ist als bei den α - und β -TZR-Genen (26). Vollständige Rekombinationen der γ -, δ - und β -TZR-Gene können erstmals in DN3-Zellen nachgewiesen werden (27), während dieser Prozess bei den α -TZR-Genen erst im späten DN4-Stadium beendet ist (28). Die ersten T-Zellen, die während der Embryonalentwicklung entstehen, tragen den TZR $\gamma\delta$ (29,30). TZR $\gamma\delta$ -Zellen erscheinen in distinkten Wellen, wobei die Zellen jeder einzelnen Welle spezifische TZR γ -Gensegmente exprimieren und unterschiedliche Gewebe im Organismus besiedeln. In den meisten adulten Tieren machen TZR $\gamma\delta$ -Zellen nur etwa 1 – 5% der T-Zellpopulation aus, die durch das Blut und die peripheren Organe zirkuliert, aber in epithelreichen Geweben wie Haut oder Darm kann ihr Anteil bis zu 50% betragen (31). Weitere Unterschiede zu den TZR $\alpha\beta$ -Zellen bestehen darin, dass sich TZR $\gamma\delta$ -Zellen für gewöhnlich nach erfolgreichem Rearrangement der entsprechenden TZR-Gensegmente nicht zu DP-Zellen differenzieren und stattdessen den DN-Phänotyp beibehalten [intestinale intraepitheliale TZR $\gamma\delta$ -Zellen

sind allerdings CD8⁺ (32)], dass ihre Entwicklung sowohl thymusabhängig als auch -unabhängig verlaufen kann und dass sie zumeist nicht MHC-restringiert sind (33,34). Das bedeutet, dass TZR $\gamma\delta$ -Zellen nicht der positiven Selektion unterworfen sind und ihre Antigenerkennung keine Prozessierung erfordert. Außerdem können TZR $\gamma\delta$ -Zellen – ähnlich wie Antikörper – lösliche Proteine sowie Nicht-Proteine wie Pyrophosphate und Alkylamine erkennen, die in Bakterien, Pflanzen aber auch tierischen Zellen vorkommen (35,36). Obwohl die Funktionen von TZR $\gamma\delta$ -Zellen nur teilweise verstanden sind, zeichnet sich ab, dass sie (oder zumindest einige Subpopulationen) regulatorische Aufgaben erfüllen, die das Ausmaß von Immunreaktionen begrenzen sollen. Studien an TZR $\gamma\delta$ -Zell-defizienten Mäusen konnten demonstrieren, dass diese Tiere bei bestimmten bakteriellen Infektionen eine verstärkte inflammatorische Reaktion zeigten, die durch Lebernekrose, sekundäre Entzündungen und Störung der Makrophagen-Homöostase charakterisiert ist (37-39). Auch bei der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen scheinen TZR $\gamma\delta$ -Zellen eine Rolle zu spielen. So konnte in NOD (Non-obese diabetic)-Mäusen, die spontan Diabetes entwickeln, gezeigt werden, dass intranasale Inhalation von Proinsulin zur Bildung einer Population von regulatorischen TZR $\gamma\delta$ -Zellen führt, die den Ausbruch der Krankheit unterdrücken kann (40).

Neben diesen klassischen T-Zell-Populationen entstehen im Thymus auch sogenannte „Natürliche Killer (NK) T-Zellen“, eine heterogene Unterklasse von großen granulären T-Zellen, die zusätzlich Charakteristika von NK-Zellen aufweist. Phänotypisch sind NKT-Zellen zumeist DN oder CD4⁺, aber auch CD8⁺ Subklassen sind bekannt (41-43). Ähnlich wie TZR $\gamma\delta$ -Zellen werden auch NKT-Zellen häufig als eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem angesehen. Die am intensivsten erforschte und auch am weitesten verbreitete NKT-Zell-Population zeichnet sich durch eine spezifische Rekombination der TZR-Gensegmente V α 14 und J α 18 aus (gilt nur für die Maus, bei den entsprechenden menschlichen NKT-Zellen erfolgt die Rekombination zwischen den Segmenten V α 24 und J α 15), die mit der Expression eines nicht-variablen TZR $\alpha\beta$ einhergeht. NKT-Zellen mit nicht-variablen TZR $\alpha\beta$ sind autoreaktiv für das MHC-Klasse I-ähnliche Molekül CD1d und werden z.B. durch das Glykosphingolipid α -Galaktosylceramid (α -GalCer) im Komplex mit CD1d aktiviert (44-46). NKT-Zellen scheint eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Autoimmunität sowie Immunantworten gegen Tumoren

und infektiösen Erregern zuzukommen, was möglicherweise mit ihrer charakteristischen Eigenschaft, bei Erstkontakt mit Antigen große Mengen an IL-4 und IFN- γ zu sezernieren, zusammenhängt (47-49). Neben den NKT-Zellen mit nicht-variablen TZR $\alpha\beta$ existieren allerdings noch andere NKT-Zell-Subpopulationen, die zumeist keine so deutlich ausgeprägte Präferenz bei der Nutzung bestimmter TZR-Gensegmente aufweisen. Interessanterweise befindet sich darunter auch ein NKT-Zell-Subtyp, der statt dem TZR $\alpha\beta$ den TZR $\gamma\delta$ exprimiert und sowohl im Thymus als auch in der Peripherie nachgewiesen werden konnte (50,51). Nur wenig ist hinsichtlich der Eigenschaften und Funktionen von TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen bekannt. Genau wie NKT-Zellen mit nicht-variablen TZR $\alpha\beta$ besitzen sie die Fähigkeit, IL-4 und IFN- γ zu produzieren (52,53). Darüber hinaus sind sie MHC Klasse-II-restringiert und scheinbar an der Immunantwort gegen *Salmonella choleraesuis* beteiligt (53).

Die Bedeutung des Thymus lässt sich besonders gut in einem Organismus erkennen, der aufgrund gegebener Umstände keinen solchen (mehr) besitzt. Das di George-Syndrom ist eine seltene angeborene Erkrankung des Menschen, bei der der Patient aufgrund einer Entwicklungsstörung bei schwerem Verlauf der Krankheit (komplettes di George-Syndrom) keinen Thymus ausbildet, was das Fehlen zellulärer Immunantworten und extreme Anfälligkeit für eine Vielzahl von Infektionskrankheiten zur Folge hat. Neben der Nutzung so genannter *nude*-Mäuse, die infolge einer genetischen Mutation ebenfalls keinen Thymus besitzen und einen dem kompletten di George-Syndrom ähnlichen Phänotyp aufweisen, verwendet man zu Forschungszwecken seit Mitte des letzten Jahrhunderts vor allem chirurgisch thymektomierte Mäuse. Dieser Ansatz bietet zum einen den Vorteil, dass die Tiere keine ungewollten zusätzlichen genetischen Defekte haben, die eventuell für das Experiment ungünstig sein könnten (*nude*-Mäuse haben z.B. kein Fell) und zum anderen, dass man den Zeitpunkt, an dem der Thymus entfernt werden soll, genau festlegen und an den Zweck des Versuches anpassen kann.

Entfernt man den Thymus bei neugeborenen Mäusen, so ergibt sich ein Phänotyp, der dem von *nude*-Mäusen ähnelt: Diese Tiere zeigen eine profunde Atrophie und Fehlbildung der sekundären lymphatischen Organe, einen Mangel an Lymphozyten im peripheren Blut, einen Defekt bei der Induktion von Immunantworten und eine progressive Auszehrung (*wasting syndrome*), die zum frühen Tod führt (54-56). Wesentlich mildere Symptome ergeben sich bei Mäusen, die im adulten Alter

thymektomiert wurden (ATX), also zu einem Zeitpunkt, an dem sie schon über ein voll ausgebildetes Immunsystem verfügen. Diese Tiere zeigen in den ersten Wochen oder sogar Monaten nach der Entfernung des Thymus meist keine signifikanten Beeinträchtigungen bezüglich der Induktion verschiedener Immunantworten, obwohl sowohl die Anzahl an Lymphozyten in ihrem Blut als auch das Gewicht ihrer lymphatischen Organe moderat reduziert ist (57). Nach mehreren Monaten kommt es jedoch auch bei diesen Tieren zu einer allgemeinen Immunsuppression. So konnte z.B. gezeigt werden, dass das Ausmaß der „graft-versus-host“-Reaktion in ATX-Mäusen 25 Wochen nach der Entfernung des Thymus signifikant verringert war im Vergleich mit euthymischen Kontrollmäusen (55). Weitere Studien demonstrierten reduzierte Mengen Antikörper-Plaques bildender Zellen und Hämagglutinin-Titer in ATX-Mäusen nach Behandlung mit Schafserythrozyten 9 bzw. 11 Monate nach der Thymektomie (58,59). All diese Befunde scheinen durch den progressiven Verlust an naiven T-Zellen in ATX-Mäusen zustande zu kommen. Di Rosa et al. konnten zeigen, dass weibliche ATX-Mäuse 26 Wochen nach der Entfernung des Thymus die Fähigkeit verlieren, eine primäre Immunantwort gegen Milzzellen aus männlichen Mäusen zu initiieren. Gleichzeitig wurde in diesen Tieren eine dramatische Reduktion an $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen mit naïvem Phänotyp ($CD44^{-/schwach}$) nachgewiesen, während der Gedächtnis-T-Zellpool ($CD44^{stark}$) keinen signifikanten Veränderungen unterworfen war (60).

1.2 Emigration und Zirkulation der T-Zellen

Der Thymus einer jungen Maus enthält etwa $1-2 \times 10^8$ Thymozyten und jeden Tag entstehen dort ca. 5×10^7 neue Zellen. Von dieser Population stirbt ein Großteil infolge von nicht bestandenen Selektionsprozessen durch Apoptose und letztendlich verlassen nur $\sim 1-2 \times 10^6$ Zellen den Thymus (61). Nach Erreichen der Pubertät verringert sich allerdings die Zahl der Thymusemigranten zunehmend, ein Umstand, der in erster Linie durch die natürliche altersbedingte Atrophie des Thymus zu erklären ist. Die naiven Emigranten gelangen über die Thymusvenolen in den Blutkreislauf, in dem sie so lange zirkulieren, bis sie die peripheren lymphatischen Organe und Gewebe (Tonsillen, Lymphknoten, Peyersche Plaques, Milz, Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe) erreichen. Dort verlassen sie das Blut über die

postkapillären Venolen und wandern durch die T-Zell-Zonen, wobei sie antigen-präsentierende Zellen (APZ; insbesondere DZs) passieren, die eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. Treffen sie dort nicht auf ein geeignetes Antigen, verlassen sie das lymphatische Gewebe wieder und gelangen erneut in den Blutkreislauf. Gemäß den Schätzungen einer Studie an ATX-Mäusen können solche naiven T-Zellen in der Abwesenheit eines spezifischen Antigens bis zu 6 Monate in der Peripherie überleben (60). Der Rezirkulationsprozess gewährleistet, dass eine naive T-Zelle die Gelegenheit hat, jeden Tag mit einer Vielzahl von APZ zu interagieren und deshalb die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass sie bei einer Infektion auf ein passendes Antigen trifft. Die durch Antigen stimulierten T-Zellen differenzieren zu Effektor- oder Gedächtniszellen, die in den Blutkreislauf eintreten. Effektorzellen werden chemotaktisch zum Infektionsherd geleitet, wo sie sich an der Bekämpfung der Pathogene beteiligen und danach absterben. Gedächtniszellen rezirkulieren solange zwischen Blut und lymphatischem Gewebe, bis sie erneut auf das entsprechende Antigen treffen und daraufhin schnell zu Effektorzellen differenzieren (62,63).

Bei den Emigranten aus dem adulten Thymus handelt es sich vor allem um $TZR_{\alpha\beta}$ - $CD4^+$ - und $TZR_{\alpha\beta}$ - $CD8^+$ -T-Zellen. Wie in einer Studie demonstriert werden konnte, zeigten diese Zellen auch eine intermediäre Expression an HSA (CD24), einem Oberflächenmolekül, das mit einem unreifen Phänotyp assoziiert ist (64). Mit Hilfe eines speziellen Mausmodells konnten Boursalian et al. darüber hinaus zeigen, dass Emigranten in der Peripherie eine sowohl phänotypische als auch funktionale Reifung durchmachen, bevor sie die volle Immunkompetenz erreichen (65).

Von den Zellen, die aus dem adulten Thymus emigrieren, unterscheiden sich die fötalen Thymusemigranten fundamental. Neben den auch hier vorhandenen einfach-positiven T-Zellen findet man zahlreiche DP- (66) sowie DN-T-Zellen (67). Viele der DN-Zellen exprimieren den $TZR_{\gamma\delta}$. Der Anteil dieser T-Zellen nimmt in der Maus bereits 2-3 Tage vor der Geburt zugunsten einer verstärkten Emigration von $TZR_{\alpha\beta}$ -T-Zellen immer weiter ab (19).

1.3 Die Induktion von Immunantworten durch dendritische Zellen (DZs)

DZs gelten als die wichtigste, wenn nicht sogar die einzige Population professioneller APZs, die in der Lage ist, naive T-Zellen zu aktivieren (68), weshalb sie von essentieller Bedeutung für das adaptive Immunsystem sind. Diese einzigartige „Schaltstellen-Funktion“ bei der Induktion von Immunantworten macht sie immer mehr zum pharmakologischen Ziel bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen und zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen gegenüber transplantierten Organen/Geweben (siehe Ref. 69 für eine Übersicht). DZs repräsentieren einen heterogenen Zelltyp und können sich sowohl aus myeloiden als auch lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln, die im Knochenmark ansässig sind (70,71). Gesteuert von einem Chemokingradienten gelangen sie über den Blutkreislauf in einem unreifen Zustand in die verschiedenen Gewebe und Organe des Körpers (mit Ausnahme des Gehirns), wo sie sich ansiedeln können. Hier erfüllen DZs eine Art „Wächterfunktion“, indem sie auf den Kontakt mit Antigenen warten. Im unreifen Zustand haben sie die Fähigkeit, durch Phagozytose und Pinozytose äußerst effizient große Mengen einer Vielzahl unterschiedlicher Arten von Antigenen (z.B. Immunkomplexe, opsonisierte Partikel, apoptotische/nekrotische Zellfragmente, Viren, Bakterien, intrazelluläre Parasiten) aufzunehmen und zu prozessieren. So wurde geschätzt, dass das Volumen an Flüssigkeit, das eine einzelne DZ innerhalb einer Stunde aufnehmen kann, in etwa ihrem eigenen Volumen entspricht (72). Infolge der Prozessierung gelangen Peptidfragmente der Antigene gebunden an MHC-Moleküle der Klasse II an die Zelloberfläche der DZs, wo sie später von antigenspezifischen T-Zellen über deren TZR erkannt werden können. Zu diesem Zeitpunkt sind DZs für die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen allerdings äußerst ineffizient, da sie nur eine schwache Expression der in diesem Zusammenhang wichtigen ko-stimulatorischen Moleküle wie MHC Klasse II, CD40, CD80 oder CD86 zeigen. Der Kontakt mit Antigenen löst in den DZs jedoch eine Kette von physiologischen Prozessen aus, die man auch kurz unter der Bezeichnung „Reifung“ zusammenfasst. Dies beinhaltet zum einen eine Reihe morphologischer Veränderungen einschließlich des Verlustes der adhäsiven Eigenschaften, einer Reorganisation des Zytoskelettes und des Erlangens zellulärer Mobilität (73) und zum anderen den Gewinn ko-stimulatorischer Fähigkeiten durch verstärkte Expression bereits erwähnter Moleküle wie MHC Klasse II, CD40, CD80, CD86 etc.

Die Antigen-beladenen DZs verlassen infolge des Reifungsprozesses die entsprechenden Gewebe und gelangen – geleitet von einem Chemokin-Gradienten – über die afferenten Lymphgefäße zu den T-Zell-Zonen der drainierenden sekundären lymphatischen Organe (meist LN). In diesem Zustand ist ihre Fähigkeit, Antigen aufzunehmen, stark reduziert, aber dafür sind die reifen DZs nun in der Lage, äußerst effizient antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren, die durch die T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Gewebe patrouillieren. Zusätzlich können DZs durch Freisetzung von Chemokinen wie CCL19 und CCL21 weitere reife DZs sowie naive T-Zellen und aktivierte B-Zellen aus der Peripherie in die drainierenden lymphatischen Gewebe locken und so die Immunantwort verstärken (74,75). Nachdem die DZs diese Aufgaben erfüllt haben, sterben sie letztendlich durch Apoptose, ein Mechanismus, der dazu beiträgt, das Ausmaß einer auf diese Weise induzierten Reaktion zu begrenzen (76). Die aktivierten T-Zellen hingegen verlassen die lymphatischen Gewebe über die efferenten Lymphgefäße und gelangen über den Ductus thoracicus zurück ins Blut, bevor sie, geleitet von einem Chemokin-Gradienten, den Weg zum entzündeten Gewebe finden, um an der Beseitigung des Antigens teilzunehmen.

Die Funktion der DZs beschränkt sich allerdings keineswegs nur auf die Induktion von Immunantworten, sondern beinhaltet außerdem die Fähigkeiten, eine solche zu polarisieren und darüber hinaus Toleranz gegen spezifische Antigene zu induzieren, also regulatorische Aufgaben. Polarisierung von Immunantworten bedeutet, dass DZs aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften in der Lage sind zu regulieren, ob eine von ihnen induzierte Immunantwort T_H1 - (zellvermittelt; ist u.a. durch die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen charakterisiert) oder T_H2 -dominiert (führt zur Aktivierung von B-Zellen) sein wird, was in Abhängigkeit von der Natur des entsprechenden Pathogens bedeutende Konsequenzen für dessen effiziente und erfolgreiche Eliminierung hat. So konnte anhand zweier DZ-Subpopulationen aus der Milz gezeigt werden, dass $CD8\alpha^+$ lymphoide DZs naive $CD4^+$ -T-Zellen instruieren, T_H1 -Zytokine zu produzieren, während $CD8\alpha^-$ myeloide DZs in den gleichen Zellen die Produktion von T_H2 -Zytokinen induzieren (77,78). Neben der schon länger bekannten Rolle bei der Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz, die DZs als Mediatoren der negativen Selektion potentiell autoreaktiver T-Zellen im Thymus erfüllen (79), zeichnet sich auch immer deutlicher eine Beteiligung an der Induktion der peripheren Toleranz ab. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden,

dass unreife DZs, die *in vitro* mit IL-10 behandelt wurden, die Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in einer antigenspezifischen Weise unterdrücken (80-82). Darüber hinausgehende Arbeiten konnten demonstrieren, dass die auf diese Weise anergisch gewordenen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen selbst antigenspezifische suppressorische Aktivität besitzen und die Proliferation syngener T-Zellen unterdrücken können (83).

1.4 Die Beeinflussung von Thymus und peripherem Immunsystem durch halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAKs)

Die HAKs stellen eine Klasse ubiquitärer Umweltschadstoffe dar, die die Gruppen der polychlorierten Dibenzo-*p*-Dioxine, polychlorierten Dibenzofurane und polychlorierten Biphenyle umfasst (84). Es handelt sich bei diesen Substanzen zumeist um planare, hydrophobe Moleküle, die primär als Nebenprodukte chemischer Manufakturprozesse und bei der Verbrennung organischer Materialien entstehen (85). Der biologisch aktivste und gleichzeitig am besten untersuchte Vertreter dieser Stoffklasse ist 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD; siehe Ref. 86 für eine Übersicht), dessen Struktur in Abb. B dargestellt ist. Bezogen auf die akute Toxizität gehört TCDD zu den giftigsten vom Menschen hergestellten Substanzen (87). TCDD

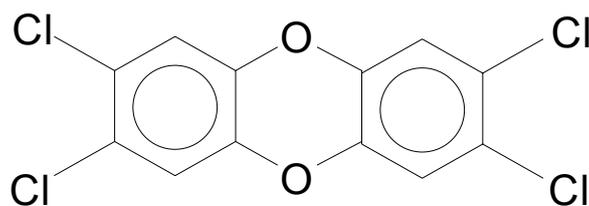


Abb. B: Strukturformel von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

und andere HAKs besitzen eine sehr stabile Struktur und sind sowohl durch chemische als auch biologische Prozesse kaum abbaubar, Eigenschaften, die zu ihrer Persistenz in der Umwelt sowie zu ihrer Anreicherung in höheren Ebenen der Nahrungskette beitragen. Diese Substanzen zeichnen sich durch ein breites Spektrum von toxischen Effekten aus, die geschlechts-, alters-, spezies- und konzentrationspezifisch sind (84). Neben Wirkungen wie Kanzerogenität,

Teratogenität, Leber- und Hautschädigung (z.B. Chlorakne) ist vor allem das Immunsystem von der Exposition mit diesen Schadstoffen betroffen. Eines der zahlreichen Angriffsziele von TCDD ist das Knochenmark, in dem hämatopoetische Stammzellen die Grundlage für die Generierung des peripheren Immun- und Blutzell-Pools bilden. Fine et al. konnten anhand von Chimärenexperimenten zeigen, dass Prothymozyten aus dem Knochenmark TCDD-behandelter Mäuse ein deutlich reduziertes Potential besaßen, den Thymus von subletal bestrahlten Mäusen zu rekonstituieren (88). Dieses verminderte Rekonstitutionspotential konnte auch in einem ähnlichen Modell anhand der Untersuchung von peripheren Blutzellen bestätigt werden, obwohl auf der anderen Seite die absolute Zahl an hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark durch TCDD signifikant erhöht wird (89).

Die zweifellos charakteristischsten immuntoxischen Effekte von TCDD sind jedoch zum einen die Atrophie des Thymus und zum anderen die Entwicklung einer allgemeinen Immunsuppression, Phänomene, die in zahlreichen Tierexperimenten demonstriert werden konnten (siehe Ref. 86 für eine Übersicht). Grundlage der TCDD-vermittelten Thymusatrophie scheint eine verringerte Proliferation unreifer DN3- und DN4-Thymozyten zu sein (90), obwohl möglicherweise auch die Effekte auf das Thymusepithel in Bezug auf dieses und andere TCDD-induzierte Phänomene von Bedeutung sein könnten (91). Entscheidend für den Schweregrad einer TCDD-vermittelten Thymusatrophie ist der Zeitpunkt der Exposition. Je früher dies innerhalb der Entwicklung eines Organismus geschieht, desto gravierender ist das Ausmaß der Atrophie (92). Ob zwischen Atrophie und der Immunsuppression ein Zusammenhang besteht, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Neben der Proliferation von Thymozyten wird auch deren Differenzierung durch HAKs beeinflusst. So führt eine Exposition mit diesen Schadstoffen im Thymus der Maus sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach fünf bis sechs Tagen zu einer relativen und absoluten Verringerung von DP-Zellen (93), sowie zu einer Zunahme an funktionsfähigen TZR $\alpha\beta^+$ -CD8 $^+$ -Zellen (94), wobei letzteres Phänomen durch eine beschleunigte Reifung der Zellen erklärt wird. Diese TZR $\alpha\beta^+$ -CD8 $^+$ -Zellen entwickeln sich in Gegenwart von TCDD auch im Thymus von MHC Klasse I-defizienten Mäusen (95), was darauf hindeutet, dass TCDD die Selektionsprozesse im Thymus stört und die Zellen möglicherweise nicht richtig restringiert sind. Darüber hinaus konnten Blaylock et al. demonstrieren, dass

die Exposition schwangerer Mäuse mit TCDD im Thymus der Föten zu einer Verdopplung des relativen Anteils an TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen führt (93). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass neben den genannten Prozessen auch die Emigration der Zellen aus dem Thymus durch TCDD gestört wird. *In vitro*-Studien an fötalen Thymi konnten zeigen, dass TCDD zu einer relativen Zunahme einer ungewöhnlichen Population von DN-Emigranten führt (96-98), ein Effekt, der auch *in vivo* bestätigt werden konnte (99). Die physiologischen Konsequenzen, die die genannten Befunde auf den TCDD-exponierten Organismus haben, sind bisher allerdings weitestgehend unklar.

Die toxischen Effekte von TCDD und anderen HAKs sind jedoch keineswegs auf die primären lymphatischen Organe beschränkt, sondern betreffen auch das periphere Immunsystem. So konnten mehrere voneinander unabhängige *in vitro*-Studien belegen, dass die Funktion von murinen als auch humanen B-Zellen direkt durch TCDD beeinträchtigt wird, wobei vor allem deren terminale Differenzierung zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle gestört zu sein scheint (100-102). Außerdem ist bekannt, dass sowohl T-Zell-abhängige (z.B. gegen Schafserythrozyten) als auch unabhängige humorale Immunantworten (z.B. gegen Trinitrophenyl-LPS) durch TCDD supprimiert werden (101,103). Im Gegensatz zu diesen Befunden konnten interessanterweise direkte Effekte von TCDD auf T-Zellen *in vitro* nie nachgewiesen werden, obwohl deren Funktion *in vivo* eindeutig beeinträchtigt ist (104-107). Da alle diese Untersuchungen keine schlüssigen Erklärungen für den Mechanismus der TCDD-induzierten Immunsuppression liefern konnten, konzentrierten sich neuere Studien mehr und mehr auf eine mögliche Beteiligung von DZs an diesem Phänomen. Sowohl in naiven Mäusen als auch in solchen, die mit P815-Tumorzellen immunisiert worden waren, wurde eine signifikante Reduktion von DZs in der Milz innerhalb von drei bis fünf Tagen nach TCDD-Exposition festgestellt (108,109). Untersuchungen mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, von denen viele ebenso wie TCDD ihre toxische Wirkung über die Aktivierung des Arylhydrokarbonrezeptors (AhR; siehe Abschnitt 1.5) entfalten, konnten zeigen, dass diese Moleküle die Reifung und Differenzierung von humanen Monozyten zu DZs hemmen und dass diese Zellen – im Gegensatz zu unbehandelten – nur schwache stimulatorische Fähigkeiten in der „Mixed Lymphocyte Reaction“ hatten (110). Paradoxerweise fanden Vorderstrasse et al., dass DZs, die aus der Milz von TCDD-

belasteten Mäusen isoliert worden waren, *in vitro* eine verstärkte Proliferation antigenspezifischer T-Zellen induzierten (111).

Die Beteiligung eines grundlegend anderen Mechanismus, der möglicherweise eine Rolle bei der Erklärung der TCDD-induzierten Immunsuppression spielen könnte, lassen die Daten einer aktuellen Studie von Funatake et al. vermuten (112). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der adoptive Transfer von T-Zellen in TCDD-behandelte Mäuse innerhalb dieser Zellen in einem Zeitraum von zwei Tagen zur Generierung einer Population von CD4⁺CD25⁺-Zellen mit regulatorischen Fähigkeiten führt. Allerdings nimmt der Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation der transferierten Donor-Zellen bereits nach drei Tagen stark ab und unterscheidet sich am vierten Tag nicht mehr von der Kontrolle, ein Ergebnis, das in Frage stellt, ob dieser Mechanismus eine Erklärung für die lang andauernde TCDD-induzierte Immunsuppression liefern kann.

All diese aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen, dass trotz einer Vielzahl von gesammelten Erkenntnissen mit möglicher Relevanz die Zusammenhänge und Grundlagen der TCDD-vermittelten Immunsuppression nach wie vor unklar sind.

1.5 Der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) als Vermittler der HAK-Toxizität

Das breite Spektrum biologischer Effekte, das eine HAK-Exposition nach sich zieht, wird weitestgehend durch einen zytosolischen Rezeptor, den AhR vermittelt. Dies konnte an AhR-defizienten Mäusen gezeigt werden, die gegenüber den toxischen Wirkungen von TCDD resistent waren (113), auch wenn einige TCDD-induzierte Effekte scheinbar unabhängig vom AhR-Signalweg vermittelt werden (114,115). Der AhR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der zur „basic-helix-loop-helix-PAS (bHLH-PAS)-Superfamilie“ der DNA-bindenden Proteine gehört. Diese Proteine stellen eine bedeutende Klasse transkriptionaler Regulatoren dar, die eine Reihe von physiologischen und Entwicklungsprozessen kontrollieren (siehe Ref. 116 für eine Übersicht). In der Abwesenheit eines geeigneten Liganden liegt der AhR im Zytosol als Komplex in Assoziation mit den Proteinen p23, AIP (Immunophilin-ähnliches Protein) und zwei Molekülen Hsp90 (Hitzeschockprotein) vor (117). Hat der AhR

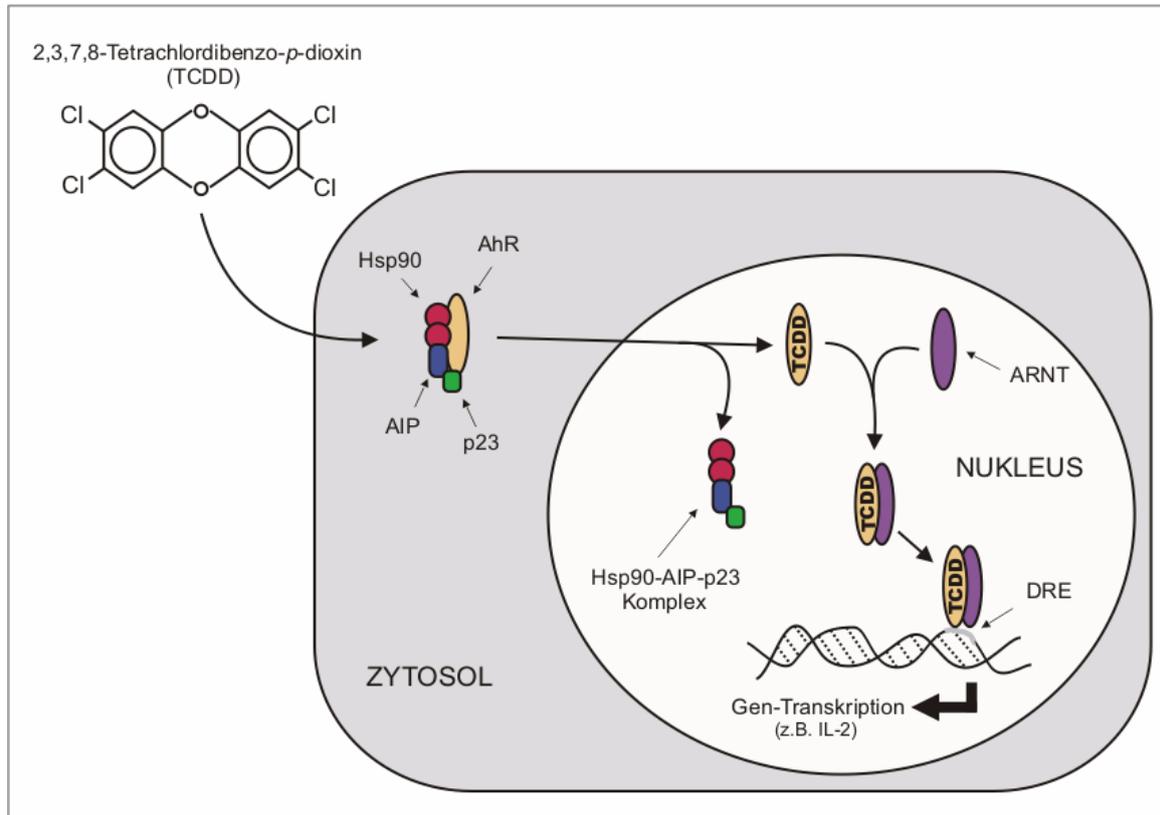


Abb. C: Liganden-induzierte Aktivierung des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR).

einen aktivierenden Liganden wie z.B. TCDD gebunden, transloziert er in den Nucleus, wo er von dem assoziierten Proteinkomplex dissoziiert und ein Heterodimer mit einem weiteren bHLH-PAS-Protein, dem AhR-Nucleus-Translokator (ARNT), bildet. Dieser AhR/ARNT-Komplex stellt einen vollständigen Transkriptionsfaktor dar, der an bestimmte regulatorische Sequenzmotive (Dioxin-responsive Elemente, DREs) in den Promotorregionen unterschiedlicher Gene binden kann, die z.B. für Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-2, IL-1 β und EGFR codieren (118-121). Der Mechanismus der Liganden-induzierten Aktivierung des AhR ist schematisch in Abb. C dargestellt. Ob in einer bestimmten Zelle die Expression eines solchen Genes allerdings tatsächlich durch den aktivierten AhR reguliert wird, hängt sowohl vom Zelltyp als auch von dessen Differenzierungsstatus ab (118), also im eigentlichen Sinne von der Zugänglichkeit der entsprechenden Promotorelemente sowie möglicherweise auch von der Verfügbarkeit an geeigneten Ko-Faktoren (122). Außer den HAKs existieren auch eine Reihe anderer sowohl anthropogener als auch

natürlich vorkommender Verbindungen, die in der Lage sind, an den AhR zu binden und u.a. zu so unterschiedlichen Substanzklassen wie den Alkaloiden, Flavonoiden oder Indol-Derivaten gehören (123-125).

Neben der Vermittlung der Toxizität von Xenobiotika wie TCDD kommt dem AhR auch eine physiologische Funktion zu; so scheint er z.B. bei der Entwicklung der Leber und der Besiedelung sekundärer lymphatischer Organe mit Lymphozyten eine Rolle zu spielen (126,127). Der AhR wird konstitutiv in zahlreichen Geweben von Säugetieren exprimiert, vor allem aber in Leber, Niere, Lunge und Thymus (128). Vor wenigen Jahren gelang es Song et al. zum ersten Mal, einen endogenen AhR-aktivierenden Liganden aus der Schweinelunge zu isolieren (129). Es bleibt jedoch noch offen, welche physiologische Funktion dieser Ligand erfüllt und ob unterschiedliche AhR-Funktionen durch die Bindung unterschiedlicher Liganden zu erklären sind.

1.6 Fragestellung

Eine Reihe voneinander unabhängige Studien konnten die vielschichtigen toxischen Wirkungen von TCDD auf endogene Prozesse im Thymus, einschließlich Differenzierung, Proliferation, Emigration und Selektion, belegen. Diese Effekte bewirken u.a. die Entstehung von nicht-MHC Klasse I-restringierten CD8⁺-T-Zellen, sowie die Emigration einer ungewöhnlichen Population DN-Zellen. Neben der Störung der Thymusphysiologie zählt die Induktion einer allgemeinen Immunsuppression, die sowohl zellulär als auch humoral vermittelte Immunantworten betrifft, zu den bedeutendsten immuntoxischen Effekten einer TCDD-Exposition. Bis heute ist allerdings unklar geblieben, ob und inwiefern die toxischen Effekte auf den Thymus bei der Vermittlung der TCDD-induzierten Immunsuppression eine Rolle spielen. Es erscheint aber durchaus denkbar, dass eine verminderte Emigration oder eine anomale Auswanderung von nicht-funktionalen oder regulatorischen Zellen an der Entstehung der Immunsuppression beteiligt sein könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Hinweise zu finden, die eine Beteiligung des Thymus an der TCDD-vermittelten Immunsuppression bestätigen oder ausschließen können.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen einer TCDD-Exposition auf die Emigration aus dem fötalen Thymus und die Störung der endogenen Differenzierungsprozesse. Hierbei kamen vor allem *in vitro*-Methoden (fötale Thymusorgankultur; FTOC) zur Anwendung.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils der Arbeit stand die Untersuchung der TCDD-vermittelten Immunsuppression anhand des Beispiels der „Kontakthypersensibilitätsreaktion (CHS-Reaktion)“. Um die Rolle des Thymus bei der Suppression dieser Immunreaktion zu bewerten, wurden die entsprechenden Versuche sowohl mit Mäusen durchgeführt, die im adulten Alter thymektomiert worden waren, als auch mit solchen, die noch einen Thymus besaßen (euthymisch).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Männliche und weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 wurden von Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich) bezogen und im institutseigenen Tierhaus gezüchtet. Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen bei konstanten Temperaturen (22-25°C) in einem 12:12 h Licht/Dunkelheitszyklus gehalten und erhielten Standardnahrung und Wasser *ad libitum*.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) wurde von Ökometric (Bayreuth) bzw. Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, USA) bezogen. Als Lösungsmittel wurden Dioxan (Merck, Darmstadt) oder DMSO (Sigma, Taufkirchen) eingesetzt. Für Injektionen wurde TCDD bzw. DMSO als Kontrolle in Olivenöl (Sigma, Taufkirchen) verdünnt. Die übrigen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt.

2.3 Puffer und Kulturmedium

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

137 mM NaCl

2,68 mM KCl

8,09 mM Na₂HPO₄

1,47 mM KH₂PO₄

Ammoniumchlorid-Tris (ACT)-Puffer

160 mM NH₄Cl

17 mM Tris-HCl

MACS-Laufpuffer (in PBS)

2 mM EDTA

0,5% fötales Kälberserum (FKS)

MACS-Reinigungspuffer (in PBS)

2 mM EDTA

Der pH-Wert der angegebenen Puffer wurde auf 7,2 eingestellt und die Lösungen anschließend sterilfiltriert bzw. autoklaviert.

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

40 mM Tris

20 mM Eisessig

1 mM EDTA

Kulturmedium

Je 500 ml RPMI 1640-Medium (Sigma, Taufkirchen) wurden mit 50 ml FKS und 21 ml „Supplement Complete (10 mM Glutamin, 5 mM Pyruvat, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 24% nicht-essentielle Aminosäuren)“ versetzt. Im weiteren Textverlauf wird dies als Medium bezeichnet. Alle verwendeten Zusatzstoffe wurden von Gibco Life Technologies (Paisley, UK) bezogen.

2.4 Antikörper und Microbeads

Für die durchflusszytometrische Analyse von Zellsuspensionen wurden die folgenden mausspezifischen Antikörper (Ak) verwendet:

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller
Hamster-anti-CD3	–	145-2C11	Pharmingen ¹
Ratte-anti-CD4	PerCP	RM4-5	Pharmingen
Ratte-anti-CD4	APC	RM4-5	Pharmingen
Ratte-anti-CD8 α	FITC	53-6.7	Pharmingen
Ratte-anti-CD8 α	PE	53-6.7	Pharmingen
Hamster-anti-CD11c	PE	HL3	Pharmingen
Hamster-anti-CD11c	APC	N418	eBioscience ²
Ratte-anti-CD16/32 (Fc-Block)	–	2.4G2	Pharmingen

Ratte-anti-CD16/32	PE	2.4G2	Pharmingen
Ratte-anti-CD19	FITC	1D3	Pharmingen
Ratte-anti-CD24 (HSA)	FITC	M1/69	Pharmingen
Ratte-anti-CD25	Biotin	7D4	Pharmingen
Ratte-anti-CD25	PE	PC61	Pharmingen
Ratte-anti-CD40	FITC	3/23	Pharmingen
Ratte-anti-CD44	FITC	IM7	Pharmingen
Ratte-anti-CD44	PE	IM7	Pharmingen
Ratte-anti-CD45RB	Biotin	16A	Pharmingen
Ratte-anti-CD62L	Biotin	MEL-14	Pharmingen
Hamster-anti-CD69	PE	H1.2F3	Pharmingen
Hamster-anti-CD80	PE	16-10A1	Pharmingen
Ratte-anti-CD86	Biotin	GL1	Pharmingen
Ratte-anti-CD117 (c-kit)	APC	2B8	Pharmingen
Ratte-anti-CD122	PE	TM- β 1	Pharmingen
Ratte-anti-I ^A /I ^E (MHC Klasse II)	PE	M5/114.15.2	Pharmingen
Hamster-anti-TZR $\alpha\beta$	FITC	H57-597	Pharmingen
Hamster-anti-TZR $\gamma\delta$	Biotin	GL3	Pharmingen
Maus-anti-NK1.1	PE	PK136	Pharmingen
Maus-anti-NK1.1	PerCP/Cy5.5	PK136	Pharmingen
Maus-anti-CD244 (2B4)	PE	2B4	Pharmingen
Ratte-anti-IgM	PE	R6-60.2	Pharmingen

¹Heidelberg

²San Diego, USA

Biotinylierte Ak wurden zur durchflusszytometrischen Analyse in einem zweiten Färbeschritt mit Streptavidin-PerCP, -PE oder -APC gekoppelt.

Anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD90-, anti-Biotin-Microbeads sowie ein CD4⁺-T-Zell-Isolationskit wurden von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) bezogen.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zentrifugation von Zellen

Die Zellen wurden bei 1200 rpm (250 g) in einer Megafuge R1.0 (Heraeus, Osterode) für acht bis zehn Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert oder mit einer Pipette abgesaugt und das Zellpellet aufgelockert.

2.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Jeweils 10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension wurden mit 10 oder 90 µl Trypanblau-Lösung (ICN Biomedicals, Meckenheim) vermischt und in einer Neubaur-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen werden durch diesen Farbstoff blau gefärbt. Ihr Anteil lag für gewöhnlich unter 10%. Um die Zellzahl pro Milliliter berechnen zu können, wurde die Zahl der lebenden Zellen, die sich in 16 Kleinquadraten befand, bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert.

2.5.3 Fötale Thymusorgankultur (FTOC)

Die FTOC ist eine bereits seit vielen Jahren etablierte *in vitro*-Methode, die es ermöglicht, die Reifung und Differenzierung von T-Zellen im fötalen Thymus so zu verfolgen, wie sie auch *in vivo* abgelaufen wäre (130,131). Darüber hinaus bietet sie den Vorteil, dass man die T-Zell-Entwicklung auf einfache Weise durch Zugabe von Fremdstoffen (wie z.B. TCDD) in das Kulturmedium beeinflussen und so deren Auswirkungen auf den fötalen Thymus untersuchen kann.

Männliche und weibliche Mäuse wurden über Nacht verpaart und der nachfolgende Tag wurde als Tag 0 der Trächtigkeit gezählt. An Tag 15 wurden die trächtigen Weibchen durch CO₂-Asphyxiation getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert und die Föten aseptisch isoliert. Die Thymuslappen der Föten wurden mit sterilem Besteck entnommen und mit dünnen Kanülen in Medium von Geweberesten befreit.

Thymuslappen, die bei diesem Vorgang offensichtlich verletzt worden waren, wurden verworfen. Für die Kultivierung wurden bis zu sechs Thymuslappen auf einem Filtereinsatz aus Nitrozellulose mit einer Porengröße von 0,45 μm (Millipore Products, Bedford, USA) platziert. Jeweils acht Filtereinsätze wurden in eine 24-Napfkulturplatte in je 300 μl Medium überführt. Das Medium enthielt entweder 10 nM TCDD oder 0,1% Dioxan (Lösungsmittelkontrolle). Es konnte bereits in früheren Untersuchungen demonstriert werden, dass Dioxan keinen Einfluss auf die Entwicklung der Thymozyten hat, und deshalb als Lösungsmittel für derartige Versuche geeignet ist (132). Die Thymuslappen wurden bis zu 12 Tage in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle drei Tage wurden die Filtereinsätze in neue 24-Napfkulturplatten mit frischem Medium mit den entsprechenden Zusätzen überführt.

2.5.3.1 Isolation von fötalen Thymusemigranten

Während der fötalen Thymusontogenese verlassen reife T-Zellen den Thymus, die nachfolgend als Emigranten bezeichnet werden. Obwohl die FTOC in den meisten Studien in erster Linie bei der Untersuchung der T-Zell-Differenzierung Anwendung fand, wird sie seit einigen Jahren auch zur Analyse der Emigration aus dem Thymus eingesetzt (67,96).

Die Isolation der Emigranten aus der FTOC erfolgte, indem die Filtereinsätze mit den Thymuslappen zweimal mit 200 μl kaltem Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren abgespült wurden. Die so gewonnene Suspension enthielt sowohl aktiv emigrierte Zellen, aber möglicherweise auch Zellen, die passiv aus verletzten Thymuslappen ausgetreten waren.

2.5.3.2 Isolation von fötalen Thymuslappenzellen (Thymozyten)

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die fötalen Thymuslappen mit einer sterilen Pinzette aus den Filtereinsätzen genommen und mit wenigen Millilitern kaltem Medium in einem kleinen Glashomogenisator (Braun, Melsungen) vorsichtig homogenisiert, bis keine Gewebereste mehr zu erkennen waren. Die Thymuszell-

suspension wurde anschließend mit einer Pipette abgenommen. Zur besseren Unterscheidung dieser Zellen von den Emigranten werden sie im weiteren Textverlauf als Thymozyten bezeichnet.

2.5.4 Herstellung von Milz-, Thymus- und Lymphknoten-Zellsuspensionen

Für die Organentnahme wurden die Mäuse durch CO₂-Asphyxiation getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert und der Bauch- und Brustraum mit einer Schere geöffnet. Milz bzw. Thymus wurden mit sterilem Besteck entnommen und in kaltes Medium überführt. Anschließend wurde die Organe vorsichtig mit einem Spritzenstempel zerdrückt. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und das Pellet zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml ACT-Puffer resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurde die Zellsuspensionen mit PBS auf 30 ml aufgefüllt, um wieder Isotonie herzustellen, durch einen Gaze-Filter filtriert und zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in kaltem PBS oder Medium resuspendiert.

Zur Entnahme der aurikulären Lymphknoten (LN) wurde die Vena jugularis in der Nähe der Ohren freipräpariert, an deren Verzweigung sich jeweils ein LN befindet. Die beiden aurikulären LN wurden mit einer Pinzette entnommen, in kaltes PBS überführt und mit einem Spritzenstempel homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch einen Gaze-Filter filtriert, zentrifugiert und die Zellen anschließend in kaltem PBS resuspendiert.

2.5.5 Isolation von Immunzellen aus dem Blut neugeborener Mäuse

Neugeborene Mäuse wurden getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert, und der Brustkorb wurde mit sterilem Besteck geöffnet. Aus der rechten Herzkammer wurden mit einer Spritze, die mit 50 µl einer 10 mM EDTA-Lösung (in PBS) gefüllt war, 50 µl Blut entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, den Thymus nicht zu verletzen, um eine Verunreinigung der Blutzellen mit Thymozyten zu vermeiden. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Blut mit 900 µl doppelt-destilliertem H₂O versetzt und nach ca. 15 sec durch Zugabe von 110 µl 10-fach konzentriertem PBS wieder in den

isotonischen Zustand überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert, noch einmal gewaschen, und die Zellen wurden in kaltem PBS aufgenommen.

2.5.6 Magnetische Zellseparation

2.5.6.1 Isolation von antigenpräsentierenden Zellen (APZ)

Für die APZ-Isolierung wurden 3×10^7 Milzzellen abzentrifugiert, in 270 μl MACS-Laufpuffer resuspendiert und mit 30 μl anti-CD90-Microbeads für 15 min bei 8°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert, in 500 μl MACS-Laufpuffer resuspendiert, und mit einem AutoMACS™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) unter Verwendung des Programmes „Deplete“ separiert. Die Zellen in der CD90-negativen, also T-Zell-depletierten Fraktion wurden gesammelt und als APZ verwendet. Sie wurden in 5 ml kaltem Medium resuspendiert und mit einem Gamma Cell 2000-Bestrahlungsgerät (Mølsgard, Dänemark) bestrahlt (2000 rad), um ihnen die Fähigkeit zur Proliferation zu nehmen.

2.5.6.2 Isolation von CD4⁺-T-Zellen

Die Isolation von CD4⁺-T-Zellen wurde mit dem CD4⁺-T-Zell-Isolationskit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt. 4×10^7 Milzzellen wurden abzentrifugiert und in 160 μl MACS-Laufpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 40 μl eines biotinylierten Antikörpercocktails (gerichtet gegen die Antigene CD8 α , CD11b, CD45R, DX5 und Ter-119) versetzt und für 10 min bei 8°C inkubiert. Danach wurden 120 μl MACS-Laufpuffer und 80 μl anti-Biotin-Microbeads hinzugegeben und die Suspension für weitere 15 min bei 8°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 500 μl MACS-Laufpuffer resuspendiert. Die anschließende Separation erfolgte mit dem AutoMACS™ unter Verwendung des Programmes „Deplete“. Die CD4⁺-T-Zellen wurden abzentrifugiert und in 5 ml kaltem Medium resuspendiert. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Sie betrug für gewöhnlich mehr als 90%.

2.5.6.3 Isolation von fötalen CD4⁻CD8⁻(DN)-Emigranten und Thymozyten

Maximal 6×10^6 der aus den FTOCs isolierten Thymusemigranten und Thymozyten wurden in 90 μ l MACS-Laufpuffer resuspendiert, mit 12 μ l anti-CD4-Microbeads versetzt und für 15 min bei 8°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 500 μ l MACS-Laufpuffer resuspendiert. Eine MS-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurde mit 500 μ l MACS-Laufpuffer im Magnetfeld eines MiniMACSTM (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) äquilibriert, bevor die Zellsuspension aufgetragen wurde. Der Durchfluss wurde gesammelt und die Säule dreimal mit je 500 μ l MACS-Laufpuffer gewaschen. Die in diesem Eluat befindlichen CD4⁻-Zellen wurden abzentrifugiert, in 90 μ l MACS-Laufpuffer resuspendiert, mit 12 μ l anti-CD8-Microbeads versetzt und für 15 min bei 8°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 500 μ l MACS-Laufpuffer aufgenommen. Die Separation der CD8⁻-Zellen erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Die DN-Zellen wurden zentrifugiert und in kaltem PBS oder Medium resuspendiert. Ihre Reinheit betrug für gewöhnlich mehr als 90%.

2.5.6.4 Isolation von fötalen DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten und Thymozyten

Zur Isolation von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten und Thymozyten wurden die aufgereinigten DN-Zellen in 100 μ l PBS aufgenommen, mit 2 μ l anti-TZR $\gamma\delta$ -Ak versetzt und für 10 min bei 8°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 ml PBS gewaschen, zentrifugiert, in 80 μ l MACS-Laufpuffer aufgenommen, mit 20 μ l anti-Biotin-Microbeads versetzt und für 15 min bei 8°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 500 μ l MACS-Laufpuffer resuspendiert. Eine MS-Säule wurde mit 500 μ l MACS-Laufpuffer im Magnetfeld eines MiniMACSTM äquilibriert, bevor die Zellsuspension aufgetragen wurde. Der Durchfluss wurde gesammelt und die Säule dreimal mit je 500 μ l MACS-Laufpuffer gewaschen. Diese DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Fraktion wurde zentrifugiert und die Zellen wurden in kaltem PBS oder Medium resuspendiert. Ihre Reinheit betrug für gewöhnlich mehr als 90%. Die Säule wurde aus dem Magneten genommen, und 1 ml MACS-Laufpuffer wurde mit Hilfe des beiliegenden Stempels

durch die Säule gedrückt. Das Eluat wurde als DN-TZR $\gamma\delta$ -Fraktion gesammelt, zentrifugiert und die Zellen wurden in kaltem PBS oder Medium resuspendiert. Ihre Reinheit betrug für gewöhnlich mindestens 90%.

2.5.7 Proliferationstests

In den durchgeführten Tests wurde die Proliferation von CD4⁺-T-Zellen in Ko-Kultur mit DN-Emigranten, die aus TCDD- bzw. Dioxan-behandelten FTOCs isoliert worden waren, untersucht. Dazu wurden 5x10⁴ APZ zusammen mit 2x10⁴ CD4⁺-T-Zellen und 1x10⁴ DN-Emigranten für 90 h bei 37°C und 6% CO₂ in einem Volumen von 200 μ l/Napf in einer Mikrotiterplatte ko-kultiviert. Da es sich bei den Zellen um syngene Zellen handelte, wurde das verwendete Medium zur TZR-Stimulation mit anti-CD3 ϵ -Ak in einer Konzentration von 1 μ g/ml versetzt. Manche Kulturen wurden mit 2 ng/ml rekombinatem IL-2 (Pharmingen, Heidelberg) versetzt. Zu Kontrollzwecken wurden sowohl CD4⁺-T-Zellen als auch DN-Zellen in der Anwesenheit von APZ mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; 10 ng/ml; Sigma, Taufkirchen) und Ionomycin (500 ng/ml; Sigma, Taufkirchen) stimuliert. Es wurden für gewöhnlich Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.5.7.1 Radioaktive Messung der Proliferation

Um die Gesamtproliferation messen zu können, kam eine radioaktive Bestimmungsmethode zur Anwendung. Die Zellen in den Kulturen wurden für die letzten 20 h der Kultivierung mit 1,25 μ Ci ³H-Thymidin (ICN Biomedicals, Meckenheim) pro Napf inkubiert. Die Auswertung der Tests erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Zellerntegerät (Inotech, Dottikon, Schweiz) und einem Szintillationszähler (Perkin Elmer Life Sciences, Zaventem, Belgien).

2.5.7.2 Messung der Proliferation mit CFSE

Um die Proliferation einzelner Zellsubpopulationen in den Kulturen bestimmen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff CFSE verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das eigentlich farblose CFSE von den Zellen aufgenommen wird und durch zelleigene Esterasen in die fluoreszierende Form überführt wird, die über Aminogruppen kovalente Bindung mit endogenen Proteinen eingehen kann und so die Zelle anfärbt. Teilt sich eine solche Zelle, verliert sie rund 50% ihrer (markierten) Proteine an ihre Tochterzelle und dadurch auch die Hälfte der Gesamtfluoreszenz. Zellen, die sich noch nicht geteilt haben, lassen sich deshalb durchflusszytometrisch anhand von zwei klar getrennten Peaks von solchen unterscheiden, die bereits eine oder mehrere Mitosen durchgeführt haben.

Maximal 5×10^6 CD4⁺-T-Zellen bzw. DN-Emigranten wurden in 1 ml PBS mit 0,5 μ M CFSE (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 5 ml kaltem Medium gewaschen, zentrifugiert und in kaltem Medium resuspendiert. Um einen Referenzwert für ungeteilte Zellen zu erhalten, wurde ein Aliquot der CFSE-gefärbten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Für die Proliferationstests wurden die entsprechenden Mengen gefärbter CD4⁺-T-Zellen oder DN-Emigranten gemäß den Angaben unter Punkt 2.5.7 eingesetzt. Nach 90 h wurden die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aus den Kulturplatten gespült und für jede Behandlung gepoolt. Die einzelnen Proben wurden mit 5 ml PBS gewaschen, zentrifugiert, mit anti-CD4- und anti-TZR $\gamma\delta$ -Ak inkubiert und ihr CFSE-Fluoreszenzspektrum durchflusszytometrisch analysiert.

2.6 Immunfluoreszenz

2.6.1 Zellfärbung mit fluorochromgekoppelten Antikörpern

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden bis zu $1,5 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 100 μ l PBS/0,01% NaN₃ aufgenommen. Zellen, die aus Milz, Blut oder LN isoliert worden waren, wurden zunächst mit 1 μ l Fc-Block behandelt und für 10 min bei 8°C inkubiert. Hierdurch wird das Risiko falsch positiver Signale durch

unspezifische Bindungen reduziert. Nach diesem Schritt wurden die Proben mit bis zu vier Antikörpern unterschiedlicher Spezifität und Fluorochromkopplung für 10 min bei 8°C inkubiert. Pro Antikörper wurde ein Volumen von 1 µl eingesetzt (0,02 – 0,5 µg). Das im Färbepuffer befindliche Natriumazid blockiert die zelluläre Atmungskette und verhindert dadurch, dass die Zellen ihre mit Antikörpern verbundenen Oberflächenmoleküle an einem Punkt der Zelloberfläche konzentrieren und mitsamt der Membran abstreifen („capping“). Biotinylierte Antikörper wurden in einem zweiten Reaktionsschritt nach einmaligem Waschen mit 2 ml PBS/0,01% NaN₃ mit Streptavidin^{PerCP}, Streptavidin^{APC} oder Streptavidin^{PE} für weitere 10 min bei 8°C inkubiert. Um antigenunspezifische Bindungen von spezifischen Bindungen zu differenzieren, wurden parallel zu allen Färbungen Kontrollfärbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps, aber mit irrelevanter Spezifität durchgeführt. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen in 100-500 µl PBS/0,01% NaN₃ aufgenommen.

2.6.2 Apoptose-Messung mit Annexin V

Das Prinzip der Apoptose-Messung mit Annexin V beruht darauf, dass infolge der Apoptose die Asymmetrie der zellulären Plasmamembran verloren geht. Eines der frühesten apoptotischen Ereignisse in diesem Zusammenhang ist die Translokation des Phospholipides Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite der Membran. Annexin V bindet in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen an Phosphatidylserin und kann deshalb im fluorochromgekoppelten Zustand benutzt werden, um apoptotische Zellen durchflusszytometrisch zu detektieren. Da auch nekrotische bzw. spät-apoptotische Zellen Phosphatidylserin im extrazellulären Teil ihrer Plasmamembran aufweisen, kann bei Bedarf zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff wie PI oder 7-AAD eingesetzt werden, der nur in tote Zellen eindringen und sie so färben kann. Früh-apoptotische Zellen sind demnach Annexin V⁺ PI⁻/7-AAD⁻.

Ca. 5×10^5 der zu untersuchenden Zellen wurden mit den entsprechenden Ak wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben gefärbt, nach einem Waschschrift in 100 µl Annexin V-Bindungspuffer (Biosource, Camarillo, USA) resuspendiert, und mit 10 µl Annexin V^{FITC} (Biosource, Camarillo, USA) vermennt. In manchen Versuchen wurde

außerdem 5 µl PI hinzugefügt. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wurden die Proben mit 500 µl Annexin V-Bindungspuffer versetzt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.6.3 Durchflusszytometrische Analyse

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde ein FACScalibur™-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA) verwendet. Dieses Gerät bestrahlt die durch Fluorochrome markierten Zellen mit Laserlicht einer Wellenlänge von 488 nm und regt dadurch diese Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Licht einer charakteristischen Wellenlänge an, die gemessen wird. Für die Verwendung von Allophycocyanin als Fluoreszenzfarbstoff existiert in dem Durchflusszytometer ein zweiter Laser. Bei den durchflusszytometrischen Analysen wurden bis zu sechs unterschiedliche Parameter erfasst, die nachstehend aufgeführt sind.

- Vorwärtsstreulicht (FSC; Bestimmung der Zellgröße)
- Seitwärtsstreulicht (SSC; Bestimmung der Zellgranularität)
- Fluoreszenz 1 (Fluoresceinisothiocyanat (FITC); Emissionsmaximum: 520 nm)
- Fluoreszenz 2 (Phycoerythrin (PE); Emissionsmaximum: 575 nm)
- Fluoreszenz 3 (Peridinin Chlorophyll (PerCP); Emissionsmaximum: 680 nm)
- Fluoreszenz 4 (Allophycocyanin (APC); Emissionsmaximum: 660 nm)

Für eine statistisch fundierte Analyse der gefärbten Zellen wurden nach erfolgter elektronischer Kompensation am Durchflusszytometer die Daten von 1×10^4 – $1,5 \times 10^6$ Zellen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme CELLquest™, CELLquest-Pro™ und WinMDI™ für Windows™. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden anhand ihres charakteristischen Streulichtes von der Analyse ausgeschlossen.

Zur Berechnung der TCDD-vermittelten Herabregulation der Oberflächenmarker CD80 und CD86 auf DZs, wurde die „mean fluorescence intensity (MFI)“, die ein Maß

für die Expressionsdichte des jeweiligen Moleküls auf der Zelle darstellt, bestimmt. Die relative Regulation wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{MFI (TCDD - Histogramm) - MFI (Kontroll - Histogramm)}{MFI (Kontroll - Histogramm)} \times 100$$

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 RNA-Isolation aus fötalen DN-Emigranten

Die RNA-Isolation erfolgte gemäß eines von Baugh et al. beschriebenen Protokolls (133), welches eine Variante der ursprünglich von Chomczynski und Sacchi entwickelten Methode darstellt (134). RNA-Isolation sowie alle weiteren aufgeführten molekularbiologischen Untersuchungen wurden von M. Frericks durchgeführt.

Zwischen 2×10^5 und 5×10^5 aufgereinigte DN-Emigranten, die aus TCDD-exponierten bzw. Lösungsmittel-behandelten FTOCs isoliert worden waren, wurden in 30 μ l DEPC-H₂O aufgenommen und mit 300 μ l TRIzol™ (Invitrogen, Karlsruhe) vermischt. Bei TRIzol™ handelt es sich um eine monophasische Lösung, die die Reagenzien Phenol und Guanidiniumisothiocyanat enthält und in der Lage ist, Zellen sowie Zellkompartimente aufzulösen. Guanidiniumisothiocyanat bewirkt als chaotropes Salz darüber hinaus die Denaturierung von Proteinen und somit die Freisetzung von RNA-Molekülen aus Protein/RNA-Komplexen. Zur Steigerung der RNA-Ausbeute wurde der Lösung 5 μ g lineares Polyacrylamid (Sigma, Taufkirchen) als Fällhilfe beigemischt. Nach Zugabe von 60 μ l Chloroform (Sigma, Taufkirchen) und kurzem Durchmischen wurde die Lösung für 5 min bei 14.000 U/min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Bei diesem Vorgang wird die Lösung in eine organische und eine wässrige Phase separiert, wobei die RNA in letzterer gelöst ist. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol (Sigma, Taufkirchen) durch Inkubation bei -20°C über Nacht ausgefällt. Die RNA wurde danach durch 20 min Zentrifugation bei 14.000 U/min pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes und einmaliger Zugabe von 500 μ l 70%igem Ethanol (Sigma, Taufkirchen) für 10 min bei

14.000 U/min abzentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde die RNA in 10 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte anhand der Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) mit einem Spektralphotometer (Beckman, Krefeld). Zusätzlich wurde die OD₂₈₀ gemessen, mit der eine eventuelle Verunreinigung durch Proteine erfasst werden kann. In DEPC-H₂O beträgt der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ bei hochreiner RNA ca. 1,7-2,0. Die RNA-Konzentration ergibt sich – wie in der nachfolgenden Formel dargestellt – aus dem Produkt von OD₂₆₀, Verdünnungsfaktor und einem spezifischen Multiplikationsfaktor, der für RNA 40 beträgt.

$$RNA - Konz. [\mu g / ml] = OD_{260} \times Verdünnungsfaktor \times 40$$

2.7.3 Gelelektrophoretische Qualitätskontrolle der RNA

Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurden Aliquots auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 0,4 g Agarose (Sigma, Taufkirchen) in 40 ml TAE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid-Lösung (Sigma, Taufkirchen) versetzt (Endkonzentration: 2,5 µg/ml). Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte über einen Zeitraum von ca. 45 min bei 50 mA. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet.

2.7.4 RNA-Amplifikation

Die aus den fötalen DN-Emigranten isolierte RNA sollte als Ausgangsmaterial für eine detaillierte Microarray-gestützte Analyse des Expressionsprofils dieser Zellen mit und ohne TCDD-Einfluss dienen. Da aus den DN-Emigranten in einem Versuch jedoch < 200 ng an Gesamt-RNA isoliert werden konnten, für ein Microarray-

Experiment jedoch $>5 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA benötigt wurde, musste die RNA vor der weiteren Verwendung amplifiziert werden. Dies geschah mit Hilfe des MessageAMPTM-Kits (Ambion, Austin, USA), dessen Entwicklung auf eine im Labor von Eberwine entstandene Methode zurückzuführen ist (135). Bei dieser Methode wird ein Oligo(dT)-Primer eingesetzt, der zum einen an die mRNAs binden kann und der zum anderen die Promotersequenz der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 enthält. Die RNA-Polymerase katalysiert die Bildung von einsträngigen cDNA-Molekülen, die im nachfolgenden Reaktionsschritt durch die enzymatische Aktivität einer DNA-Polymerase in doppelsträngige cDNA (_{ds}cDNA)-Moleküle umgewandelt werden. Gleichzeitig werden die RNA-Moleküle enzymatisch verdaut. Die _{ds}cDNA dient im nächsten Reaktionsschritt als Matrize zur Herstellung zahlreicher aRNA (antisense RNA)-Moleküle. Das Prinzip dieser Methode ist in Abb. D zusammen-

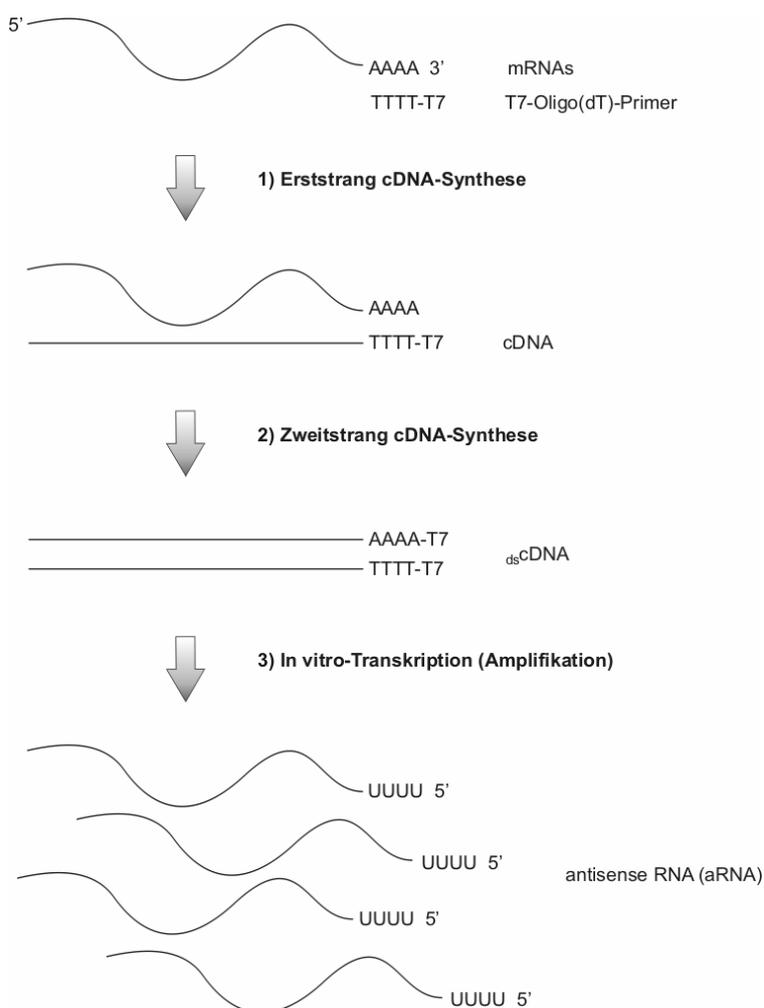


Abb. D: Prinzip der mRNA-Amplifikation nach Eberwine.

gefasst. In zwei voneinander unabhängigen Studien konnte demonstriert werden, dass durch die Verwendung dieser mRNA-Amplifikationsmethode keine signifikanten Verschiebungen bezüglich der relativen Häufigkeit individueller mRNAs auftreten (133,136) und deshalb die ursprüngliche in den zu untersuchenden Zellen vorhandene relative mRNA-Verteilung gewahrt bleibt. Die Durchführung der RNA-Amplifikation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.7.5 Probenvorbereitung und Genexpressionsanalyse mit der Affymetrix-Microarray-Technik

Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte die Biotinylierung der aRNA. Bei dieser Methode handelt es sich um eine *in vitro*-Transkription, die in Gegenwart von Nukleotiden durchgeführt wurde, von denen ca. 20% biotinyliert waren. Neben den schon bei der RNA-Amplifikation benutzten Oligo(dT)-Primern wurden außerdem zufällige Hexamerprimer (im Ambion-MessageAMP™-Kit enthalten) für die Reaktion eingesetzt, die unter der Verwendung des „BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kits (Enzo, Farmingdale, USA)“ in Analogie zu den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die für die Microarray-gestützte Genexpressionsanalyse notwendige Aufreinigung und Fragmentierung der Proben erfolgte mit Hilfe des „Affymetrix-GeneChip Sample Cleanup Moduls“ nach den Empfehlungen des Herstellers. Die Reinheit und Integrität der Proben wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

Die nachfolgenden Schritte, nämlich die Hybridisierung der Proben mit den Genchips sowie die Färbung mit Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin und das Scannen der Genchips wurde von der *Affymetrix Core Lab Facility* an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Bei dem verwendeten Affymetrix-Microarray handelte es sich um den „Mouse 430A GeneChip“, der 22.500 Gene bzw. Transkripte enthält. Jedes Transkript wird auf diesem Chip durch 22 unterschiedliche Oligonukleotid-Fragmente (bestehend aus je 25 Nukleotiden) repräsentiert. Hierbei weisen 11 von diesen Fragmenten die exakte Nukleotidsequenz des entsprechenden Gens auf („perfect match“), während die verbleibenden 11 Fragmente durch einen einzelnen Nukleotidaustausch von der genauen Sequenz abweichen („mismatch“) und daher eine Chip-interne Kontrolle für

die Spezifität der Hybridisierungsreaktion darstellen. Für die Evaluation der Daten enthält der Genchip außerdem noch Hybridisierungskontrollen, Poly-A-Kontrollen, Normalisierungskontrollen sowie „Housekeeping-Gen-Kontrollen“.

2.7.6 Auswertung der Microarrays

Die Normalisierung und Analyse der beim Scannen der Microarrays erzeugten Daten erfolgte mit Hilfe des *affy-package* (www.bioconductor.org) in Kombination mit der statistischen Software *R* (www.r-project.org) wie zuvor von Gautier et al. beschrieben (137).

Eine Veränderung in der Genexpression bei den TCDD-behandelten DN-Emigranten wurde als signifikant bewertet, wenn die folgenden Kriterien erfüllt wurden:

1. Die vorgefundene Expressionsänderung musste in zwei voneinander unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden können.
2. Das Ausmaß der Expressionsänderung musste in beiden Experimenten mindestens einen Faktor von 2,5 erreichen.

2.8 *In vivo*-Behandlung von Mäusen

2.8.1 TCDD-Injektion

Für die Untersuchungen zur Auswirkung von TCDD auf das Immunsystem neugeborener Mäuse erhielten trächtige Mäuse an Tag 15 der Schwangerschaft eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit 5 µg/kg Körpergewicht TCDD verdünnt in Olivenöl (Sigma, Taufkirchen). In allen übrigen Experimenten betrug die TCDD-Dosis 10 µg/kg Körpergewicht. Eine solche Dosis wirkt immunsuppressiv, induziert aber keine systemische Toxizität in C57BL/6-Mäusen. Kontrolltieren wurden jeweils eine entsprechende Menge DMSO in Olivenöl injiziert.

2.8.2 Thymektomie von adulten Mäusen (ATX)

Männliche Mäuse im Alter von vier bis sechs Wochen wurden durch i.p. Injektionen mit Rompun und Ketamin (Bayer Vital GmbH, Leverkusen), verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung, narkotisiert und auf einer Unterlage fixiert. Um das Ersticken des Tieres während der Operation zu verhindern, wurde die Zunge ein Stück aus dem Rachen hervorgezogen. Durch Unterschieben von zwei Pipettenspitzen wurde der Brustkorb höher gelagert. Nach Desinfektion des Brustraums mit 70% Ethanol wurde die Haut zwischen Clavicula und Sternum mit einer sterilen Knopfschere eingeschnitten und der große Brustmuskel über der Trachea mit Hilfe von zwei sterilen Pinzetten getrennt und zur Seite geschoben. Das Manubrium sterni wurde eingeschnitten und jeder der beiden Thymuslappen wurde einzeln über eine an einem Schlauch befestigte zurechtgesägte Pasteurpipette unter Zuhilfenahme einer Pinzette abgesaugt. Schein-operierte Mäuse wurden zur Kontrolle analog behandelt, jedoch wurde ihr Thymus nicht entfernt. Unmittelbar nach dem Eingriff wurde die Wunde zugeedrückt und mit Histoacryl-Wundkleber (Braun, Melsungen) verschlossen. Um das Auftreten von operationsbedingten Schmerzen abzumildern, wurde den Tieren Finadyne (Essex Tierarznei GmbH, München) injiziert. Die Mäuse wurden mit Papiertüchern zugedeckt und ihre Augen mit physiologischer Kochsalzlösung vor dem Austrocknen geschützt. Der Zustand der Tiere wurde in den nächsten Tagen regelmäßig kontrolliert. Damit sich die Mäuse vom Operationsstress erholen konnten, wurden sie erst nach einer zwei- bis dreiwöchigen Ruhephase für die weiteren Experimente eingesetzt.

2.8.3 Induktion der Kontaktsensibilisierung (CHS-Reaktion)

Die CHS-Reaktion ist eine entzündliche Hautreaktion, die zu den so genannten Hypersensibilitätsreaktionen vom verspäteten Typ gehört. Grundlage dieser Immunreaktion ist die wiederholte topische epidermale Applikation einer sensibilisierenden Substanz (Nickel, DNFB, FITC...), die letztendlich zur Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen und zur Entzündung und Schwellung der exponierten Hautstelle führt. Bei der Untersuchung der CHS-Reaktion im Rahmen dieser Arbeit kam der so genannte Mausohrschwellungstest (MEST) zur Anwendung.

Männliche ATX- oder schein-operierte Mäuse wurden fünf Tage, nachdem sie mit TCDD bzw. Öl injiziert worden waren, durch Applikation von 60 µl einer 0,5% DNFB-Lösung (Sigma, Taufkirchen; Lösungsmittel: Aceton/Olivenöl im Verhältnis 4:1) auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Kontrolltiere erhielten nur Lösungsmittel. Die Reaktion wurde fünf Tage später durch Applikation von je 10 µl 0,3% DNFB-Lösung auf die Innen- und Außenseite beider Ohren induziert („Challenge“). Um einen Referenzwert für das Ausmaß der Schwellung zu haben, wurde die Ohrdicke vor dem „Challenge“ mit einem Mikrometer (Mitutoyo, Neuss) bestimmt. Die Intensität der CHS-Reaktion wurde 24 h später als Zunahme der Ohrschwellung gemessen. Dies ist ein in zahlreichen Studien untersuchter Zeitpunkt, da die inflammatorische Phase der CHS-Reaktion bekanntermaßen nach 24 h ihren Höhepunkt erreicht (138). Vor der Bestimmung der Ohrdicke wurden die Mäuse kurzzeitig mit CO₂ narkotisiert. Die Gruppen in diesen Experimenten bestanden jeweils aus fünf Mäusen.

Anschließend wurden die Mäuse durch CO₂-Asphyxiation getötet und die aurikulären LN wurden entfernt. Es wurden Einzelzellsuspensionen aus den beiden LN jeder Maus hergestellt, die Zellzahl ermittelt und die Suspensionen jeder Behandlungsgruppe für die weitere durchflusszytometrische Analyse gepoolt.

2.8.3.1 Zellzyklus-Analyse im aurikulären LN während der CHS-Reaktion

Zur Untersuchung der Proliferation von CD4⁺-T-Zellen, B-Zellen und DZs im aurikulären LN während der CHS-Reaktion wurde das FITC-BrdU-Flow-Kit (Pharmingen, Heidelberg) benutzt. Die CHS-Reaktion wurde in TCDD- bzw. Öl-injizierten ATX- und schein-operierten Mäusen analog zu der in Abschnitt 2.7.3 beschriebenen Vorgehensweise induziert. Nach dem „Challenge“ wurde den Tieren i.p. 1 mg BrdU injiziert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das in die neu zu synthetisierende DNA proliferierender Zellen eingebaut und mit Hilfe eines spezifischen Ak detektiert werden kann. 24 h später wurden die Mäuse durch CO₂-Asphyxiation getötet, und die aurikulären LN wurden entfernt. Aus den LN wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und für jede Behandlungsgruppe gepoolt. Aliquots wurden mit Fc-Block behandelt und mit anti-CD4- und anti-CD19- bzw. anti-CD11c- und anti-CD40-Ak gefärbt. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte gemäß den

Angaben des dem BrdU-Flow-Kit beiliegenden Protokolls. In Kürze zusammengefasst wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die DNA denaturiert, um die BrdU-Epitope zu exponieren. Anschließend wurden die Zellen mit anti-BrdU-Ak und dem Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD inkubiert, der in doppelsträngige DNA interkalieren kann und es so erlaubt, den DNA-Gehalt einer Zelle zu bestimmen. Die durchflusszytometrische Gegenüberstellung von BrdU- und 7-AAD-Fluoreszenz erlaubt die Detektion von Zellen, die sich in der S-Phase ($\text{BrdU}^{\text{stark}}/\text{7-AAD}^{-/+}$) befinden und solchen, die bereits in der G₂-Phase bzw. Mitose ($\text{BrdU}^{\text{schwach}}/\text{7-AAD}^+$) sind.

2.8.4 Intrathymische FITC-Injektion und Detektion der Emigranten

Die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes FITC in den Thymus ermöglicht die Untersuchung der Emigration *in vivo*. FITC bindet über die ϵ -Aminogruppe von Lysin-Resten kovalent an Proteine an der Zelloberfläche. Auf diese Weise wird ein Teil der Thymozyten markiert (der Anteil lag in dieser Arbeit zwischen 30 und 80%), darunter auch solche, die den Thymus in der nächsten Zeit als Emigranten verlassen werden. Solche Zellen lassen sich dann in der Peripherie detektieren und unter Verwendung geeigneter Ak durchflusszytometrisch näher charakterisieren. Diese Methode ist besonders gut für die Untersuchung der Emigration geeignet, da die Markierung von Lymphozyten mit FITC deren Migrationsverhalten nicht verändert (139).

Euthymische männliche Mäuse im Alter von ca. fünf Wochen wurden mit TCDD oder Öl injiziert. Fünf Tage darauf wurden die Tiere durch Applikation von 60 μl 0,5% DNFB-Lösung auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die intrathymische FITC-Injektion wurde weitere fünf Tage später durchgeführt. Zur Herstellung der Injektionslösung wurde 1 mg FITC (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in 1 ml PBS gelöst. Die Operation der Mäuse verlief zunächst analog zur Vorgehensweise bei der ATX, einschließlich der Freilegung des Thymus (siehe Abschnitt 2.7.2). In jeden Thymuslappen wurden 10 μl der FITC-Lösung bzw. PBS zur Kontrolle injiziert und die Wunde unmittelbar danach mit Histoacryl-Wundkleber verschlossen. Nach Beendigung des Eingriffs wurde bei den Mäusen eine CHS-Reaktion durch Applikation von je 10 μl 0,3% DNFB-Lösung auf die Innen- und Außenseite beider Ohren ausgelöst. Die Mäuse wurden mit Papiertüchern zugedeckt und ihre Augen

mit physiologischer Kochsalzlösung vor dem Austrocknen geschützt. 24 h nach der Operation wurden die Tiere durch CO₂-Asphyxiation getötet, und die aurikulären LN wurden entnommen. Nach Herstellung der Einzelzellsuspensionen und Bestimmung der Zellzahl wurden von den gepoolten Proben jedes Individuums Aliquots genommen, mit Fc-Block behandelt und mit anti-CD4- und anti-CD8-Ak gefärbt. Detektion der FITC⁺-Emigranten erfolgte durchflusszytometrisch im Vergleich zur PBS-Kontrolle.

Die Zahl der im LN mit dieser Methode zu detektierenden Emigranten hängt von der Effizienz der zuvor erfolgten FITC-Färbung im Thymus, also der Zahl der gefärbten Thymozyten ab. Um die Ergebnisse dieser Experimente zwischen verschiedenen Tieren vergleichbar zu machen, wurde die Zahl der detektierten Emigranten in den *in vivo*-Experimenten auf 1×10^7 FITC⁺-Thymozyten normalisiert. Der dadurch erhaltene Wert wird im weiteren Text als „effective thymic output (ETO)“ bezeichnet. Bei den FTOC-Experimenten wurde der ETO zweckmäßigerweise auf 1×10^5 Thymozyten bezogen.

2.8.5 *In vivo*-Migrations-Assay für dendritische Zellen (DZs)

Um die Migration Antigen-beladener DZs von der Antigen-Expositionsstelle bis zum drainierenden LN *in vivo* verfolgen zu können, wurde in euthymischen TCDD- und Öl-injizierten Mäusen eine CHS-Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC induziert. FITC bietet den Vorteil, dass es auf der einen Seite sensibilisierende Eigenschaften hat und zum anderen, dass es über die Bildung einer kovalenten Bindung mit Proteinen Zellen markieren kann. Die in der Haut angefärbten DZs oder Langerhans-Zellen lassen sich einige Stunden später in den drainierenden LN als FITC⁺-Zellen nachweisen.

Euthymische männliche Mäuse im Alter von fünf bis sechs Wochen wurden mit TCDD oder Öl injiziert. Fünf Tage später wurden sie durch Applikation von 200 µl 0,5% FITC-Lösung [Lösungsmittel Aceton/Dibutylphthalat (Sigma, Taufkirchen) im Verhältnis 1:1] auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Kontrolltiere erhielten nur Lösungsmittel. Die CHS-Reaktion wurde weitere fünf Tage später durch Applikation von je 10 µl 0,3% FITC-Lösung auf die Innen- und Außenseite beider Ohren

induziert. Die Mäuse wurden hierfür kurzzeitig mit CO₂ narkotisiert. 16 bzw. 24 h später wurden die Tiere durch CO₂-Asphyxiation getötet und die aurikulären LN wurden entfernt. Aus den beiden LN jeder Maus wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellzahl bestimmt. Aliquots wurden mit Fc-Block behandelt und mit anti-CD11c- und anti-CD80-Ak gefärbt. Von der Antigen-Expositionsstelle in den drainierenden LN eingewanderte DZs wurden durchflusszytometrisch als FITC⁺CD11c⁺-Zellen identifiziert.

2.9 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Programm GraphPad PrismTM verwendet. Die Bewertung der Signifikanz für Unterschiede bei den Ergebnissen der verglichenen Gruppen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind als „Mittelwert ± SEM“ dargestellt. Die Unterschiede zwischen behandelten und Kontroll-Gruppen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,01$ (*), $p < 0,005$ (**) oder $p < 0,001$ (***).

3. Ergebnisse

3.1 TCDD induziert eine präferentielle Emigration von DN-Zellen in der FTOC

Es ist bekannt, dass TCDD eine Reihe von Prozessen im Thymus beeinflusst, was u.a. dessen Atrophie aber auch eine Veränderung der Frequenzen der CD4- und/oder CD8-exprimierenden Subpopulationen zur Folge hat. Über die Auswirkungen auf die Emigration und eine somit denkbare Verbindung zwischen Thymus und peripherer Immunsuppression ist hingegen kaum etwas bekannt.

Um zu untersuchen, inwiefern TCDD die Emigration aus dem Thymus sowohl quantitativ als auch qualitativ verändert, wurden fötale Thymuslappen von C57BL/6-Mäusen mit 10 nM TCDD bzw. Dioxan als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden aus den Kulturen Emigranten und Thymozyten isoliert, gezählt und durchflusszytometrisch bezüglich der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 analysiert. Die absoluten Zahlen von Emigranten und Thymozyten sind in Abb. 1 dargestellt. Wie erwartet induzierte TCDD die Atrophie des Thymus in der FTOC und reduzierte dabei die Anzahl der Thymozyten an allen drei untersuchten Zeitpunkten um mehr als 60%. Gleichzeitig wurde auch die Anzahl der Emigranten signifikant verringert. Das Ausmaß der Reduktion der aus dem

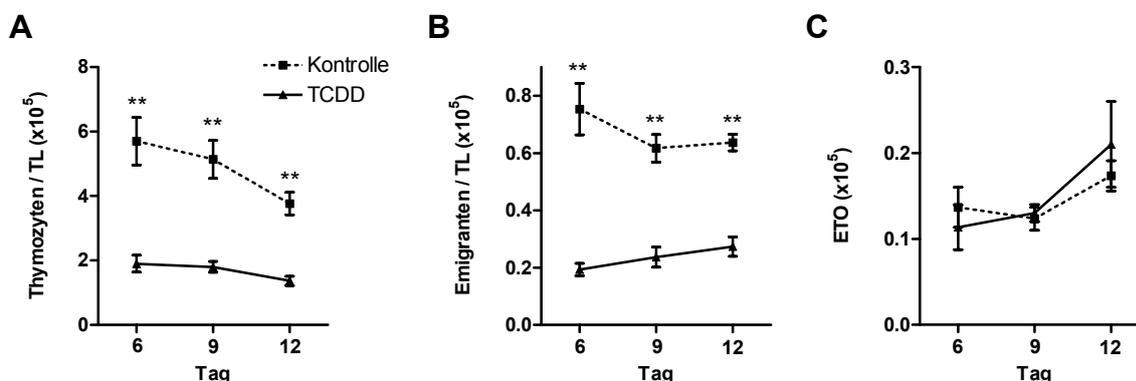


Abb. 1: TCDD reduziert die Anzahl der Emigranten und Thymozyten in der FTOC. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden Thymozyten (A) und Emigranten (B) isoliert und gezählt. (C) Die Anzahl der Emigranten wurde auf 1×10^5 Thymozyten normalisiert [„effective thymic output (ETO)“]. Die Ergebnisse repräsentieren die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Thymus ausgewanderten Zellen spiegelte in etwa den Grad der Atrophie wider und erreichte über 70% an Tag 6. Da die Anzahl der Emigranten von der Anzahl der Thymozyten abhängt, ist es möglich, dass die TCDD-induzierte Reduktion der Gesamtzahl der Emigranten eine direkte Folge der Thymusatrophie ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Anzahl der Emigranten in TCDD-behandelten und Kontrollkulturen auf 1×10^5 Thymozyten normalisiert. Der daraus resultierende Wert wird auch als „effective thymic output (ETO)“ bezeichnet. Wie man aus Abb. 1C entnehmen kann, unterschied sich der ETO für TCDD-belastete Thymi nicht von den Kontrollen, was darauf hindeutet, dass die Reduktion der Emigranten auf die Thymusatrophie zurückzuführen ist.

Analysiert man fötale Thymozyten bezüglich ihrer CD4- und CD8-Expression, so ergab sich für die Kontroll-FTOCs, dass DP-Zellen die häufigste Subpopulation an allen drei untersuchten Zeitpunkten darstellen (Abb. 2; Tab. 1). Dies zeigte sich besonders deutlich an Tag 6, wo sie einen Anteil von mehr als 60% hatten, was $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Thymuslappen entspricht. Bis Tag 12 fiel ihre Frequenz auf unter 40% ab ($1,3 \times 10^5$ Zellen/TL) zugunsten eines Anstiegs von einfach positiven (SP)

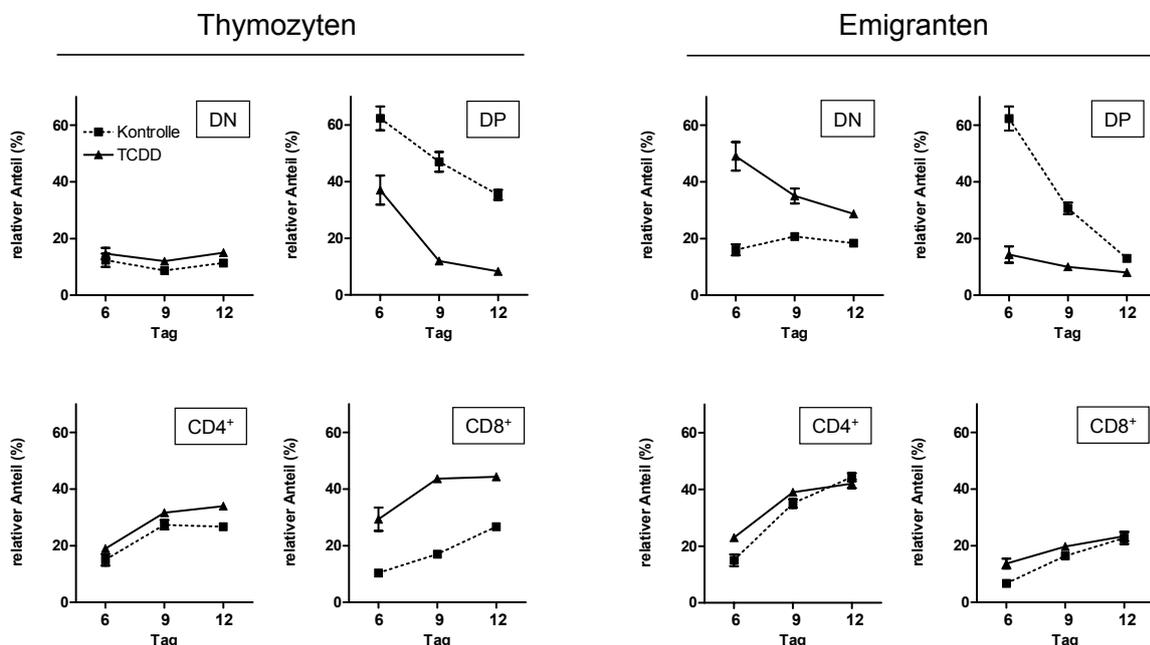


Abb. 2: Effekt von TCDD auf die Frequenzen von DN-, DP-, CD4⁺- und CD8⁺-Thymozyten und Emigranten in der FTOC. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, mit anti-CD4- und CD8-Ak gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Figur zeigt die jeweilige prozentuale Verteilung der vier Subpopulationen. Die Ergebnisse repräsentieren die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, die beide jeweils am letzten Tag der Kultur nahezu 30% aller Thymozyten ausmachten. Im Gegensatz zu DP- und SP-Zellen, deren Anteil im Verlauf der Kultur größeren Schwankungen unterworfen war, blieb der Prozentsatz der DN-Thymozyten mit 10-15% relativ konstant, ein Ergebnis, dass sich auch in der TCDD-behandelten FTOC wieder fand. DP-Thymozyten waren unter dem Einfluss von TCDD dagegen deutlich reduziert. Bereits an Tag 6 machten sie weniger als 40% aller Zellen im fötalen Thymus aus ($7,1 \times 10^4$ Zellen/TL), und bis Tag 12 sank ihre Frequenz auf knapp 10% ($1,2 \times 10^4$ Zellen/TL). Dafür zeigte sich an allen drei

Tab. 1: Einfluss von TCDD auf die absoluten Zellzahlen von CD4/CD8-Subpopulationen bei fötalen Thymozyten und Emigranten.^a

		DN		DP		CD4		CD8	
		Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD	Kontrolle	TCDD
TL	d6	7,3 ± 2.7	2,8 ± 0.4	35,4 ± 6.9	7,1 ± 2.2**	8,4 ± 1.7	3,6 ± 0.9*	6,0 ± 1.5	5,4 ± 0.8
	d9	3,9 ± 0.5	2,0 ± 0.1**	24,5 ± 6.7	2,3 ± 0.3**	14,2 ± 1.0	6,2 ± 1.5**	8,8 ± 0.6	7,5 ± 0.7
	d12	4,2 ± 0.4	2,2 ± 0.6*	13,3 ± 2.4	1,2 ± 0.2**	9,9 ± 1.2	4,6 ± 0.8**	10,3 ± 1.2	5,9 ± 0.6**
Emigranten	d6	1,2 ± 0.1	0,9 ± 0.2	4,8 ± 1.2	0,3 ± 0.1**	1,1 ± 0.0	0,4 ± 0.1***	0,5 ± 0.1	0,3 ± 0.1*
	d9	1,3 ± 0.2	0,7 ± 0.1*	1,9 ± 0.1	0,2 ± 0.0***	2,0 ± 0.3	1,0 ± 0.2*	1,0 ± 0.1	0,5 ± 0.1*
	d12	1,1 ± 0.1	0,7 ± 0.0**	0,7 ± 0.2	0,2 ± 0.0*	2,8 ± 0.3	1,1 ± 0.2**	1,7 ± 0.2	0,6 ± 0.1**

^aFötale TL wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel kultiviert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden Emigranten und Thymozyten isoliert und mit anti-CD4 und CD8-Ak gefärbt. Die absoluten Zellzahlen der Subpopulationen wurden mit Hilfe der Frequenzen und absoluten Zahlen von Thymozyten und Emigranten berechnet. Die angegebenen Zahlen repräsentieren die mittlere Zellzahl pro TL x 10⁴ (± SD) aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

untersuchten Zeitpunkten die von mehreren unabhängigen Studien gefundene und für eine TCDD-Exposition charakteristische relative Zunahme an CD8⁺-Thymozyten, die – im Gegensatz zu den Kontroll-Kulturen – deutlich verbreiteter als CD4⁺-Zellen waren.

Betrachtet man das phänotypische Erscheinungsbild der Thymusemigranten aus den Kontroll-FTOCs, so zeigte sich, dass der Großteil dieser Zellen (ca. 60%) an Tag 6 in Analogie zu den Thymozyten überraschenderweise DP war, obwohl Thymusemigranten für gewöhnlich SP-Zellen sind (67). Um ein Kulturartefakt auszuschließen, wurde trächtigen Mäuse an Tag 15 der Schwangerschaft (entsprechend dem Starttag der FTOC) eine TCDD-Dosis von 5 µg/kg Körpergewicht injiziert. 5-6 Tage später wurden Thymus, Milz und Blut der neugeborenen Mäuse bezüglich ihres Anteils an DP-Zellen untersucht. Während die Milzen dieser Mäuse – unabhängig

davon, ob die Tiere zuvor mit TCDD behandelt worden waren oder nicht – praktisch keine DP-Zellen enthielten, waren 43% der Lymphozyten im Blut der Kontroll-Tiere DP (Tab. 2). Dieses Ergebnis ähnelt den Resultaten einer Studie von Bonomo und Mitarbeitern, die signifikante Mengen DP-Zellen in den peripheren LN von drei Tage alten Mäusen detektieren konnten (aber ebenfalls nicht in der Milz) und zeigten, dass diese Zellen aus dem Thymus stammten (66). Bei neugeborenen Mäusen, die *in*

Tab. 2. Anteile DP-Zellen in Thymus, Blut und Milz von neugeborenen Mäusen.^a

Gewebe ^b	%	
	Kontrolle	TCDD
Thymus	89	85
Blut	43	15
Milz	<1	<1

^a Trächtige Mäuse wurden an Tag 15 der Schwangerschaft mit einer TCDD-Dosis von 5 µg/kg Körpergewicht injiziert. Kontroll-Tiere erhielten nur Lösungsmittel. Einen Tag nach der Geburt wurden die neugeborenen Mäuse getötet und Thymus, Milz und Blut wurden entnommen. Aliquots der gewonnenen Einzelzellsuspensionen wurden mit anti-CD4- und CD8-Ak gefärbt, um den Anteil DP-Zellen bestimmen zu können.

^b Die Gewebe wurden für die Analyse von n=3 (Kontrolle) und n=5 (TCDD) Mäusen gepoolt.

utero TCDD ausgesetzt gewesen waren, war der Anteil DP-Lymphozyten im Blut auf 15% reduziert, ein Ergebnis, dass die TCDD-induzierte Reduktion der DP-Thymozyten in der FTOC widerspiegelt. Bei den Kontroll-FTOCs fiel der Anteil an DP-Zellen nach Tag 6 jedoch drastisch ab und erreichte an Tag 12 nur noch knapp über 10%, wohingegen die Frequenzen von SP-Emigranten, insbesondere CD4⁺-Zellen, in diesem Zeitraum deutlich zunahmen. Ähnlich wie bei den Thymozyten blieb der Anteil an DN-Zellen relativ konstant, wenn auch bei den Emigranten die Frequenz etwas höher war (15-20%). Im Gegensatz dazu stellten die DN-Emigranten in der TCDD-FTOC an Tag 6 mit ca. 50% die mit Abstand größte Subpopulation dar, wobei jedoch bezüglich ihrer absoluten Zahl kein signifikanter Unterschied zu den Kontroll-FTOCs vorlag. Im weiteren Verlauf der Kultur sank der Anteil der DN-Emigranten stetig ab und erreichte nur noch 30% an Tag 12, ein Wert, der allerdings immer noch deutlich über dem der Kontroll-FTOC lag. Obwohl CD8⁺-Zellen unter TCDD-Einfluss im Thymus deutlich häufiger vorkamen als CD4⁺-Zellen, emigrierte

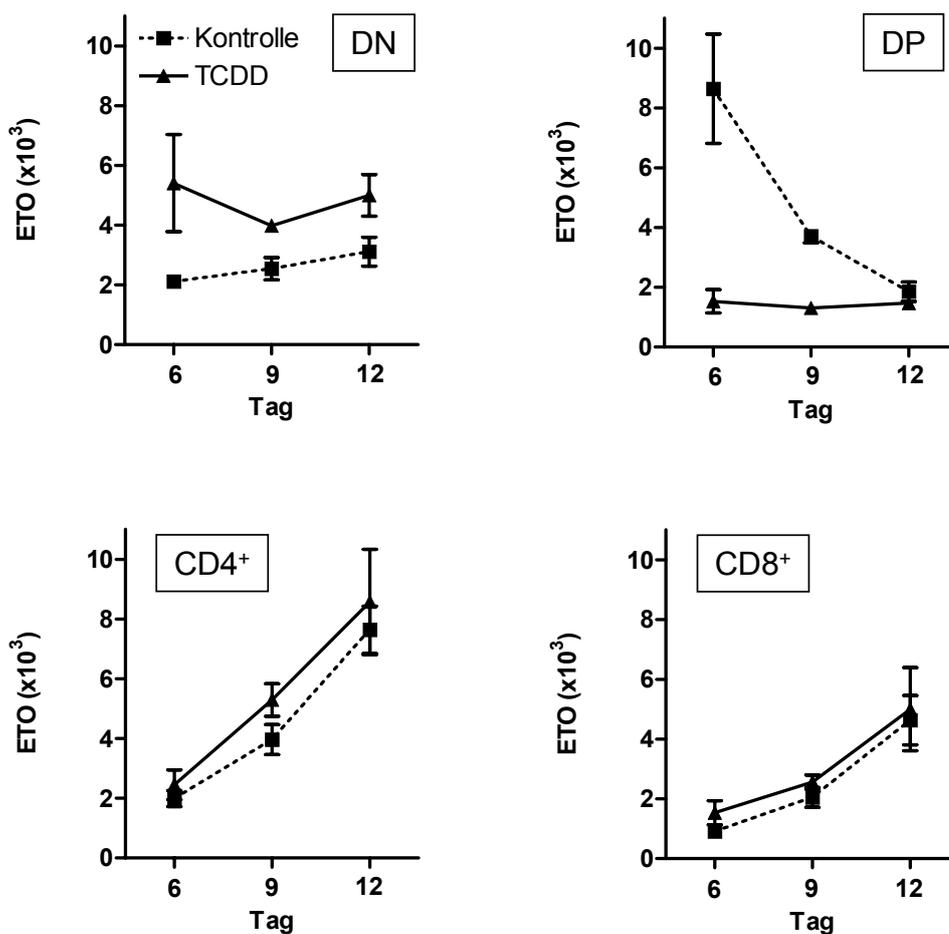


Abb. 3: Einfluss von TCDD auf den ETO von DN-, DP-, CD4⁺- und CD8⁺-Emigranten in der FTOC. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, gezählt, mit anti-CD4- und CD8-Ak gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Nach Bestimmung der absoluten Zahlen für die Emigranten-Subpopulationen wurde dieser Wert jeweils auf 1×10^5 Thymozyten normalisiert, um den ETO zu berechnen. Die Ergebnisse repräsentieren die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

aus diesen Thymi ein deutlich höherer Anteil an CD4⁺-Zellen. Überhaupt scheint sich das Emigrationsverhalten von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in TCDD- und Kontroll-FTOCs nicht zu unterscheiden, wie sich aus den nahezu identischen prozentualen Anteilen dieser Zellen an den verschiedenen untersuchten Zeitpunkten schließen lässt. Nur sehr wenige Emigranten, die aus den TCDD-FTOCs isoliert wurden, waren DP. Ihr Anteil erreichte an Tag 6 etwa 15% und fiel auf 8% an Tag 12. Analysiert man die absoluten Zahlen der verschiedenen Emigranten-Subpopulationen, so zeigt sich, dass TCDD an allen drei untersuchten Zeitpunkten die Auswanderung von CD4⁺,

CD8⁺-, DP- und DN-Zellen signifikant reduzierte, mit Ausnahme der DN-Emigranten an Tag 6 der Kultur (Tab. 1).

Berechnet man den ETO für die verschiedenen Subpopulationen, so zeigt sich, dass die Menge an DN-Emigranten in TCDD-FTOCs an allen Tagen deutlich höher war als in Kontroll-FTOCs, insbesondere aber an Tag 6 (Abb. 3), was auf eine präferentielle Emigration dieser Zellen hindeutet. Auf der anderen Seite war der ETO für DP-Zellen in den TCDD-FTOCs drastisch erniedrigt, wohingegen TCDD keinen signifikanten Einfluss auf den ETO von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen hatte.

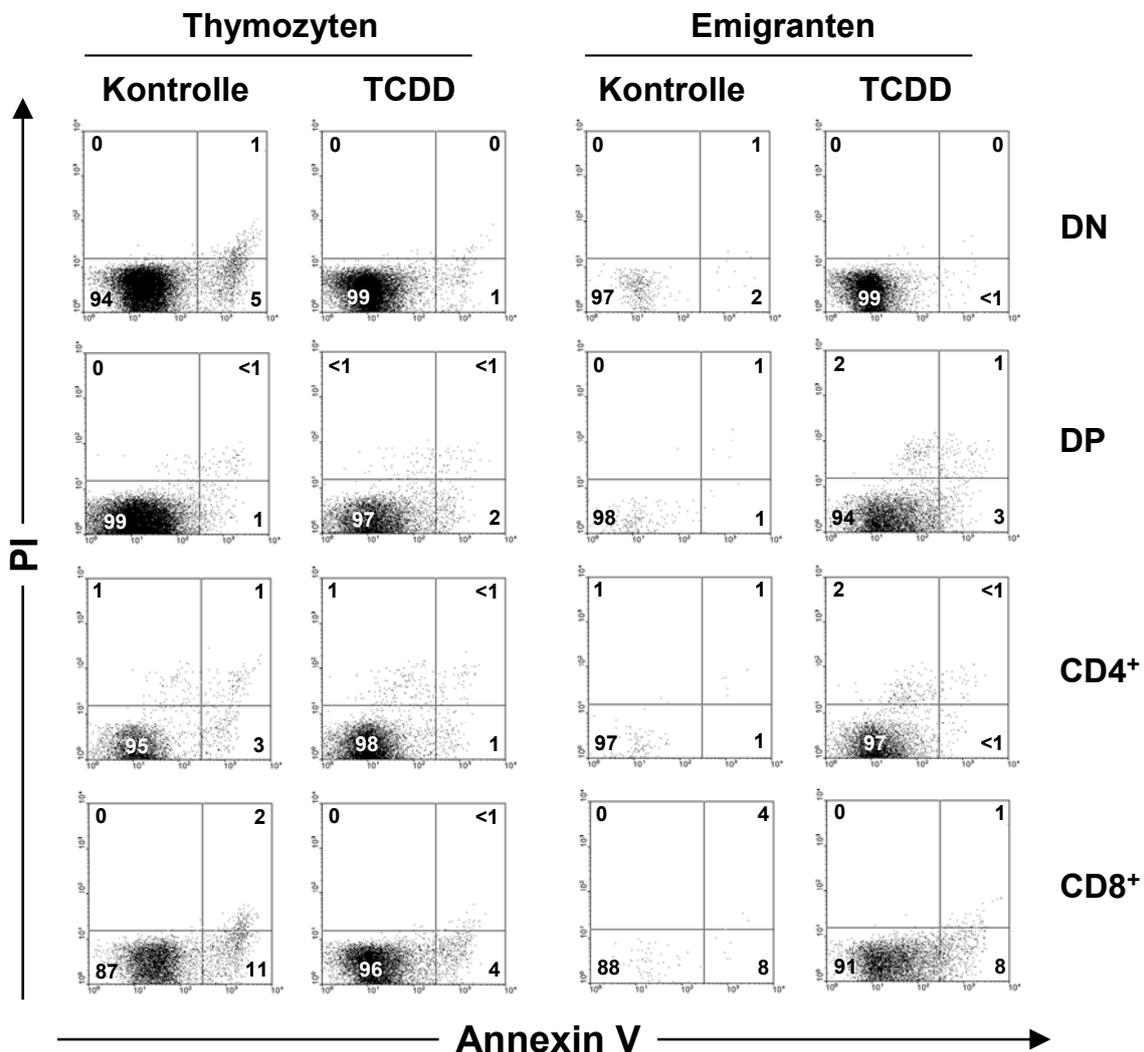


Abb. 4: Apoptose unter Thymozyten- und Emigranten-Subpopulationen. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, mit anti-CD4- und CD8-Ak sowie PI und Annexin V gefärbt. Anschließend wurden die unterschiedlichen CD4/CD8-exprimierenden Subpopulationen durchflusszytometrisch bezüglich ihres Anteils an apoptotischen Zellen analysiert. Die Zahlen geben die relativen Anteile in Prozent wider. Die Daten zeigen die Ergebnisse eines Experimentes, das ein weiteres mal mit ähnlichem Ausgang durchgeführt wurde.

Die hier beschriebenen Effekte scheinen nicht auf eine durch TCDD induzierte gesteigerte Apoptose zurückzuführen zu sein, da zumindest nach 6-tägiger FTOC weder bei den Thymozyten noch bei den Emigranten für eine der Subpopulationen größere Unterschiede detektiert werden konnten (Abb. 4). Der Anteil apoptotischer Zellen erreichte nur bei den CD8⁺-Zellen 10%, lag ansonsten aber deutlich darunter.

3.2 TCDD erhöht den relativen Anteil an TZR $\gamma\delta^+$ -NKT-Zellen in fötalen DN-Thymozyten und Emigranten

Wie aus Abschnitt 3.1 hervorgeht, bewirkt die Exposition des fötalen Thymus mit TCDD eine präferentielle Emigration von DN-Zellen. DN-Zellen repräsentieren einen heterogenen Zelltyp, der sich aus zahlreichen Subpopulationen zusammensetzt. Neben den unreifen T-Zellvorläufern existieren im Thymus auch eine Reihe von reifen DN-Zelltypen einschließlich NK-Zellen, einer Subpopulation von TZR $\alpha\beta$ -Zellen, den meisten TZR $\gamma\delta$ -Zellen, manchen NKT-Zellen und sogar B-Zellen.

Da die ersten T-Zellen, die während der Ontogenese der Maus im Thymus entstehen, TZR $\gamma\delta$ -Zellen sind (29), wurde zunächst überprüft, ob die präferentielle

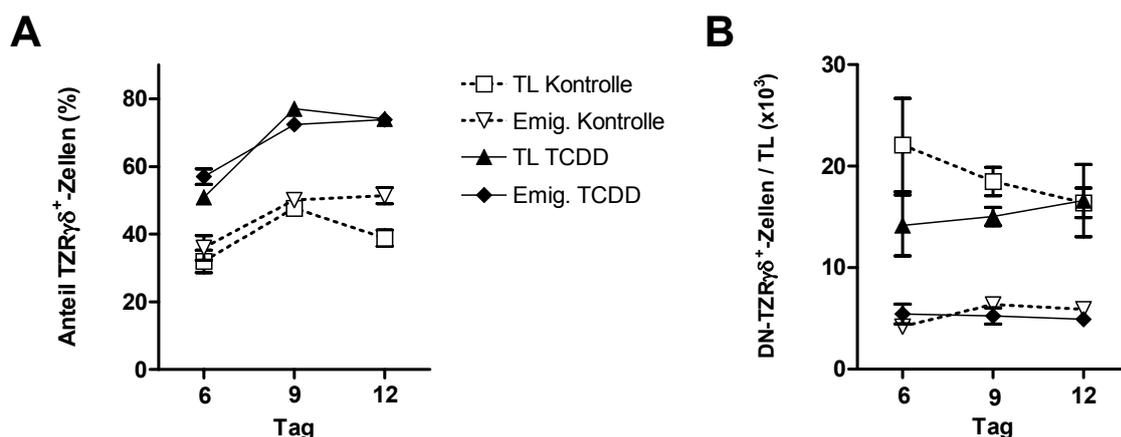


Abb. 5: Entstehung von DN TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen in der FTOC unter dem Einfluss von TCDD. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, gezählt, mit anti-CD4-, CD8- und TZR $\gamma\delta$ -Ak gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. (A) Die DN-Thymozyten und Emigranten wurden bezüglich ihres Anteils an TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen untersucht. (B) Mit Hilfe der Frequenzen wurden die absoluten Zahlen der DN TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen berechnet. Die Ergebnisse repräsentieren die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Emigration von DN-Zellen in TCDD-FTOCs durch TZR $\gamma\delta$ -Zellen verursacht wird. Deshalb wurden fötale Emigranten und Thymozyten nach 6, 9 oder 12 Tagen aus der FTOC isoliert und mit gegen CD4, CD8 und TZR $\gamma\delta$ gerichteten Ak gefärbt. Wie aus Abb. 5A ersichtlich wird, war ein hoher Anteil DN-Thymozyten und Emigranten tatsächlich TZR $\gamma\delta^+$, wobei die Frequenz in TCDD-FTOCs zu allen drei untersuchten Zeitpunkten deutlich höher war, als in den Kontroll-Kulturen. An Tag 9 und 12 stieg der Prozentsatz dieser Zellen unter TCDD-Einfluss bis auf über 70% an, wobei kein Unterschied zwischen Thymozyten und Emigranten zu erkennen war. Bezüglich der absoluten Zahlen an DN-TZR $\gamma\delta$ -Zellen konnten hingegen weder für Thymozyten noch für Emigranten signifikante Veränderungen zwischen TCDD-belasteten und Kontroll-Kulturen gefunden werden (Abb. 5B). Auffällig ist, dass trotz der Schwankungen der absoluten Zahlen der TZR $\gamma\delta$ -Thymozyten eine über den Zeitraum der Kultur konstante Menge an TZR $\gamma\delta$ -Zellen aus dem Thymus emigrierte. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die DN-Zellen keine nennenswerten Mengen an B-Zellen (<2% IgM⁺-Zellen an Tag 6) und nur wenige TZR $\alpha\beta^+$ -Zellen (<2% an Tag 6, <8% an Tag 9 und 12) enthielten, wobei keine klaren Unterschiede zwischen TCDD-behandelten und unbelasteten Kulturen zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt).

Es ist bekannt, dass eine Subpopulation von NKT-Zellen ebenfalls den TZR $\gamma\delta$ exprimiert (50). Um zu überprüfen, ob es sich bei den DN-TZR $\gamma\delta$ -Zellen in der FTOC zumindest teilweise um NKT-Zellen handelt, wurden fötale Thymozyten und Emigranten nach 6, 9 oder 12 Tagen aus der Kultur isoliert und zusätzlich zu anti-CD4-, anti-CD8- und anti-TZR $\gamma\delta$ -Ak mit anti-NK1.1-Ak gefärbt. NK1.1 ist ein Marker, der in C57BL/6-Mäusen von den meisten NK- bzw. NKT-Zellen exprimiert wird und deswegen häufig zu deren Charakterisierung verwendet wird. Wie in Abb. 6 gezeigt ist, handelte es sich bei einem Teil der DN-TZR $\gamma\delta$ -Zellen tatsächlich um NKT-Zellen. Unter den Kontroll-Thymozyten machten sie allerdings nur 4-9% aller DN-Zellen (15-20% der DN-TZR $\gamma\delta$ -Zellen) aus. Die Exposition mit TCDD bewirkte an Tag 6 und 9 der FTOC bei den Thymozyten eine leichte Zunahme der DN-TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen auf 11% aller DN-Zellen, wohingegen ihr Anteil an Tag 12 deutlich auf 30% anstieg (41% aller DN-TZR $\gamma\delta$ -Zellen).

Vergleicht man die DN-Thymozyten mit den Emigranten, so stellt sich heraus, dass die Frequenz der DN-TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen bei den Emigranten fast immer höher war.

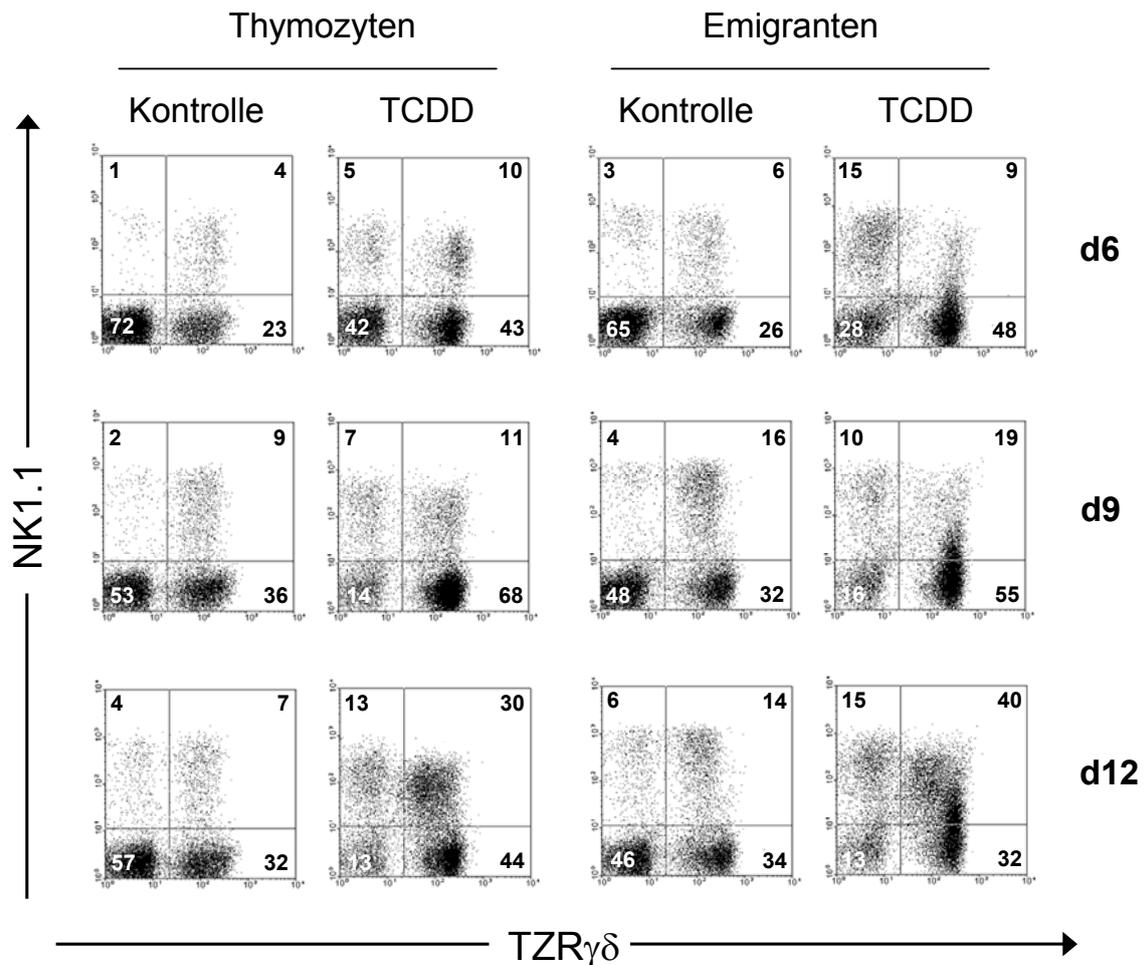


Abb. 6: TCDD beeinflusst die Entstehung von DN-TZR $\gamma\delta$ ⁺-NKT-Zellen in der FTOC. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, mit anti-CD4-, CD8-, TZR $\gamma\delta$ - und NK.1.1-Ak gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Frequenzen an TZR $\gamma\delta$ /NK1.1-exprimierenden Zellen unter DN-Thymozyten und Emigranten. Die Zahlen geben die relativen Anteile in Prozent wider. Die Daten zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes, das insgesamt dreimal durchgeführt wurde.

Ihr Anteil erreichte bis zu 16% aller DN-Zellen in den Kontroll-Kulturen (33% der DN-TZR $\gamma\delta$ -Zellen) und unterschied sich damit kaum von den Ergebnissen für die TCDD-FTOC an Tag 6 und 9 (9 bzw. 19% aller DN-Zellen). An Tag 12 der Kultur kam es jedoch – ähnlich wie bei den DN-Thymozyten – zu einem dramatischen TCDD-induzierten Anstieg der DN-TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen, die zu diesem Zeitpunkt 40% aller DN-Zellen bzw. 56% der DN-TZR $\gamma\delta$ -Zellen ausmachten. Interessanterweise scheinen die unter TCDD-Einfluss generierten DN-TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen im Durchschnitt eine geringere Expression des TZR $\gamma\delta$ aufzuweisen, was besonders gut an Tag 12 zu beobachten war. Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen an

TZR $\alpha\beta$ -NKT-Zellen, die häufig auch als TZR $\alpha\beta$ ^{schwach/int} charakterisiert wurden (140-142). Darüber hinaus fällt auf, dass es durch den Einfluss von TCDD nicht nur zu einem Anstieg des relativen Anteils an DN-TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen kam, sondern dass auch die Frequenz von DN-TZR $\gamma\delta$ -NK1.1⁺-Zellen, bei denen es sich entweder um NK-Zellen oder TZR $\alpha\beta$ -NKT-Zellen handeln könnte, unter diesen Bedingungen bei Thymozyten und Emigranten zunahm.

NK- und auch NKT-Zellen besitzen eine Reihe phänotypischer Charakteristika, die es erlauben, sie z.B. von konventionellen T-Zellen zu unterscheiden. Neben der Tatsache, dass sie größer und granulärer als T-Zellen sind, lassen sie sich auch

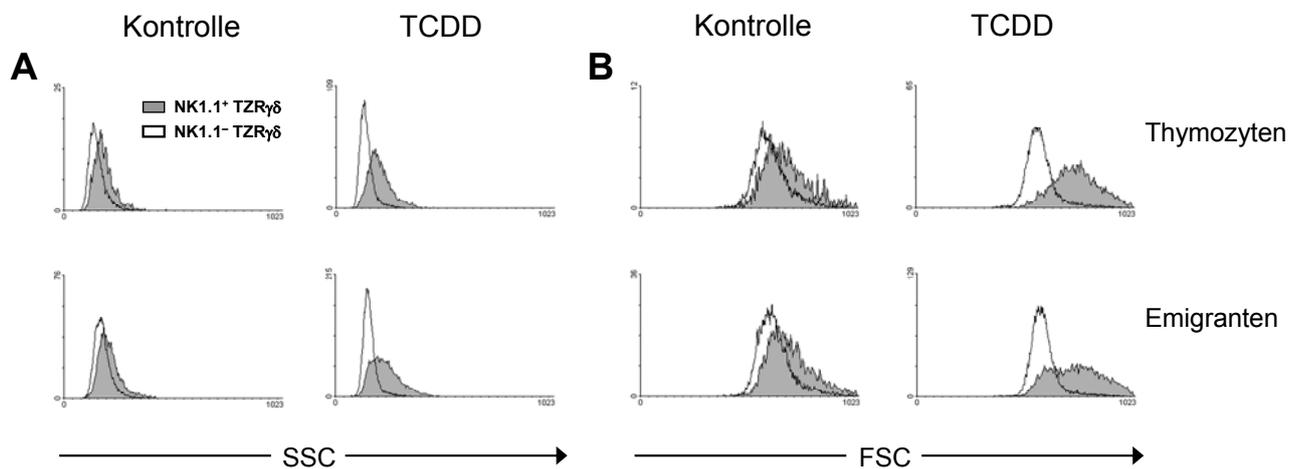


Abb. 7: Granularität und Größe von fötalen DN-NK1.1⁺/NK1.1⁻-TZR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 12 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert und mit anti-CD4-, CD8-, TZR $\gamma\delta$ - und NK.1.1-Ak gefärbt. DN-NK1.1⁺- bzw. DN-NK1.1⁻-TZR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich (A) ihrer Granularität (SSC) und (B) ihrer Größe (FSC) untersucht. Die Daten zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes, das insgesamt dreimal durchgeführt wurde.

durch ihre konstitutive Expression verschiedener Oberflächenmarker identifizieren, die von T-Zellen entweder überhaupt nicht (z.B. 2B4, CD16/32) oder nur im aktivierten Zustand (z.B. CD69, CD122) exprimiert werden. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, zeigten die aus den TCDD-behandelten FTOCs isolierten DN-TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen im Durchschnitt eine deutlich schwächere NK1.1-Expression als die entsprechenden Zellen aus den Kontrollkulturen. Da es nicht auszuschließen ist, dass es sich bei den unter TCDD-Einfluss entstandenen DN-TZR $\gamma\delta$ -NKT-Zellen

möglicherweise nur um konventionelle $\text{TZR}\gamma\delta$ -Zellen handelt, bei denen TCDD die Expression von NK1.1 induziert hat, wurden weitere durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, um Hinweise auf die Identität dieser Zellen zu erlangen. Abb. 7 zeigt eine Untersuchung der Parameter Größe und Granularität von an Tag 12 der FTOC isolierten $\text{DN-TZR}\gamma\delta^+\text{-NK1.1}^+$ - bzw. $\text{TZR}\gamma\delta^+\text{-NK1.1}^-$ -Thymozyten und Emigranten, die anhand ihrer Streuung des Lichtes bestimmt wurden. Betrachtet man die Kontroll-Kulturen, zeigt sich, dass die $\text{DN-TZR}\gamma\delta^+\text{-NK1.1}^+$ -Zellen im Durchschnitt etwas größer und granulärer waren als $\text{DN-TZR}\gamma\delta^+\text{-NK1.1}^-$ -Zellen, was sowohl für die

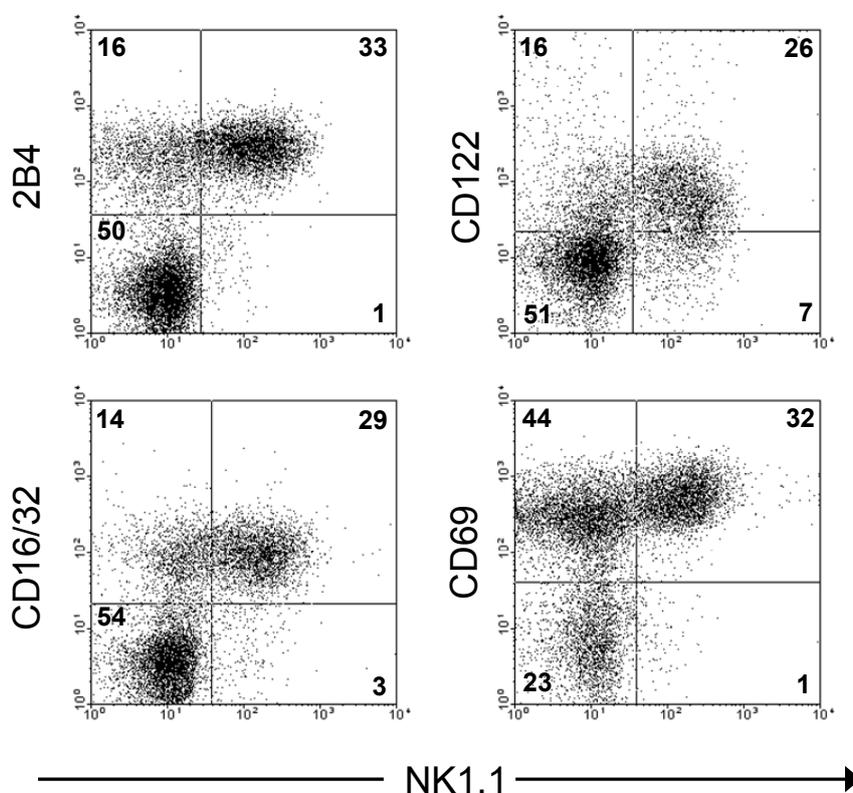


Abb. 8: Ko-Expression von NK-Zell-Markern auf fötalen DN-NK1.1^+ -Thymozyten. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD inkubiert. Nach 12 Tagen wurden die Thymozyten mit anti-CD4-, CD8-, NK1.1-Ak in Kombination mit anti-2B4-, CD122-, CD16/32- oder CD69-Ak gefärbt, und die DN-Thymozyten wurden bezüglich ihrer Expression von NK1.1 und den dargestellten Markern analysiert. Die Zahlen geben die relativen Anteile in Prozent wider. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Thymozyten als auch für die Emigranten galt. Das gleiche Bild bot sich auch bei den entsprechenden Zellen aus den TCDD-FTOCs, mit dem Unterschied, dass hier die $\text{DN-TZR}\gamma\delta^+\text{-NK1.1}^+$ -Zellen deutlich größer und granulärer als ihre NK1.1^- -Pendants und die NKT-Zellen aus den Kontroll-Kulturen waren. Diese Ergebnisse unter-

scheiden sich nicht von denen, die für Tag 6 und 9 der FTOC erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). Zusätzliche Hinweise, die die Vermutung unterstützen, dass es sich bei den unter TCDD-Einfluss generierten DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen um „echte“ NKT-Zellen handelt, wurden aus weiteren phänotypischen Untersuchungen gewonnen. Wie in Abb. 8 am Beispiel von an Tag 12 der TCDD-FTOC isolierten DN-Thymozyten gezeigt ist, exprimierten praktisch alle DN-NK1.1 $^+$ -Zellen die charakteristischen NK-Marker 2B4, CD16/32 und CD69 und ein Großteil von ihnen war ebenfalls CD122 $^+$. Bedenkt man zum einen, dass der ETO der DN-Zellen unter TCDD-Einfluss erhöht ist und zum anderen, dass gleichzeitig der Anteil an DN-TZR $\gamma\delta^+$ - bzw. TZR $\gamma\delta^+$ -NKT Zellen zunimmt, so zeigen diese Daten, dass die Exposition fötaler Thymi mit TCDD zu einer präferentiellen Emigration DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NKT-Zellen führt.

3.3 TCDD induziert einen CD44^{stark}CD25^{int}-Phänotyp in DN-TZR $\gamma\delta^+$ - und TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten und Emigranten

Laiosa und Mitarbeiter konnten in einer aktuellen Studie zeigen, dass TCDD die Proliferation von unreifen DN-Thymozyten verringert, ein Mechanismus, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Thymusatrophie spielt (90). Über mögliche Konsequenzen dieser gestörten Proliferation für die Emigration, insbesondere die von TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen, ist jedoch noch nichts bekannt.

Um den Differenzierungs- und Reifegrad der DN-Zellen in der FTOC zu analysieren, wurden fötale Thymozyten und Emigranten nach 6-tägiger Kultivierung mit oder ohne TCDD isoliert. Mit Hilfe magnetischer Depletion wurden DN-Zellen bis auf eine Reinheit von 99% angereichert und mit anti-TZR $\gamma\delta^-$, CD25- und CD44-Ak gefärbt. Dies erlaubt es, das CD44/CD25-Expressionsmuster von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen und den überwiegend unreifen TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen, die die T-Zell-Vorläufer enthalten, zu untersuchen. Wie in Abb. 9A gezeigt ist, ergab sich für die TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten aus den Kontroll-FTOCs die in zahlreichen Veröffentlichungen beschriebene Verteilung von DN1- bis DN4-Zellen, wobei die große Mehrheit der Zellen dem DN2- und DN3-Stadium (41 bzw. 37%) zugerechnet werden konnte. Neben den bekannten Stadien existierte auch eine kleine Population von Zellen (5,8%), die eine intermediäre Expression von CD25 und eine starke CD44-Expression zeigten (CD44^{stark}CD25^{int}), womit sie sich deutlich von den ebenfalls CD44 $^+$ CD25 $^+$ -DN2-Zellen unterschieden.

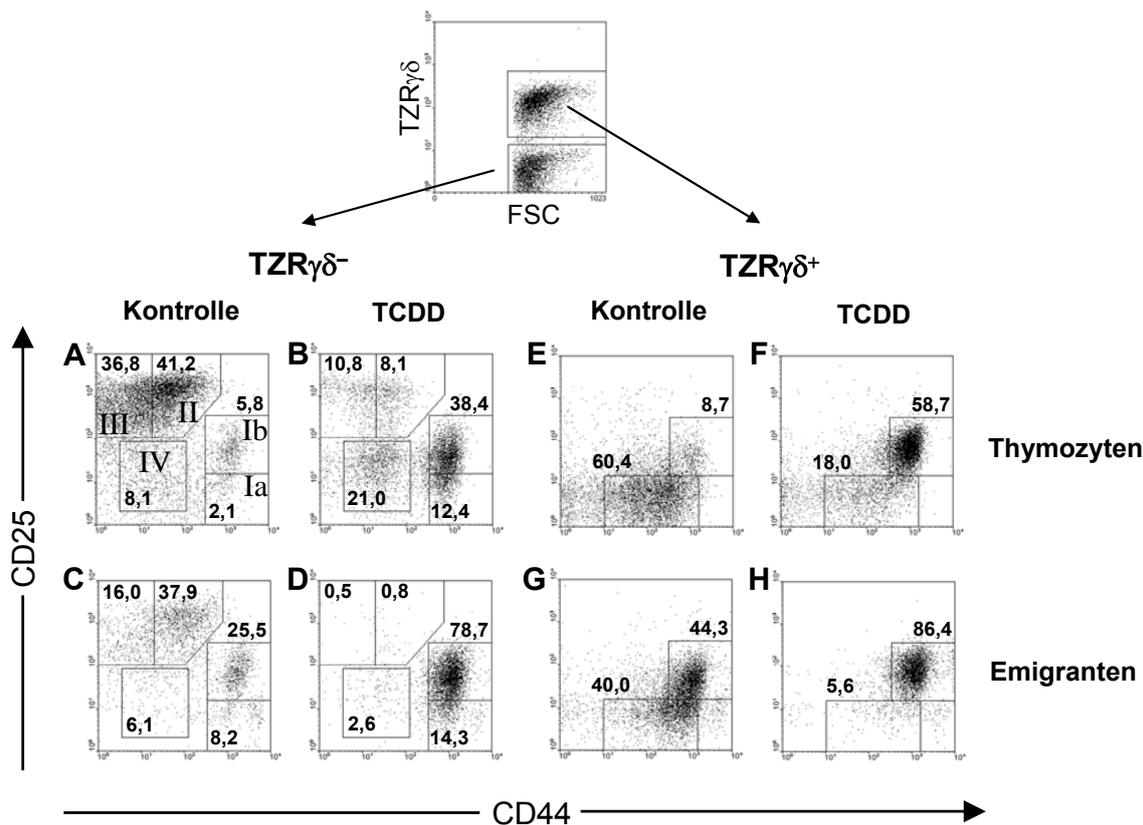


Abb. 9: Überaktivierung des AhR in der FTOC führt zur Anreicherung DN-CD44^{stark}CD25^{int} TZR $\gamma\delta^+$ - und TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen im Thymus und erleichtert ihre Emigration. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert und DN-Zellen wurden durch magnetische Depletion CD4/CD8-exprimierender Zellen angereichert (~99%). Die DN-Zellen wurden mit anti-CD25-, CD44- und TZR $\gamma\delta$ -Ak gefärbt und die CD25/CD44-Expression der DN-TZR $\gamma\delta^+$ - bzw. TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen wurde analysiert. Die Zahlen geben die relativen Anteile in Prozent wieder. Die Daten zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes, das insgesamt dreimal durchgeführt wurde.

Diese Zellpopulation wird im weiteren Textverlauf als „DN1b“ bezeichnet. Unter Einfluss von TCDD war der Anteil der DN1b-Zellen unter den TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten deutlich erhöht (38%), wohingegen die reiferen DN2- (8,1%) und DN3-Zellen (10,8%) erniedrigt waren, was auch bei den absoluten Zahlen zum Ausdruck kam (jeweils ca. 2×10^4 Zellen/TL in Kontroll-TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten vs. $1,5 \times 10^3$ Zellen/TL in TCDD-behandelten TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten; siehe Abb. 10). Diese Daten lassen vermuten, dass TCDD in der FTOC die Entwicklung unreifer DN-T-Zell-Vorläufer über das DN1b-Stadium hinaus partiell blockiert.

Wie aus Abschnitt 3.2 (insbesondere Abb. 6) hervorgeht, scheint diese Entwicklungsblockade jedoch keinen inhibitorischen Einfluss auf die Generierung von TZR $\gamma\delta^+$ - und

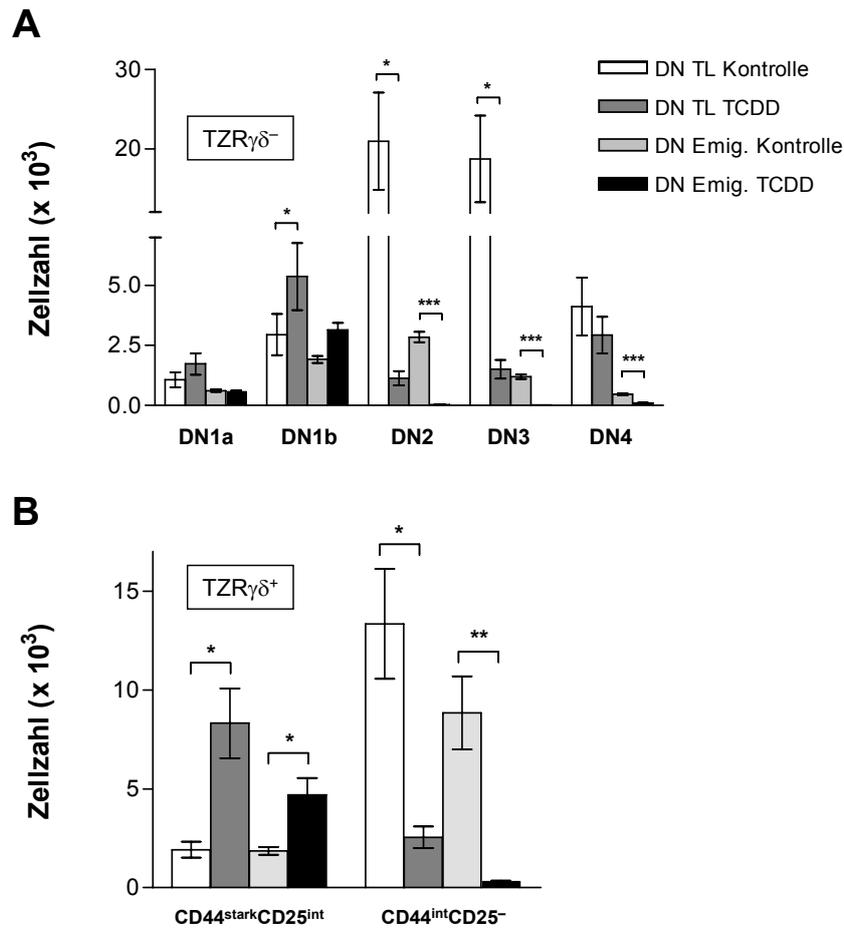


Abb. 10: Absolute Zahlen der fötalen CD25/CD44-exprimierenden Subpopulationen unter den DN-TZR $\gamma\delta^-$ - und TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, gezählt und DN-Zellen wurden durch magnetische Depletion CD4/CD8-exprimierender Zellen angereichert. Die DN-Zellen wurden mit anti-CD25-, CD44- und TZR $\gamma\delta^-$ -Ak gefärbt und die CD25/CD44-Expression der DN-TZR $\gamma\delta^-$ - bzw. TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen wurde analysiert. Mit Hilfe der relativen Anteile wurden die absoluten Zahlen der verschiedenen CD25/CD44-exprimierenden DN-TZR $\gamma\delta^-$ - (A) und TZR $\gamma\delta^+$ -Subpopulationen (B) berechnet. Die Ergebnisse repräsentieren die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

NK(T)-Zellen auszuüben, da diese Zellen im fötalen Thymus von TCDD-behandelten FTOCs speziell an Tag 9 und 12 im Vergleich zu den Kontrollen überproportional repräsentiert waren. Dagegen fällt auf, dass der Anteil an TZR $\gamma\delta^-$ NK1.1⁻-Zellen unter den DN-Thymozyten, also der Population, die die unreifen T-Zell-Vorläufer enthält, in Gegenwart von TCDD dramatisch abnahm, was sich auch bezüglich der absoluten Zahlen äußerte (Abb. 11A). Während sich z.B. an Tag 9 der FTOC in einem Kontroll-Thymuslappen durchschnittlich $2,5 \times 10^4$ DN-TZR $\gamma\delta^-$ NK1.1⁻-Zellen befanden, so

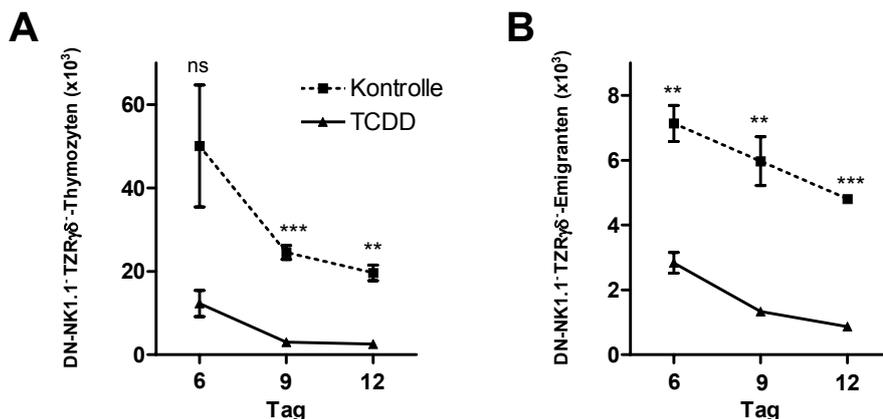


Abb. 11: TCDD reduziert die Zahl der undifferenzierten DN-NK1.1⁻TZRγδ⁻-T-Vorläuferzellen in der FTOC. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6, 9 oder 12 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, gezählt und mit anti-CD4-, CD8-, TZRγδ- und NK.1.1-Ak gefärbt. Anschließend wurden anhand der relativen Anteile die absoluten Zahlen der DN-NK1.1⁻TZRγδ⁻-Thymozyten (A) und Emigranten (B) bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

enthielt ein TCDD-behandelter Thymuslappen zum selben Zeitpunkt nur ca. 3×10^3 dieser Zellen.

Bei den DN-TZRγδ⁻-Emigranten aus den Kontroll-Kulturen war der Anteil an DN1b-Zellen deutlich erhöht (25,5%) gegenüber den DN-TZRγδ⁻-Thymozyten. Die Mehrheit der Zellen war bei den Emigranten dem DN2-Stadium zuzuordnen (38%). Dagegen gehörten fast 79% der DN-TZRγδ⁻-Emigranten aus den TCDD-behandelten FTOCs zum DN1b-Stadium und nur DN1a Zellen waren hier noch in nennenswerter Menge anzutreffen (14,3%), während die reiferen DN2- und DN3-Zellen praktisch nicht vorhanden waren. Auch in absoluten Zahlen war die Emigration von DN1b-TZRγδ⁻-Zellen in der Gegenwart von TCDD signifikant erhöht (Abb. 10A). Im Gegensatz zu den DN-TZRγδ⁻-Zellen war die Mehrheit der fötalen TZRγδ⁺-Thymozyten (60%) in Übereinstimmung mit der Literatur CD25⁻CD44^{int} (143,144). Dennoch besaßen auch bei diesen Zellen 8,7% den DN1b-Phänotyp. Infolge der TCDD-Exposition kam es zu einem signifikanten Anstieg der DN1b-TZRγδ⁺-Thymozyten (von 2×10^3 Zellen/TL auf 5×10^3 Zellen/TL, Abb. 9F und 10B), die fast 60% aller DN-TZRγδ⁺-Thymozyten ausmachten. Verglichen mit den Thymozyten war der DN1b-Phänotyp dagegen bei den TZRγδ⁺-Emigranten deutlich häufiger vorhanden. Während bei den DN-TZRγδ⁺-Emigranten aus den Kontroll-Kulturen ca. 44% CD44^{stark}CD25^{int} waren, hatten unter

TCDD-Einfluss fast alle Zellen (86%) diesen Phänotyp. Diese Daten deuten darauf hin, dass der DN1b-Phänotyp eng mit dem Potential DN-Zellen verknüpft ist, aus dem Thymus emigrieren zu können.

Für die Entwicklung und Differenzierung von DN-Thymozyten ist die Signaltransduktion über CD117 (c-kit) und die „common γ chain“ von großer Bedeutung (145). C-kit wird besonders stark von den unreifsten DN1- und DN2-Thymozyten exprimiert; parallel zur Herabregulation von CD44 im weiteren Verlauf der T-Zell-Entwicklung schwindet auch die Expression von c-kit (10). Um weitere Hinweise über den Differenzierungsstatus der DN-Zellen zu erhalten, wurden DN-TZR $\gamma\delta^-$ - bzw. TZR $\gamma\delta^+$ -Thymozyten und Emigranten nach 6-tägiger FTOC in der Gegenwart von TCDD oder Lösungsmittel bezüglich ihrer c-kit-Expression analysiert. Wie aus Abb. 12 hervorgeht, zeigte ein deutlich erhöhter Anteil der TCDD-exponierten DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten eine starke c-kit-Expression im Vergleich mit den entsprechenden Zellen aus den Kontroll-FTOCs, was die Theorie einer TCDD-induzierten Entwicklungsblockade in einem unreifen Stadium (DN1, DN2) stützt. DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Emigranten

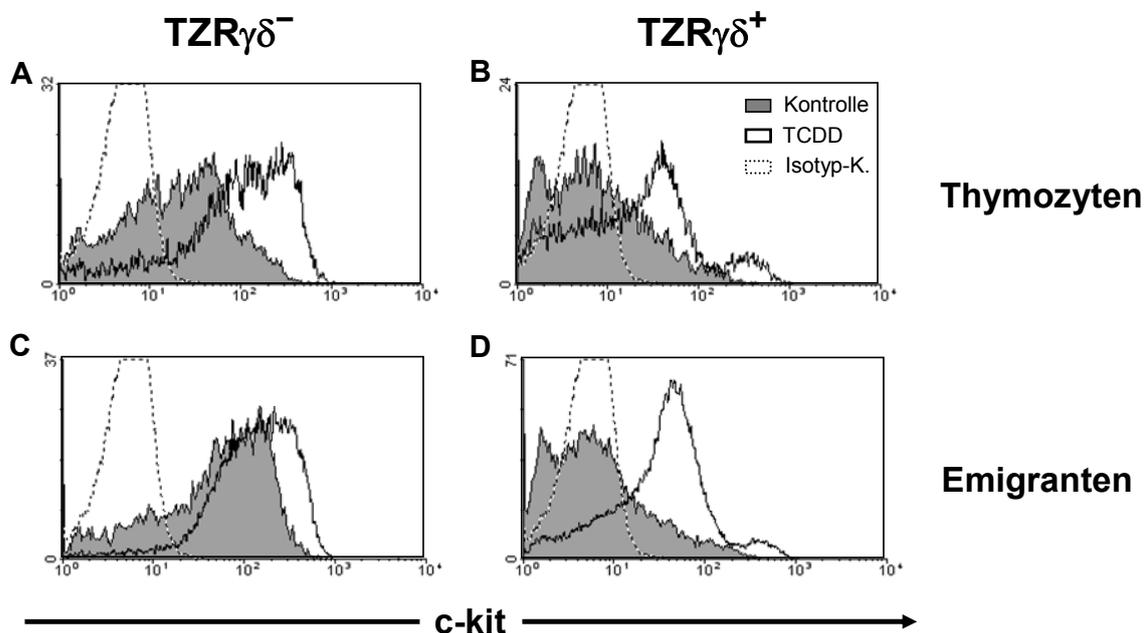


Abb. 12: c-kit-Expression der fötalen DN-TZR $\gamma\delta^+$ und TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen. Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6 Tagen wurden Thymozyten und Emigranten isoliert, mit anti-CD4-, CD8-, TZR $\gamma\delta^-$ - und c-kit-Ak gefärbt und die DN-TZR $\gamma\delta^+$ - bzw. TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen wurden bezüglich ihrer c-kit-Expression untersucht. Die Daten zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes, das insgesamt dreimal durchgeführt wurde.

zeigten verglichen mit den Thymozyten eine verstärkte c-kit-Expression, wodurch wiederum das Emigrationspotential dieser unreifen Zellen verdeutlicht wird.

Das Expressionsmuster von c-kit auf $\text{TZR}\gamma\delta^+$ -Zellen ist äußerst heterogen. Laky und Mitarbeiter konnten zeigen, dass nur ein kleiner Teil dieser Zellen im Thymus in neugeborenen Mäusen c-kit exprimiert. Dagegen sind intraepitheliale $\text{TZR}\gamma\delta^+$ -Lymphozyten im Darm c-kit⁺, während dieser Marker von $\text{TZR}\gamma\delta^+$ -Zellen in der Milz nicht exprimiert wird (146). Nach 6-tägiger FTOC waren die meisten DN- $\text{TZR}\gamma\delta^+$ -Thymozyten und Emigranten aus den Kontroll-Kulturen c-kit⁻ (Abb. 12). Unter dem Einfluss von TCDD zeigte jedoch der Großteil dieser Zellen eine intermediäre c-kit-Expression, aber nur ein kleiner Prozentsatz erreichte die starke Expression, die für die DN- $\text{TZR}\gamma\delta^-$ -Zellen gefunden wurde. Die c-kit-Expression von DN- $\text{TZR}\gamma\delta^+$ -Zellen unter dem Einfluss von TCDD könnte darauf hindeuten, dass diese Zellen *in vivo* möglicherweise als intestinale epitheliale Lymphozyten (IEL) den Darm besiedeln.

CD44 und CD25 werden jedoch nicht nur von unreifen DN-Thymozyten, sondern auch von reifen aktivierten T-Zellen exprimiert, weshalb man diese Moleküle auch zu den Aktivierungsmarkern zählt. Um zu überprüfen, ob TCDD auch die Expression anderer Aktivierungsmarker auf DN- $\text{TZR}\gamma\delta^-$ - und $\text{TZR}\gamma\delta^+$ -Zellen beeinflusst, wurden Thymozyten und Emigranten nach 6 Tagen FTOC isoliert, mit anti-CD4-, CD8-, $\text{TZR}\gamma\delta^-$ in Kombination mit CD69-, CD24- (HSA), CD45RB- oder CD62L(L-Selektin)-Ak gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Infolge der Aktivierung bzw. Reifung kommt es zur Heraufregulation von CD69 und zur Herabregulation von CD24, CD45RB und CD62L. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, besaßen die DN- $\text{TZR}\gamma\delta^-$ -

Tab. 3: TCDD induziert einen aktivierten Phänotyp in DN-Thymozyten und Emigranten.^a

Aktivierungs- marker	DN TL Kontrolle		DN TL TCDD		DN Emig. Kontrolle		DN Emig. TCDD	
	$\text{TZR}\gamma\delta^+$	$\text{TZR}\gamma\delta^-$	$\text{TZR}\gamma\delta^+$	$\text{TZR}\gamma\delta^-$	$\text{TZR}\gamma\delta^+$	$\text{TZR}\gamma\delta^-$	$\text{TZR}\gamma\delta^+$	$\text{TZR}\gamma\delta^-$
CD69	30	19	66	37	33	15	81	59
CD24	46	89	4	27	17	63	0	4
CD45RB ^{stark}	4	0.4	6	5	3	8	7	14
CD45RB ^{schwach}	28	84	6	22	18	68	4	28
CD62L	38	77	3	25	25	62	13	6

^a Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach 6 Tagen wurden Emigranten und Thymozyten isoliert und mit anti-CD4-, CD8-, $\text{TZR}\gamma\delta^-$ und dem jeweils angegebenen Ak gefärbt. Die Zahlen geben die prozentualen Anteile der DN- $\text{TZR}\gamma\delta^+$ - bzw. $\text{TZR}\gamma\delta^-$ -Thymozyten und Emigranten wider, die den jeweiligen Marker exprimieren. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Thymozyten aus den Kontroll-Kulturen den erwarteten unreifen Phänotyp, der durch die Expression von CD24, CD45RB und CD62L aber nur wenigen CD69⁺-Zellen charakterisiert ist. Dieses Expressionsmuster war in abgemilderter Form auch bei den DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Emigranten wieder zu finden. Dagegen zeigten die DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Thymozyten eine deutliche Verschiebung zu einem aktivierten Phänotyp, der bei den Emigranten ebenfalls noch stärker ausgeprägt war. Unter dem Einfluss von TCDD wird dieser aktivierte Phänotyp auch auf den unreifen DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten induziert. Besonders gut lässt sich dieses Phänomen anhand von CD24 verfolgen, einem Marker für unreife DN-Thymozyten (147). Während 89% der DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten aus den unbelasteten FTOCs CD24 exprimierten, so traf dies nur für 27% aus den TCDD-FTOCs zu. Darüber hinaus waren nur 4% der TCDD-behandelten DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Emigranten CD24⁺, dagegen aber 63% der entsprechenden Kontroll-Zellen.

Zusammengefasst lassen diese Daten vermuten, dass TCDD die Differenzierung fötaler DN-Thymozyten nach dem DN1b-Stadium zumindest partiell blockiert und außerdem in diesen Zellen einen aktivierten Phänotyp induziert. Dieser aktivierte DN1b-Phänotyp scheint den entsprechenden Zellen ein hohes Emigrations-Potential zu verleihen. Gleichzeitig induziert TCDD im Thymus eine dramatische Reduktion der DN-TZR $\gamma\delta^-$ NK1.1⁻-Zellen, die vor allem die unreifen T-Zell-Vorläufer enthalten.

3.4 Emigrierte DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen besitzen suppressive Eigenschaften *in vitro*

Eine der wichtigsten immuntoxischen Eigenschaften von TCDD ist die Suppression von zellulären und humoralen Immunantworten, wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch weitestgehend unbekannt ist. Da verschiedene DN-Zell-Populationen bekannt sind, die regulatorische Fähigkeiten haben und somit Immunantworten unterdrücken können (148,149), sollte mit Hilfe von Proliferations-tests mit aktivierten CD4⁺-T-Zellen überprüft werden, ob die in der FTOC emigrierenden DN-Zellen ebenfalls suppressive Eigenschaften haben und somit vielleicht an der TCDD-induzierten Immunsuppression beteiligt sein könnten. Hierzu wurden DN-Emigranten nach 6 Tagen aus TCDD-behandelten und unbelasteten FTOCs isoliert und zusammen mit syngen APZs und CD4⁺-T-Zellen, denen eine zentrale Rolle bei der Induktion von zellulär- als auch humoral-vermittelten

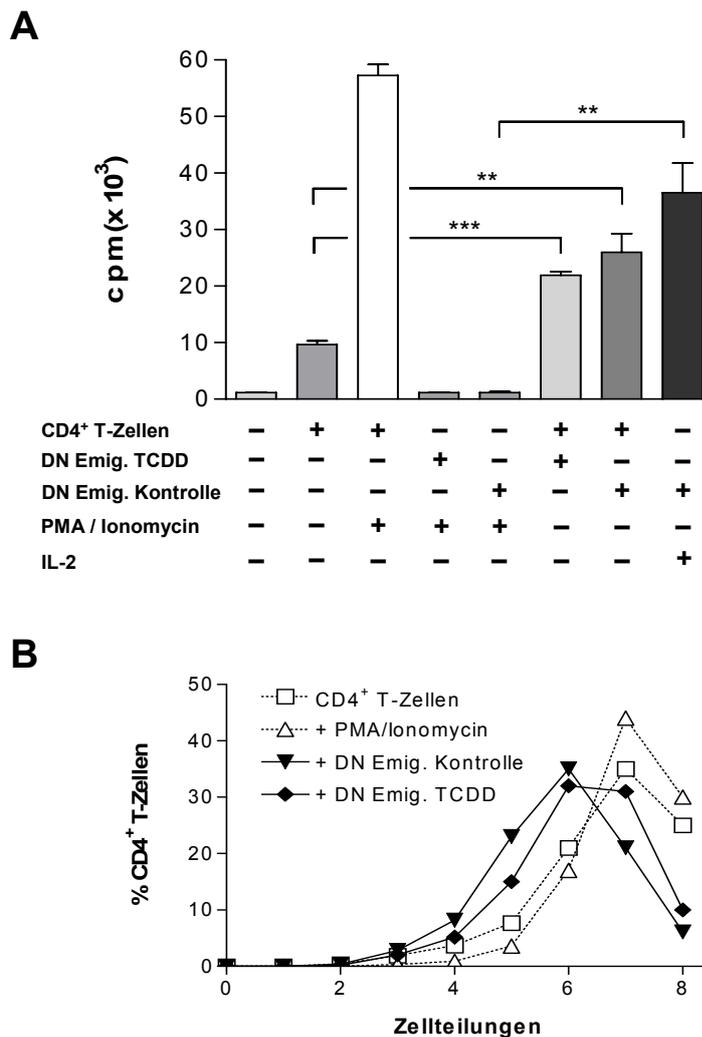


Abb. 13: Proliferation DN-Emigranten in Ko-Kultur mit CD4⁺-T-Zellen. DN-Emigranten wurden nach 6-tägiger FTOC mit oder ohne 10 nM TCDD isoliert und aufgereinigt. Die Zellen wurden für 90 h mit syngenem CD4⁺-T-Zellen in Anwesenheit von APZs und anti-CD3-Ak [1 µg/ml] inkubiert. Für manche Ansätze wurde den Kulturen PMA [10 ng/ml]/Ionomycin [0,5 µg/ml] bzw. IL-2 [2 ng/ml] beifügt. (A) Die Inkorporation von ³H-Thymidin ist dargestellt als Maß für die Proliferation der Zellen. Das ³H-Thymidin wurde den Kulturen für die letzten 20 h der Inkubationszeit beifügt. (B) Die CD4⁺-T-Zellen wurden vor der Ko-Kultivierung mit den DN-Emigranten mit CFSE gefärbt. Die Abbildung zeigt den Anteil der CD4⁺-T-Zellen, die innerhalb der Inkubationszeit eine definierte Anzahl an Mitosen durchgeführt hat. Die Daten zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes, das insgesamt dreimal durchgeführt wurde. Für jeden Ansatz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Immunantworten zukommt, in Gegenwart von anti-CD3 ϵ -Ak für 90 h inkubiert. Zusätzlich wurden manche Ansätze mit PMA/Ionomycin bzw. rekombinantem IL-2 behandelt. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen – je nach Experiment – entweder anhand des Einbaus von ³H-Thymidin oder mit Hilfe von CFSE gemessen.

DN-Emigranten – gleichgültig, ob aus TCDD- oder Kontroll-FTOCs stammend – waren im Gegensatz zu CD4⁺-T-Zellen nicht in der Lage, in Ko-Kultur mit APZs/anti-CD3_ε-Ak bzw. in Gegenwart von PMA/Ionomycin zu proliferieren (Abb. 13A). Wurden die DN-Emigranten dagegen zusätzlich zu APZs/anti-CD3_ε-Ak mit CD4⁺-T-Zellen ko-kultiviert, so kam es anstelle eines suppressiven Effektes zu einem unerwarteten Anstieg der Gesamtproliferation. Dabei spielte es keine Rolle, ob die DN-Emigranten aus TCDD-behandelten oder unbelasteten FTOCs stammten. Obwohl die DN-Emigranten – wie schon erwähnt – zusammen mit APZs/anti-CD3_ε-Ak und PMA/Ionomycin keinerlei Wachstum zeigten, führte die Zugabe von IL-2, einem Zytokin, das für die Proliferation von T-Zellen essentiell ist und auch von diesen im aktivierten Zustand produziert wird, zu einer starken Proliferation, die sogar noch das Ausmaß der Ko-Kultur der DN-Emigranten mit den CD4⁺-T-Zellen übertraf. Diese Daten ließen jedoch keine eindeutige Aussage darüber zu, ob CD4⁺-T-Zellen oder DN-Emigranten für die gesteigerte Proliferation in der Ko-Kultur verantwortlich waren. Um diese Frage zu klären, wurden CD4⁺-T-Zellen mit CFSE markiert und zusammen mit DN-Emigranten ko-kultiviert. Wie in Abb. 13B gezeigt ist, proliferierten die CD4⁺-T-Zellen in der Abwesenheit von DN-Emigranten extensiv, und die Mehrheit der Zellen hatte nach 90 h bereits 7 oder 8 Teilungen durchgeführt. Die Gegenwart von DN-Emigranten – erneut gleichgültig, ob aus TCDD- oder Kontroll-FTOCs stammend – bewirkte eine Reduktion der proliferativen Kapazität, so dass sich die CD4⁺-T-Zellen meist ein bis zweimal seltener teilten als zuvor. Da DN-Emigranten also das Wachstum von CD4⁺-T-Zellen *in vitro* einschränkten, aber die Gesamtproliferation von CD4⁺-T-Zellen gemeinsam mit DN-Emigranten deutlich stärker war als bei CD4⁺-T-Zellen alleine, deuten diese Ergebnisse in indirekter Weise darauf hin, dass die DN-Emigranten sich in Gegenwart von CD4⁺-T-Zellen stark teilen und dadurch die gesteigerte Gesamtproliferation verursachen. Um dies experimentell zu bestätigen, wurden DN-Emigranten mit CFSE markiert und mit CD4⁺-T-Zellen für 90 h ko-kultiviert. Wie in Abb. 14A dargestellt ist, zeigten die DN-Emigranten unter den gegebenen Bedingungen eine sehr starke Teilungsaktivität. Das Proliferationsverhalten unterschied sich deutlich von dem der CD4⁺-T-Zellen, bei denen die Anzahl der im untersuchten Zeitraum durchgeführten Mitosen zwischen 4 und 9 schwankte, wobei sich die meisten Zellen 6-8-mal geteilt hatten (Abb. 14B). Dagegen war das Teilungsmuster der DN-Emigranten wesentlich einheitlicher und die meisten dieser

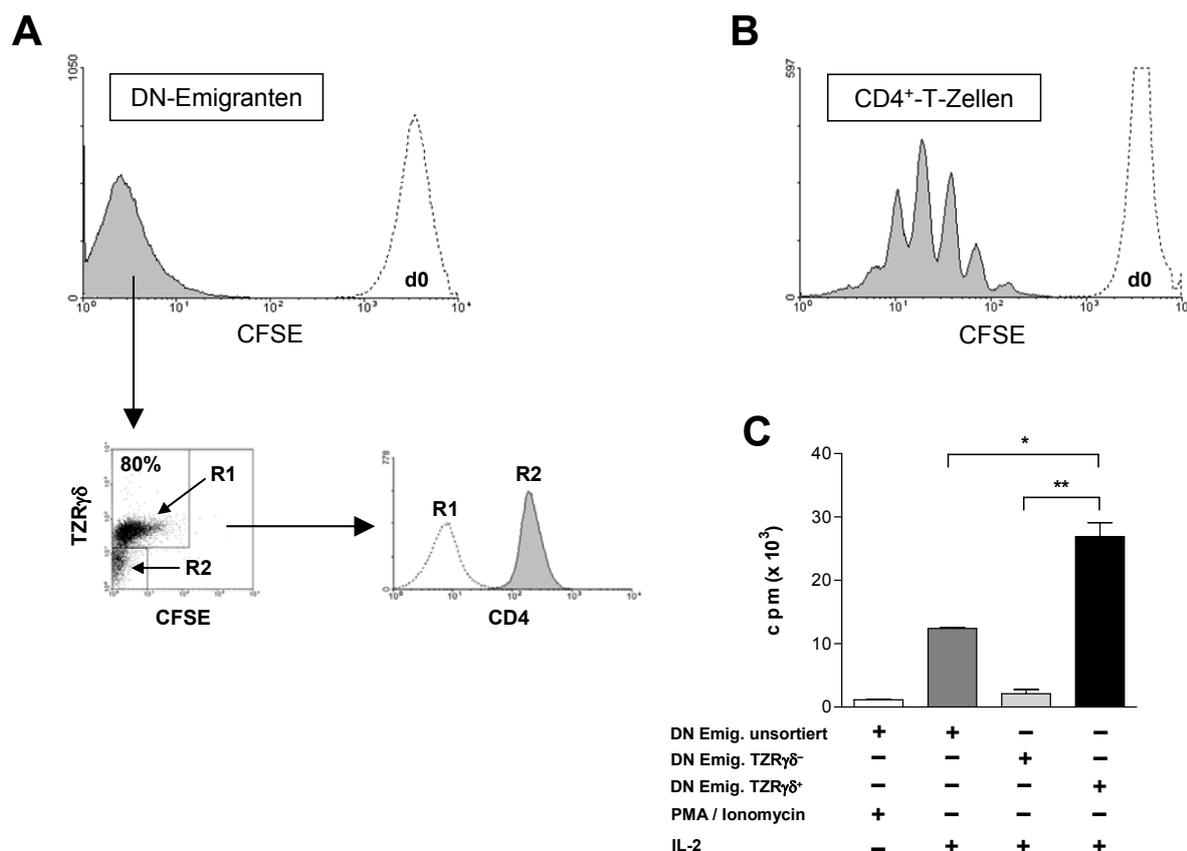


Abb. 14: Proliferation DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten in Gegenwart von IL-2. DN-Emigranten wurden nach 6-tägiger FTOC in Gegenwart von Lösungsmittel isoliert und aufgereinigt. (A) Die Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für 90 h mit syngen CD4 $^+$ -T-Zellen in Anwesenheit von APZs und anti-CD3-Ak [1 μ g/ml] inkubiert. Die Abbildung zeigt das typische CFSE-Muster der lebenden Zellen nach Ablauf der 90 h Inkubationsdauer. Die lebendigen Zellen wurden zusätzlich bezüglich ihrer TZR $\gamma\delta^-$ - und CD4-Expression untersucht. (B) Zum Vergleich ist das typische CFSE-Muster von gefärbten CD4 $^+$ -T-Zellen gezeigt. (C) Ausgehend von sortierten DN-Emigranten wurden TZR $\gamma\delta^-$ - und TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen aufgereinigt und in Anwesenheit von APZs, anti-CD3-Ak und IL-2 [2 ng/ml] bzw. PMA [10 ng/ml]/Ionomycin [0,5 μ g/ml] kultiviert. Die Inkorporation von 3 H-Thymidin ist dargestellt als Maß für die Proliferation der Zellen. Das 3 H-Thymidin wurde den Kulturen für die letzten 20 h der Inkubationszeit beigefügt. Für jeden Ansatz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Daten zeigen jeweils die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes, das insgesamt dreimal durchgeführt wurde.

Zellen hatten sich in der gleichen Zeit schätzungsweise bereits 10- oder 11-mal geteilt.

Wie schon bereits mehrfach erwähnt wurde, handelt es sich bei den DN-Emigranten um eine heterogene Population, die in TZR $\gamma\delta^-$ - und TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen unterteilt werden können. Aus den bisher vorliegenden Daten ist nicht ersichtlich, ob beide Subpopulationen das gleiche Proliferationspotential haben, oder ob dies möglicher-

weise auf einen der beiden Zelltypen beschränkt ist. Analysiert man die in Abb. 14A dargestellten lebenden Zellen nach 90 h Inkubation bezüglich der TZR $\gamma\delta$ -Expression und CFSE-Fluoreszenz, so zeigt sich, dass 80% von ihnen TZR $\gamma\delta^+$ waren. Da die ko-kultivierten CD4⁺-T-Zellen ausschließlich TZR $\alpha\beta^+$ sind, kann es sich bei den TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen nur um die DN-Emigranten handeln. Die verbleibenden 20% TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen zeigten keinerlei CFSE-Fluoreszenz und unterschieden sich nicht von ungefärbten Zellen (Daten nicht gezeigt). Wie aus Abb. 14A ersichtlich wird, handelte es sich bei diesen Zellen um die mit den DN-Emigranten ko-kultivierten überlebenden CD4⁺-T-Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass nur die TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen unter den DN-Emigranten die Kapazität haben, sich unter den vorhandenen Voraussetzungen zu teilen. Um diese Annahme zu belegen, wurden DN-Emigranten in TZR $\gamma\delta^+$ - und TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen separiert und in Gegenwart von APZs/anti-CD3 ϵ -Ak und IL-2 kultiviert. Die Ergebnisse dieses Experimentes verdeutlichen, dass nur TZR $\gamma\delta^+$ - aber nicht TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen in der Lage waren, unter den gegebenen Bedingungen zu proliferieren (Abb. 14C).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass fötale DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten in Gegenwart von aktivierten CD4⁺-T-Zellen oder exogenem IL-2 stark proliferieren und dabei gleichzeitig das Wachstum der CD4⁺-T-Zellen einschränken. Diese Effekte sind unabhängig von TCDD, da sowohl DN-Emigranten aus Kontroll-Kulturen als auch aus TCDD-belasteten FTOCs diese Eigenschaften besitzen.

3.5 TCDD beeinflusst das Genexpressionsprofil von fötalen DN-Emigranten

Der AhR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Gene aus unterschiedlichen funktionellen Gruppen regulieren kann. Ob die Expression von Genen, die potentiell durch den AhR beeinflusst werden können, in einer bestimmten Zelle tatsächlich durch den aktivierten AhR reguliert wird, hängt sowohl vom Zelltyp als auch von dessen Differenzierungsstatus ab (118).

Um zu untersuchen, inwieweit TCDD bzw. der aktivierte AhR das Genexpressionsprofil von fötalen DN-Emigranten beeinflusst, wurden diese Zellen nach sechstägiger FTOC in Gegenwart von TCDD oder Lösungsmittel isoliert und aufgereinigt. Die RNA der DN-Emigranten wurde extrahiert, amplifiziert und das Transkriptom unter Verwendung der Affymetrix-Microarray-Technik analysiert.

Ausgehend von der Voraussetzung, dass ein betrachtetes Gen differentiell exprimiert ist, wenn sich seine Expression in beiden Experimenten im Vergleich von TCDD- und Lösungsmittel-behandelten DN-Emigranten mindestens um den Faktor 2,5 unterscheidet, konnten 118 verschiedene Transkripte (von insgesamt 22.500 Transkripten auf dem Genchip) mit modulierter Expression identifiziert werden. Diese Transkripte (bzw. die daraus abgeleiteten Proteine) lassen sich in zahlreichen unterschiedlichen funktionellen Gruppen kategorisieren und erfüllen beispielsweise Aufgaben im Metabolismus, bei der Regulation des Zellzyklus, Transkription/Translation, Zelladhäsion/Zell-Zell-Interaktion, intrazellulärer Signaltransduktion oder sind an der Formierung des Zytoskeletts beteiligt. Auch eine Reihe von Genen, deren Expression für Zellen des Immunsystems von Bedeutung ist, gehört zu den differentiell exprimierten Transkripten, darunter CD-Marker für Lymphozyten, Komponenten des TZR-Rekombinations-Apparates, Zytokine sowie weitere lösliche Faktoren. Eine Auswahl der 118 regulierten Gene ist in Tab. 4 gezeigt.

Besonders bemerkenswert war die durchschnittlich 75-fache, 53-fache bzw. 31-fache Herabregulation des „Rekombinations-aktivierenden Gen 1 (RAG-1)“, der „Terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT)“ sowie von c-myc in den TCDD-exponierten fötalen DN-Emigranten. Die Transkription dieser drei Gene war in Gegenwart von TCDD vollkommen unterbunden. Sowohl RAG-1 als auch TdT spielen eine entscheidende Rolle für die Rekombination der TZR-Gensegmente in unreifen DN-Thymozyten. Auch c-myc kommt eine wichtige Funktion bei der T-Zell-Entwicklung zu, weil dieses Gen/Protein zum einen die weitere Differenzierung von DN-CD44^{schwach}CD25⁻-Thymozyten steuert und zum anderen die Proliferation unreifer Thymozyten nach erfolgter β -Selektion reguliert (150,151). Da die Rekombination des TZR α -Genlocus erst nach der des TZR β -Genlocus abgeschlossen ist (28), exprimieren die unreifen T-Zell-Vorläufer, die sich zu TZR $\alpha\beta$ -Zellen entwickeln, zunächst ab dem DN2-Stadium neben der β -Kette des TZR die sogenannte prä-TZR α -Kette (pT α ; 152). In TCDD-behandelten DN-Emigranten war die Expression von pT α um den Faktor 3,4 reduziert. Auffällig ist zudem die 3,5-fach stärkere Expression des Komplement-Rezeptors C1qR1 (AA4.1) in TCDD-exponierten DN-Emigranten, einem Gen, das von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (153-155). In diesem Zusammenhang ist auch die TCDD-induzierte 8,5-fache Herabregulation von Sox-4, einem Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung von Thymozyten erleichtert (156) sowie die 5-fache Herabregulation

Tab. 4: Veränderung der Genexpression in TCDD-exponierten fötalen DN-Emigranten.^a

Funktion	Gen-Name	x-fache Expressionsänderung	
		Exp.1	Exp.2
Immunsystem	CD24 (HSA)	-11,5	-9,3
	CD26 (Dipeptidylpeptidase 4)	-4,6	-5,9
	CD28	-3,0	-2,8
	CD117 (c-kit)	3,8	2,8
	CD160	2,6	2,9
	C1qR1 (AA4.1)	3,8	3,1
	c-myb ^b	-25,0	-36,6
	Gfi1	-2,6	-7,8
	Killer cell lectin like receptor B1B	2,6	3,7
	pT α (prä-TZR α -Kette)	-3,8	-4,9
	RAG-1 ^b	-66,7	-83,3
	SOCS 2 (suppressor of cytokine signaling 2)	2,9	3,9
	Sox-4	-11,7	-5,3
	TdT (Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase) ^b	-24,2	-82,0
	Granzym A	-9,5	-6,7
IFN- γ	-6,7	-3,7	
IL-22	8,8	9,9	
Platelet factor 4	4,4	28,5	
Zytoskelett	Adseverin	2,7	4,1
	Actinin α 2	3,8	3,1
	CapG	2,6	7,5
Zellzyklus-Kontrolle	Cdc6 (cell division cycle 6)	-3,7	-3,2
	Cyclin B1	-3,7	-3,4
	Cyclin E2	-4,1	-3,2
	Krüppel-like factor 4	2,5	2,9
AhR-Genbatterie ^c	AhR-Repressor	14,3	13,4
	CYP1A1	2,9	4,4
	CYP1B1	4,3	18,7
„Housekeeping-Gene“	HPRT	0	0
	RPS6	0	0

^a Fötale Thymuslappen wurden mit 10 nM TCDD oder Lösungsmittel inkubiert. Nach sechs Tagen wurden die Emigranten isoliert und die DN-Zellen wurden durch magnetische Depletion von CD4- und CD8-exprimierenden Zellen aufgereinigt. Die RNA der DN-Emigranten wurde isoliert und entsprechend den Angaben unter Abschnitt 2.7 aufgearbeitet. Das Genexpressionsprofil der fötalen DN-Emigranten wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Affymetrix-Microarray-Technik analysiert.

^b Gene wurden in TCDD-behandelten DN-Emigranten nicht exprimiert.

^c Zu der AhR-Genbatterie zählt man Gene des Fremdstoffmetabolismus, die bekanntermaßen vom AhR reguliert werden.

der Expression des transkriptionellen Repressors Gfi1, der in Proliferation und Differenzierung unreifer c-kit⁺-DN-Thymozyten involviert ist (157), erwähnenswert. Eine TCDD-induzierte Störung der Proliferation, einem Prozess, der eng mit der Differenzierung der DN-Thymozyten verknüpft ist, lässt sich darüber hinaus basierend auf der Tatsache, dass auch eine Reihe von Genen, die an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt sind, in den TCDD-exponierten DN-Emigranten differentiell exprimiert werden (Cdc6, Cyclin B1, Cyclin E2, Krüppel-like factor 4), vermuten. All diese Daten deuten ebenso wie die bei den phänotypischen Untersuchungen der DN-Zellen gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass TCDD die fötale T-Zell-Entwicklung zu einem sehr frühen Zeitpunkt blockiert und dass unreife DN-Zellen den fötalen Thymus verlassen. Dabei bestätigen die Ergebnisse der Genexpressions-

analyse darüber hinaus die auch bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen auf Proteinebene nachgewiesene Herab- bzw. Heraufregulation der T-Zell-Reifemarker CD24 und c-kit (vergleiche Abb. 12 und Tab. 3). Auch die Zunahme an NK(T)-Zellen unter TCDD-behandelten DN-Emigranten (siehe Abschnitt 3.2) spiegelt sich bei der Analyse des Transkriptoms dieser Zellen wider, da sie eine verstärkte Expression der NK(T)-Zell-assoziierten Marker CD160 (2,8-fache Heraufregulation) und „Killer cell lectin like receptor B1B (3,2-fache Heraufregulation)“ zeigen.

Unter den in fötalen DN-Emigranten differentiell exprimierten Transkripten befand sich auch eine Reihe von Genen, die schon in früheren Studien an anderen Zelltypen bzw. Geweben als TCDD-sensitiv identifiziert werden konnte. Neben der für eine TCDD-Exposition als charakteristisch zu bezeichnenden Induktion der dem Fremdstoffmetabolismus zugehörigen Gene CYP1A1 (3,6-fach) und CYPB1 (11,5-fach) konnte auch eine deutliche Heraufregulation der Expression des AhR-Repressors (13,9-fach) in den DN-Emigranten nachgewiesen werden. Der AhR-Repressor ist durch Konkurrenz mit dem AhR um den Bindungspartner ARNT in der Lage, die AhR-vermittelte Signaltransduktion zu unterbinden und stellt deshalb ein wichtiges Element zur Regulation der AhR-Aktivität dar (158). Außerdem wurde in den fötalen DN-Emigranten – wie schon zuvor von Boverhof et al. an B-Zelllinien gezeigt (159) – die verstärkte Expression von „suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS 2)“ durch TCDD-Exposition induziert (3,4-fach), einem Gen/Protein, das paradoxerweise zu seinem Namen und der Funktion anderer Mitglieder derselben Genfamilie die IL-2- bzw. IL-3-vermittelte Signaltransduktion beschleunigen kann (160). Ein weiteres Gen, das in TCDD-behandelten fötalen DN-Emigranten vermehrt exprimiert wird, ist Adseverin (3,4-fach). Svensson et al. konnten zeigen, dass TCDD eine verstärkte Expression von Adseverin in lymphatischen Geweben wie Thymus und Milz bewirkt (161). Durch seine Fähigkeit, an Actin-Filamente zu binden und abzubauen kommt diesem Molekül eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts zu (162). Neben Adseverin konnten außerdem Actinin α 2 (3,5-fache Heraufregulation) und CapG (5-fache Heraufregulation) als differentiell exprimierte Gene in TCDD-behandelten fötalen DN-Emigranten identifiziert werden, die ebenfalls Komponenten des Zytoskeletts sind.

Zwei der Gene, deren Expression in fötalen DN-Emigranten unter dem Einfluss von TCDD besonders stark induziert wurde, waren die löslichen Effektormoleküle IL-22 (9,4-fach) und Platelet factor 4 (16,5-fach). IL-22 ist ein Zytokin, welches in der Lage

ist, Komponenten des nicht-adaptiven Immunsystems in Geweben wie Haut sowie Atmungs- und Verdauungstrakt zu aktivieren (163), während Platelet factor 4 ein für gewöhnlich von Thrombozyten sezerniertes Chemokin ist, das u.a. die Überlebensfähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen steigert und außerdem Proliferation und Zytokin-Freisetzung von aktivierten humanen T-Zellen blockieren kann (164,165).

Die Validität der mit Hilfe der Microarray-gestützten Genexpressionsanalyse erhaltenen Ergebnisse wurde für eine Auswahl von Genen (CD24, Gfi1, IL-22, RAG-1, TdT, CYP1A1, HPRT, RPS6) durch quantitative PCR zumindest tendenziell bestätigt (Daten nicht gezeigt). Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Transkriptomts fötaler DN-Emigranten konnte in einer von M. Frericks durchgeführten Transkriptionsfaktoranalyse darüber hinaus gezeigt werden, dass nur rund 50% der in diesen Zellen differentiell exprimierten Gene ein DRE in ihrem Promotor haben und deren Expression deshalb direkt durch den AhR moduliert werden kann. Dieser Befund lässt auf die zusätzliche Bedeutung sekundärer Regulationsmechanismen schließen.

3.6 TCDD führt *in vivo* nicht zu einer verstärkten Generierung von DN-TZR $\gamma\delta^+$ - oder DN1b-Zellen im Thymus

Die bisher aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass TCDD *in vitro* eine präferentielle Emigration von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -(NKT)-Zellen mit einem CD44^{stark}CD25^{int}-Phänotyp bewirkt, die die Proliferation syngener CD4⁺-T-Zellen einschränken können. Um zu untersuchen, ob und inwieweit diese *in vitro* generierten Daten auch *in vivo* von Relevanz sein könnten, wurden trächtige Mäuse an Tag 15 der Schwangerschaft mit einer TCDD-Dosis von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht injiziert. Fünf bis sechs Tage später wurden Thymus, Milz und Blut der neugeborenen Mäuse isoliert und bezüglich des Gehaltes an DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen analysiert. Wie in Abb. 15 gezeigt ist, waren 27% der DN-Thymozyten aus Kontroll-Mäusen TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen. Dieser Anteil war in den TCDD-exponierten Mäusen – entgegengesetzt zu den FTOC-Daten – auf 16% reduziert. Unter den CD4⁻CD8⁻-Lymphozyten aus der Milz, die ca. 95% der Gesamt-Lymphozyten ausmachten (Daten nicht gezeigt), waren nur sehr wenige TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen zu detektieren (1,8% in Kontroll-Mäusen vs. 1,0% in TCDD-behandelten

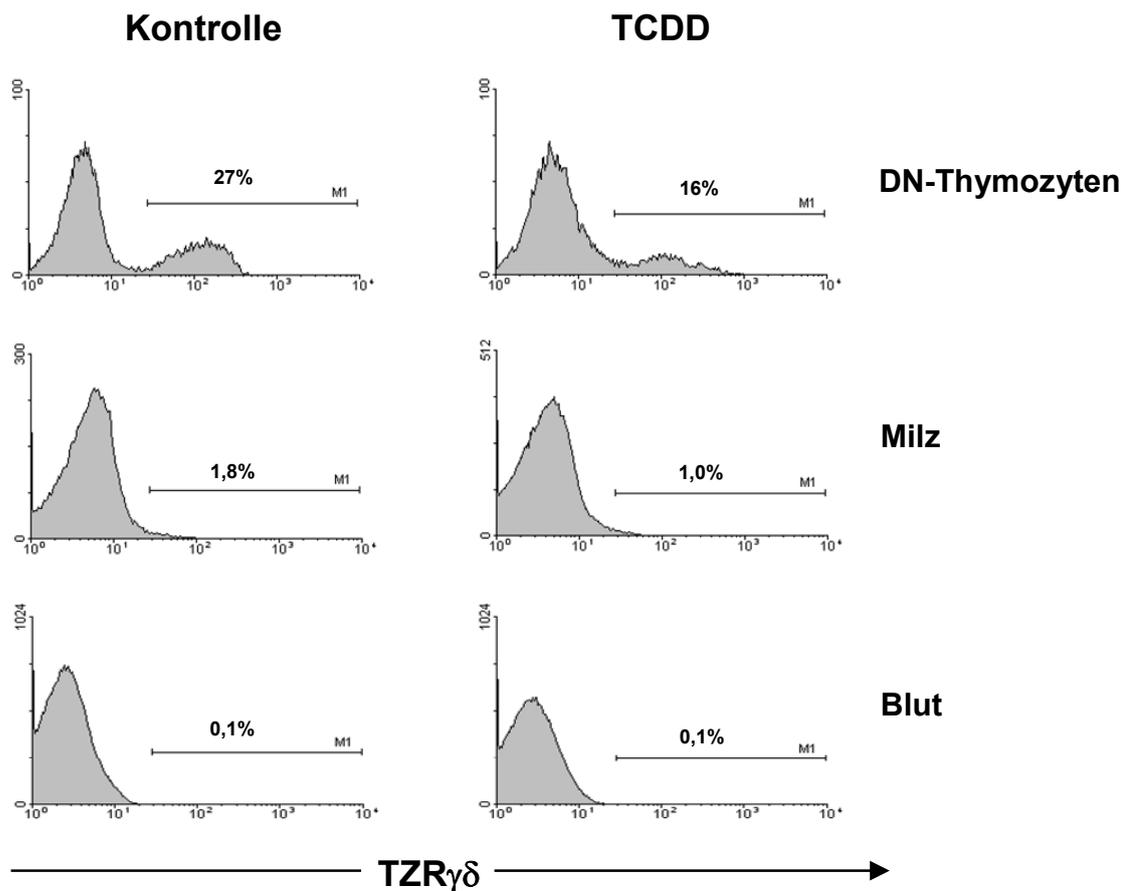


Abb. 15: Anteil DN-TZR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen in Thymus, Milz und Blut neugeborener Mäuse. Trächtige Mäuse wurden am 15. Tag der Schwangerschaft mit 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD oder Lösungsmittel injiziert. Thymus, Milz und Blut der neugeborenen Mäuse wurde entnommen. Aliquots der Zellsuspensionen wurden mit anti-CD4-, CD8- und TZR $\gamma\delta$ -Ak gefärbt und die CD4⁻CD8⁻-Lymphozyten bezüglich ihres Gehalts an TZR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen analysiert. Das Experiment wurde ein weiteres mal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Mäusen). Dagegen waren im Blut der neugeborenen Mäuse – unabhängig davon, ob die Muttertiere zuvor mit TCDD oder Lösungsmittel behandelt worden waren – überhaupt keine DN-TZR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen unter den zirkulierenden Lymphozyten nachzuweisen. Es existierte zwar jeweils eine kleine Population TZR $\gamma\delta$ ⁺-Zellen, diese waren jedoch ausschließlich CD8⁺ und zeigten anteilmäßig keine nennenswerten TCDD-induzierten Unterschiede (ca. 0,4-0,5% aller Lymphozyten; Daten nicht gezeigt).

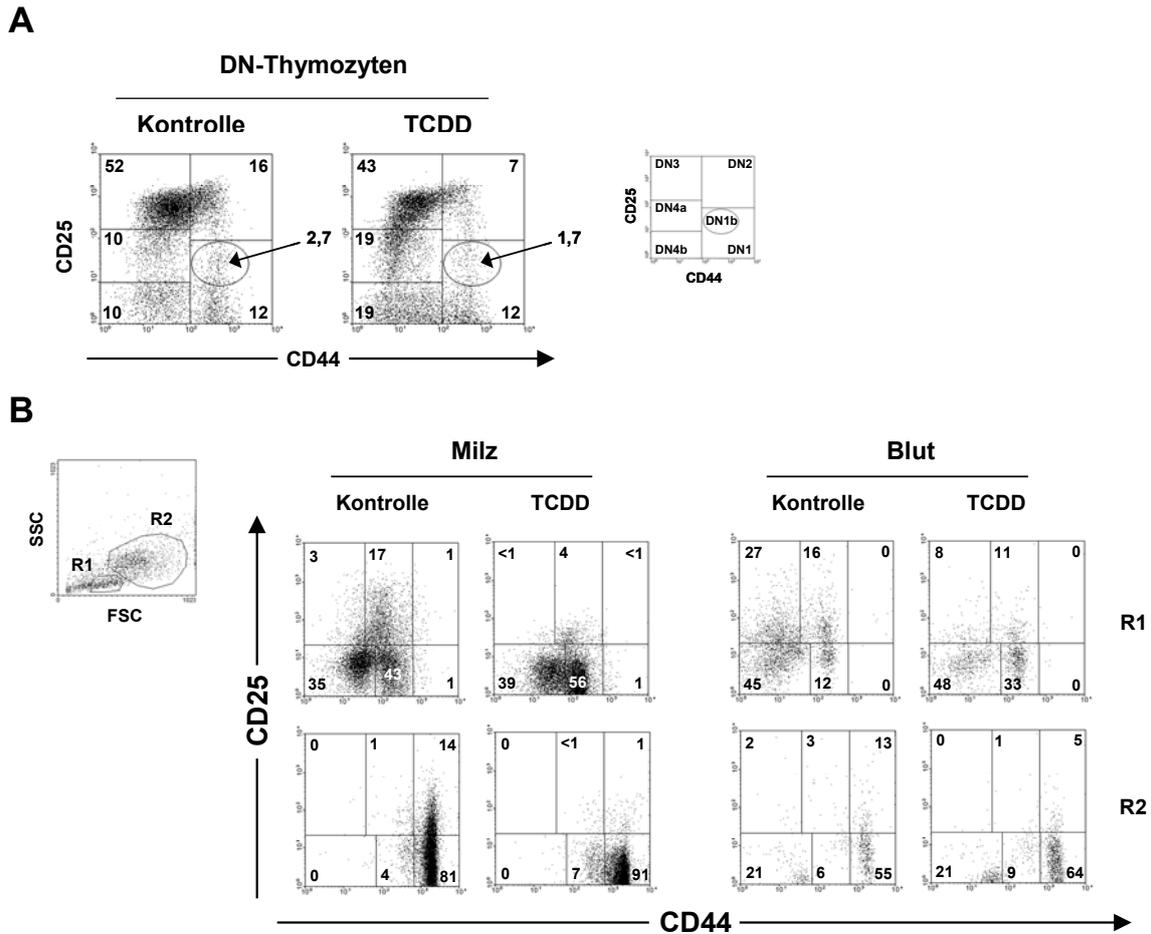


Abb. 16: CD25/CD44-Expression unter DN-Thymozyten, Milz- und Blutzellen in neugeborenen Mäusen. Trächtige Mäuse wurden am 15. Tag der Schwangerschaft mit 5 µg/kg TCDD oder Lösungsmittel injiziert. Thymus, Milz und Blut der neugeborenen Mäuse wurde entnommen. Aliquots der Zellsuspensionen wurden mit anti-CD4-, CD8-, CD25 und CD44-Ak gefärbt und die CD4⁻CD8⁻-Zellen in Thymus (A) bzw. Milz/Blut (B) bezüglich ihres Gehalts an CD25/CD44-exprimierenden Zellen analysiert. Lymphozyten (R1) und die größeren, granulären Zellen (R2; wahrscheinlich vor allem Granulozyten) wurden gemäß dem dargestellten Dotplot getrennt voneinander untersucht. Das Experiment wurde ein weiteres mal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Neben dem Gehalt an TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen wurde außerdem das CD44/CD25-Expressionsmuster der DN-Thymozyten sowie von Milz- und Blutzellen analysiert, um zu überprüfen, ob in TCDD-behandelten Mäusen eine Zunahme von Zellen mit dem DN1b-Phänotyp zu verzeichnen ist. Wie aus Abb. 16A hervorgeht, befand sich der Großteil der DN-Thymozyten von neugeborenen Kontroll-Mäusen im DN3-Stadium (52%), ein Ergebnis, dass somit der Verteilung ähnelte, die bei den DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten in der FTOC (siehe Abb. 9A) gefunden wurde, wo die DN3-Zellen einen Anteil von 37% aufwiesen. Die übrigen Subpopulationen unterschieden

sich nicht sehr stark bezüglich ihrer Frequenzen (DN1: 12%, DN2: 16%), wobei sich die DN4-Zellen – wie schon zuvor von Laiosa et al. beschrieben (90) – in eine DN4a- und DN4b-Population unterteilen ließen, die jeweils einen Anteil von 10% hatte. Eine kleine Population von DN1b-Zellen war unter den DN-Thymozyten ebenfalls zu erkennen, die Frequenz dieser Zellen betrug jedoch nur 2,7%. Die Anteile der verschiedenen CD44/CD25-exprimierenden DN-Subpopulationen im Thymus von TCDD-behandelten Mäusen unterschieden sich hinsichtlich mehrerer Punkte von den Kontroll-Tieren. Während sowohl DN2- als auch DN3-Zellen durch TCDD deutlich reduziert wurden (DN2: 7% vs. 16%; DN3: 43% vs. 52%), kam es zu einer Zunahme von DN4a- und DN4b-Zellen, die jeweils 19% ausmachten (Kontrolle: jeweils 10%). Eine Zunahme von DN1b-Zellen, wie sie bei den DN-Thymozyten und Emigranten in den TCDD-belasteten FTOCs gefunden wurde, konnte jedoch *in vivo* nicht detektiert werden, vielmehr nahm der Anteil dieser Zellen eher ab und betrug nur noch 1,7% aller DN-Thymozyten.

Da die Anteile der DN-Subpopulationen nicht zwangsläufig deren Emigrationspotential widerspiegeln müssen, wurden Milz und Blut von neugeborenen mit TCDD oder Lösungsmittel behandelten Mäusen ebenfalls hinsichtlich ihres Gehaltes an Zellen mit DN1b-Phänotyp untersucht. Die Milzen der neugeborenen Mäuse enthielten neben Lymphozyten vor allem eine Population großer granulärer Zellen (Abb. 16B), die ca. 60% aller lebenden Zellen ausmachten und bei denen es sich zumeist um Granulozyten handeln dürfte. Beide Populationen konnten auch im Blut der Tiere detektiert werden, wenn auch hier der Anteil der Lymphozyten höher war und ca. 60% betrug. Lymphozyten und Granulozyten wurden getrennt voneinander bezüglich ihrer CD44/CD25-Expression untersucht. Unter den Milz-Lymphozyten aus Kontroll-Mäusen befanden sich keinerlei Zellen, die eine starke CD44-Expression zeigten, jedoch gab es in diesen Tieren eine größere CD44^{int-} (43%) bzw. CD44^{int}CD25^{int/stark}-Population (17%). Auch viele Milz-Lymphozyten aus TCDD-behandelten Mäusen waren CD44^{int} (56%), aber nur 4% exprimierten zusätzlich CD25, und dies auch nur in schwachem Ausmaß. Betrachtet man die CD44/CD25-Expression der Milz-Granulozyten in den Kontroll-Mäusen, so zeigt sich, dass in Analogie zu den Literaturangaben praktisch alle diese Zellen eine starke CD44-Expression (ebenso wie TCDD-behandelte Tiere) aufwiesen (166,167) und dass 14% außerdem zusätzlich CD25⁺ waren. Dagegen war diese CD44^{stark}CD25⁺-Granulozyten-Population in TCDD-behandelten Mäusen – ähnlich wie schon zuvor

bei den Milz-Lymphozyten beobachtet – praktisch nicht vorhanden. TCDD unterbindet also in neugeborenen Mäusen die CD25-Expression von Milz-Lymphozyten und Granulozyten *in vivo*. Ein ähnlicher, wenn auch nicht ganz so dramatischer Unterschied fand sich auch bei den Blut-Zellen. Verglichen mit der Milz waren unter den Blut-Lymphozyten deutlich mehr CD25-exprimierende Zellen vorhanden, die in Kontroll-Mäusen außerdem größtenteils CD44⁻ waren (27% CD44⁻CD25⁺; 16% CD44^{int}CD25⁺). Exposition mit TCDD führt zu einer Reduktion des Anteils beider CD25⁺-Populationen (8% CD44⁻CD25⁺; 11% CD44^{int}CD25⁺) unter den Blut-Lymphozyten. Ähnlich wie in der Milz konnten auch unter den Blut-Lymphozyten – unabhängig davon, ob die Muttertiere zuvor mit TCDD oder Lösungsmittel behandelt worden waren – keine Zellen mit starker CD44-Expression detektiert werden. Dagegen waren die meisten Granulozyten im Blut TCDD- und Öl-exponierter Mäuse CD44^{stark} (ca. 70%) und 13% in Kontroll-Mäusen exprimierten gleichzeitig CD25⁺. Auch in diesem Fall reduzierte TCDD den Anteil an CD44^{stark}CD25⁺-Granulozyten auf 5%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Exposition mit TCDD im untersuchten Zeitrahmen unter den angewandten Bedingungen *in vivo* – im Gegensatz zu den in der FTOC detektierten Effekten – weder zu einer vermehrten Entstehung von DN-TZR $\gamma\delta^+$ - noch von DN1b-Zellen im Thymus führt. Auch in Milz und Blut der TCDD-behandelten neugeborenen Mäuse konnten keine erhöhten Anteile von Zellen mit diesem Phänotyp gefunden werden. Dagegen bewirkt TCDD eine Reduktion von CD25-exprimierenden Zellen in der Peripherie, die vor allem in der Milz, aber auch im Blut der Tiere zu erkennen ist.

3.7 ATX kann die TCDD-induzierte Suppression der CHS-Reaktion nicht verhindern

Die unter Abschnitt 3.6 beschriebenen Ergebnisse stellen in Frage, ob die in der FTOC nachgewiesene TCDD-induzierte Entstehung und präferentielle Emigration von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -(NKT)-Zellen *in vivo* und somit für die Entstehung der Immunsuppression von Relevanz ist. Um die Bedeutung des Thymus bzw. der Emigration für die TCDD-vermittelte Immunsuppression zu bewerten, wurden Mäuse im Alter von 5-6 Wochen thymektomiert (ATX) bzw. schein-operiert und mit einer

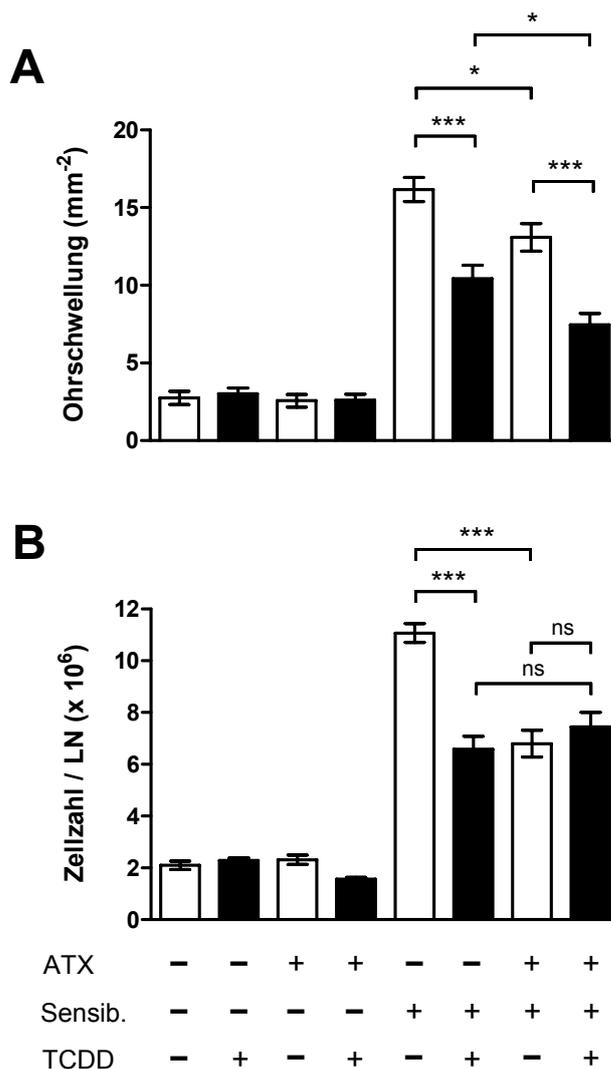


Abb. 17: Effekt von TCDD und ATX auf die CHS-Reaktion. ATX- oder schein-operierte Mäuse wurden mit 10 µg/kg TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von DNFB oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute DNFB-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 24 h danach wurde das Ausmaß der Ohrschwellung (A) und die Zellularität der drainierenden aurikulären LN (B) bestimmt. Abb. A zeigt die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe. Abb. B zeigt die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten für schein-operierte Mäuse und aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten für ATX-Mäuse mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe. Beide aurikulären LN wurden von jeder Maus entnommen, die Zellsuspensionen wurden gepoolt und die durchschnittliche Zellularität individuell für jedes Tier berechnet.

immunsuppressiven Dosis TCDD bzw. Lösungsmittel zur Kontrolle behandelt. Diese Mäuse wurden durch Applikation des Haptens DNFB auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert (Kontroll-Tiere erhielten nur Lösungsmittel), bevor durch erneute DNFB-Applikation auf die Oberfläche der Ohren eine CHS-Reaktion ausgelöst wurde, die anhand der Ohrschwellung 24 h später gemessen wurde.

Wie in Abb. 17A dargestellt ist, war die Hintergrund-Schwellung in allen vier nicht-sensibilisierten Gruppen gering, und es konnten keine Unterschiede zwischen ATX- und euthymischen Mäusen festgestellt werden. Wie erwartet hatte auch TCDD selbst keinen Einfluss auf die Ohrschwellung in diesen Mäusen. Dagegen führte die TCDD-Exposition in euthymischen Mäusen, die zuvor mit DNFB sensibilisiert worden waren, zu einer um ca. 35% reduzierten CHS-Reaktion. Wenn der Thymus in irgendeiner Weise für die TCDD-vermittelte Immunsuppression verantwortlich wäre, so würde man erwarten, dass TCDD in ATX-Mäusen keine Suppression der CHS-Reaktion hervorrufen kann. Dies war jedoch nicht der Fall, wie aus Abb. 17A hervorgeht. TCDD supprimierte auch die Ohrschwellung in ATX-Mäusen in vergleichbarem Ausmaß wie bei euthymischen Mäusen, was darauf hindeutet, dass die TCDD-induzierte Immunsuppression auf Mechanismen beruht, die unabhängig von den toxischen Effekten auf den Thymus sind. Vergleicht man darüber hinaus das Ausmaß der Ohrschwellung zwischen ATX-Mäusen und den entsprechenden euthymischen Tieren, so ist festzustellen, dass ATX selbst zu einer signifikanten Suppression der CHS-Reaktion führte. Dieser Effekt wurde durch Exposition mit TCDD noch zusätzlich verstärkt. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass der Thymus – trotz seiner offenbaren Redundanz bei der Vermittlung der TCDD-vermittelten Immunsuppression – dennoch einen Einfluss auf das Ausmaß der inflammatorischen CHS-Reaktion hat.

Da die Immunantwort gegen das Hapten DNFB, die zur Entzündung und Schwellung der exponierten Hautpartien führt, im drainierenden LN initiiert wird, wurde außerdem die Zellularität der Ohr-drainierenden aurikulären LN als zweitem Parameter für die Untersuchung der TCDD-induzierten Immunsuppression bestimmt. Wie aus Abb. 17B hervorgeht, war die Zellularität in den aurikulären LN von euthymischen DNFB-sensibilisierten und TCDD-injizierten Mäusen im Vergleich mit Öl-behandelten Tieren um 40% reduziert ($6,6 \times 10^6$ vs. $11,1 \times 10^6$ Zellen/LN), ein Ergebnis, dass in etwa das Ausmaß der Suppression bei der Ohrschwellung widerspiegelt. Interessanterweise war in den Öl-behandelten ATX-Mäusen die LN-Zellularität ebenso stark reduziert wie bei den TCDD-exponierten euthymischen Mäusen. Im Gegensatz zur Ohrschwellung konnten die Zellzahlen im aurikulären LN von ATX-Mäusen durch die Gegenwart von TCDD nicht noch stärker reduziert werden, was darauf hindeutet, dass der Parameter „Zellularität des drainierenden LN“ eine geringere Sensitivität als

Bewertungsgrundlage für die TCDD-vermittelte Immunsuppression im Vergleich mit dem Parameter „Ohrschwellung“ hat.

3.8 TCDD supprimiert die Aktivierung von T- und B-Zellen im drainierenden LN während der CHS-Reaktion

Die in Abschnitt 3.7 beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die TCDD-vermittelte Suppression der CHS-Reaktion nicht primär vom Vorhandensein des Thymus abhängig ist. Um den zugrundeliegenden Mechanismus der Immunsuppression detaillierter zu untersuchen, wurde die Verteilung der wichtigsten im LN vorkommenden und an der CHS-Reaktion beteiligten Zellpopulationen – CD4⁺-, CD8⁺- und B-Zellen – 24 h nach Induktion der CHS-Reaktion analysiert. Wie aus Abb. 18A hervorgeht, führte die Exposition mit TCDD in den aurikulären LN von euthymischen Mäusen zu einer signifikanten Reduktion von CD4⁺-Zellen ($1,7 \times 10^6$ vs. $2,8 \times 10^6$ Zellen/LN). Auch CD8⁺- und B-Zellen schienen in diesen Tieren vermindert zu sein, aber die Unterschiede zu den Kontroll-Gruppen erreichten aufgrund der größeren Variabilität der Zellzahlen keine Signifikanz. Ähnlich wie in TCDD-behandelten euthymischen Mäusen beobachtet, besaßen auch ATX-Mäuse deutlich weniger CD4⁺-Zellen im LN ($1,4 \times 10^6$ Zellen/LN). Analog zu den in Abb. 17B gezeigten Ergebnissen für die totale Zellularität im aurikulären LN konnte die Behandlung mit TCDD die Menge der CD4⁺-Zellen in ATX-Mäusen nicht weiter reduzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Entfernung des Thymus den gleichen Effekt wie die Behandlung mit TCDD hat bezogen auf die Reduktion von CD4⁺-Zellen im drainierenden LN während der CHS-Reaktion. Auch CD8⁺- und B-Zellen waren in ATX-Mäusen reduziert, unabhängig davon, ob die Tiere zuvor mit TCDD oder Öl behandelt worden waren, aber auch in diesem Fall waren die Unterschiede im Vergleich mit euthymischen Mäusen nicht signifikant. Erwähnenswert ist außerdem, dass B-Zellen in allen DNFB-sensibilisierten Gruppen mit einem Anteil von etwa 50% die vorherrschende Population in den drainierenden LN waren, trotz der Tatsache, dass die CHS-Reaktion durch antigenspezifische T-Zellen vermittelt wird (168).

Die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen ist von entscheidender Bedeutung für die Induktion der CHS-Reaktion (siehe Ref. 169 für eine Übersicht). Interessanterweise kann TCDD eine T-Zell-vermittelte Immunantwort nur dann supprimieren,

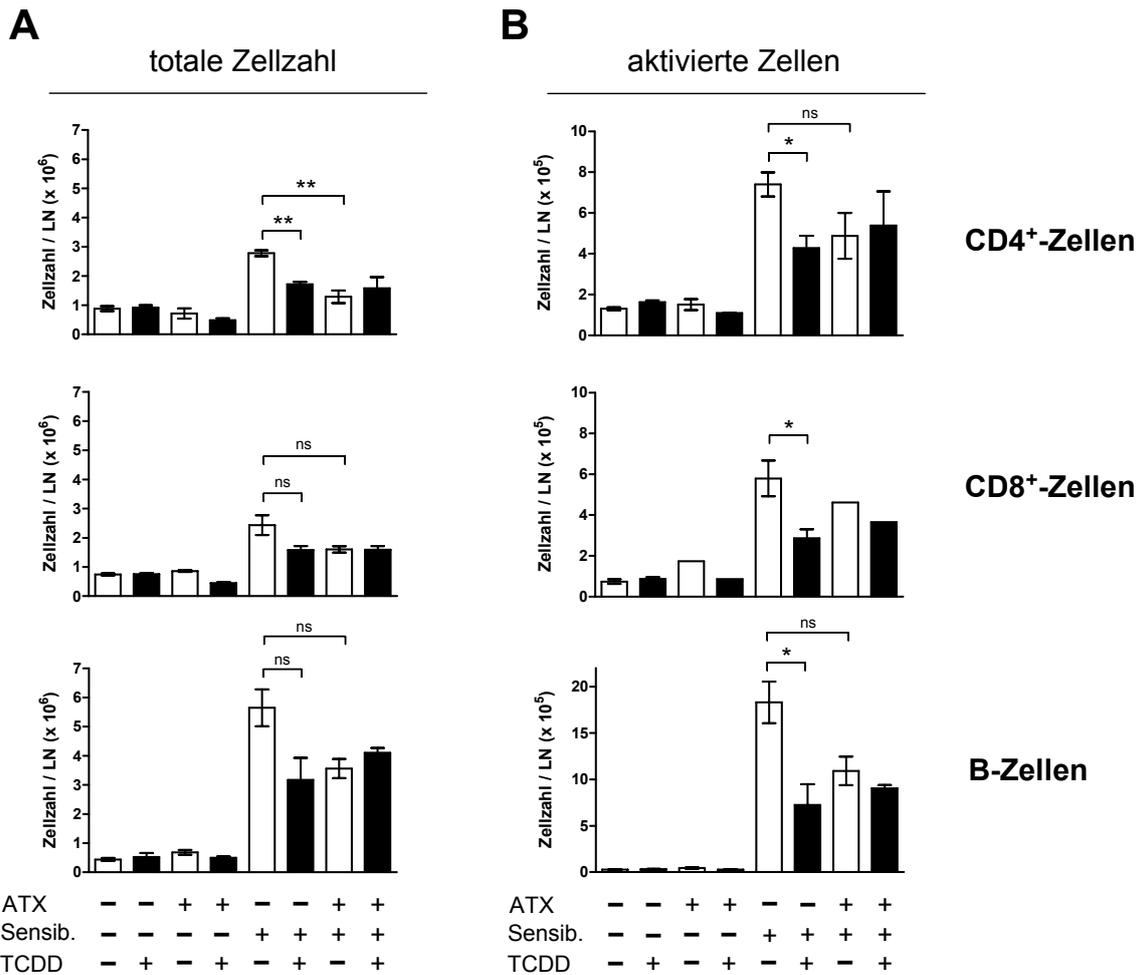


Abb. 18: Effekt von TCDD und ATX auf die Menge an CD4⁺-, CD8⁺- und B-Zellen und deren Aktivierungsstatus im drainierenden LN während der CHS-Reaktion. ATX- oder scheinoperierte Mäuse wurden mit 10 µg/kg TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von DNFB oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute DNFB-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und die durchschnittliche Zellularität pro Maus wurde bestimmt. Die Suspensionen wurden gruppenweise gepoolt und Aliquots wurden mit anti-CD4-, CD8-, CD19- und CD69-Ak gefärbt. (A) Die absoluten Zahlen von CD4⁺-, CD8⁺- und B-Zellen (CD19⁺) pro LN sind dargestellt. (B) Die absoluten Zahlen der aktivierten CD4⁺-, CD8⁺- und B-Zellen (CD69⁺) sind gezeigt. Die Abbildung enthält die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe für die scheinoperierten Mäuse und zwei voneinander unabhängigen Experimenten für die ATX-Mäuse mit Ausnahme der Analyse des Aktivierungsstatus der CD8⁺-Zellen, die nur einmal durchgeführt wurde.

wenn die Exposition zu einem frühen Zeitpunkt während der Induktion dieser Immunantwort erfolgt. Dies führte zu der Vermutung, dass frühe Ereignisse im Rahmen der Aktivierung von T-Helfer-Zellen durch TCDD gestört sein könnten (170). Um den Einfluss von TCDD und ATX auf die Aktivierung von T- und B-Zellen

während der CHS-Reaktion bewerten zu können, wurde die Expression des „frühen Aktivierungs-Antigens“ CD69, einem Marker, der bekanntermaßen von aktivierten T- und B-Zellen und anderen Zelltypen exprimiert wird (171-175), im aurikulären LN analysiert. In euthymischen Mäusen führte TCDD zu einer signifikanten Reduktion aktivierter CD4⁺-, CD8⁺- und B-Zellen (Abb. 18B). Das Ausmaß der Reduktion reichte von 40% für CD4⁺-Zellen bis zu 60% für B-Zellen. Analog zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen war die Menge der aktivierten T- und B-Zellen im LN von ATX-Mäusen nicht signifikant erniedrigt, und die absolute Zahl dieser Zellen konnte auch durch TCDD nicht weiter reduziert werden.

3.9 Die Immigration von Thymusemigranten (RTEs) in den drainierenden LN spielt eine untergeordnete Rolle für die Zunahme der Zellularität während der CHS-Reaktion

Sensibilisierung mit DNFB bewirkte in Öl-behandelten euthymischen Mäusen 24 h nach dem Zweitkontakt mit diesem Antigen eine 6-fache Zunahme der Zellularität im drainierenden aurikulären LN im Vergleich mit nicht sensibilisierten Tieren (Abb. 17B). Dagegen fiel diese Zunahme in TCDD-injizierten euthymischen Mäusen, die einen atrophierten Thymus besitzen und ATX-Mäusen deutlich geringer aus und erreichte nur einen Faktor zwischen 3 und 4. Die Zunahme der Zellularität des drainierenden LN während einer Immunreaktion hängt im wesentlichen von zwei Parametern ab. Zum einen wird sie durch die Proliferation antigenspezifischer Zellen im LN und zum anderen durch den Zustrom von Zellen aus der Peripherie beeinflusst. Um zu klären, ob der scheinbare Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines voll funktionsfähigen Thymus und der starken Zunahme der Zellularität im drainierenden LN während der CHS-Reaktion bei Öl-behandelten euthymischen Mäusen durch eine erhöhte Immigration von RTEs in den LN erklärt werden kann, wurden TCDD- und Öl-injizierte Mäuse mit DNFB sensibilisiert. Nachdem die CHS-Reaktion 5 Tage später durch Applikation von DNFB auf die Ohren initiiert worden war, wurden den Tieren FITC-Lösung in den Thymus injiziert. 24 h später wurden die aurikulären LN bezüglich ihres Gehaltes an RTEs, die als FITC⁺-Zellen zu identifizieren waren, untersucht. Wie erwartet induzierte die verabreichte TCDD-Dosis eine starke Thymus-Atrophie, die die Zellularität der

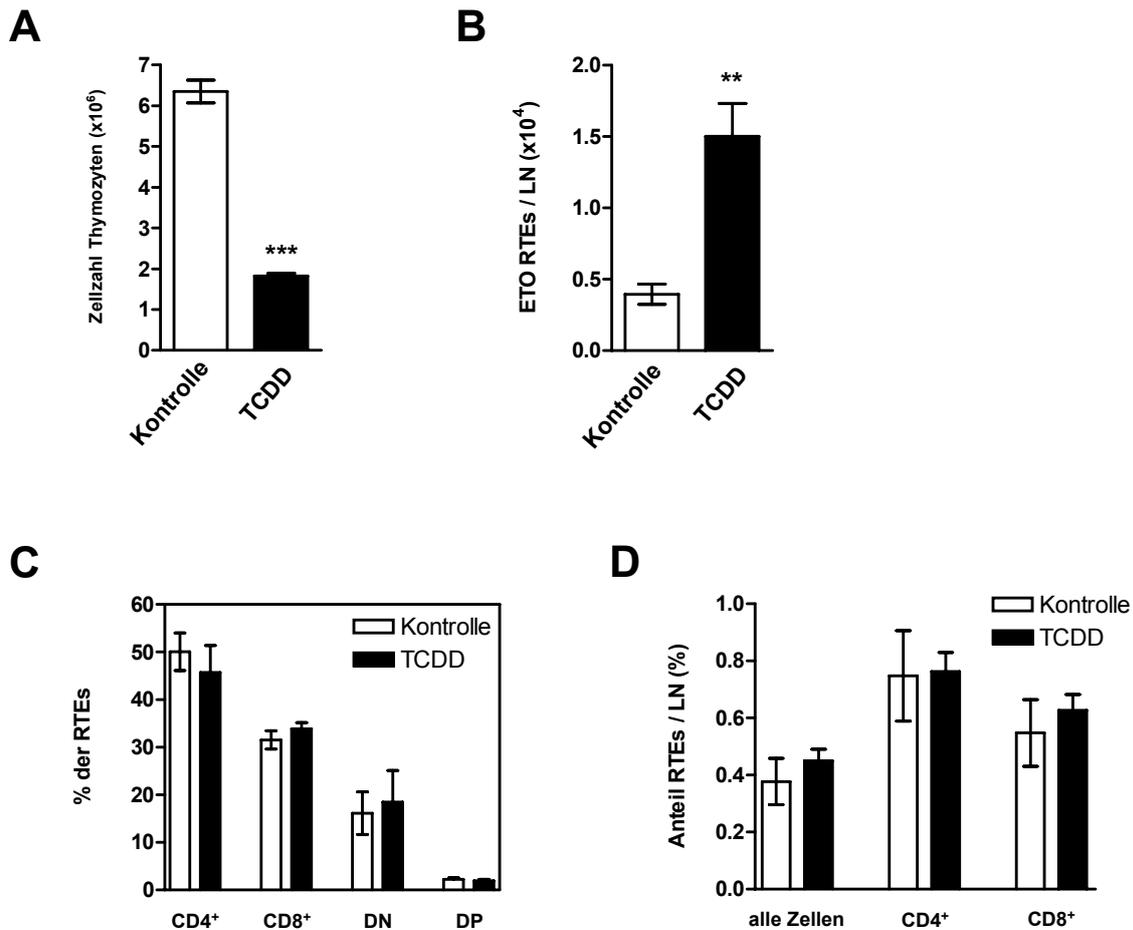


Abb. 19: Die Immigration von RTEs in den drainierenden LN während der CHS-Reaktion wird durch TCDD nicht beeinträchtigt. TCDD- oder Lösungsmittel-injizierte euthymische Mäuse wurden 5 Tage nach der Injektion durch Applikation von DNFB auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Weitere 5 Tage später wurden die Mäuse betäubt, und 10 μ l FITC-Lösung wurden in jeden Thymuslappen injiziert. Kontrollmäuse erhielten nur Lösungsmittel. Nach dem Verschließen der Wunde wurde die CHS-Reaktion durch DNFB-Applikation auf die Oberfläche der Ohren initiiert. 24 h später wurden die aurikulären LN sowie die Thymi entnommen. Nachdem aus den Organen Zellsuspensionen hergestellt worden waren, wurde die Zellularität des Thymus (A) und der LN bestimmt. (B) Basierend auf der durchflusszytometrischen Identifizierung FITC⁺-Zellen in Thymus und LN wurde der ETO bezogen auf 1×10^7 FITC⁺-Thymozyten individuell für jede Maus berechnet. (C) Aliquots der LN-Suspensionen jeder Maus wurden individuell mit anti-CD4- und CD8-Ak gefärbt, und die Frequenzen der CD4/CD8-exprimierenden Subpopulationen unter den Emigranten wurden bestimmt. (D) Bezogen auf die Zellularität des Thymus wurde die absolute Menge an (CD4⁺- bzw. CD8⁺-) RTEs im drainierenden LN berechnet und in Relation zu den dort vorgefundenen absoluten Zahlen an (CD4⁺- bzw. CD8⁺-) Zellen gesetzt. Jede Gruppe bestand aus 4 individuell analysierten Mäusen.

Thymozyten um ca. 70% reduzierte (Abb. 19A). Dagegen war der ETO (absolute Zahl der RTEs/LN normalisiert auf 1×10^7 FITC⁺-Thymozyten) durch TCDD signifikant von $0,5 \times 10^4$ auf $1,5 \times 10^4$ Zellen/LN erhöht (Abb. 19B). 80-90% der im LN detektierten

RTEs waren entweder CD4⁺ oder CD8⁺ und etwa 10-20% hatten den DN-Phänotyp. Bezüglich der Verteilung dieser Subpopulationen waren zwischen TCDD- und Öl-behandelten Mäusen keine Unterschiede zu erkennen (Abb. 19C). Obwohl der ETO in den aurikulären LN durch TCDD erhöht war, war der Beitrag der RTEs zur absoluten Zellularität sowohl in TCDD- als auch Öl-behandelten Mäusen zu vernachlässigen, da ihr Anteil nicht einmal 0,5% aller Zellen bzw. 1% der CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen im drainierenden LN erreichte (Abb. 19D).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Menge der in den drainierenden LN eingewanderten RTEs zu gering ist, um effizient an der starken Zunahme der Zellularität in DNFB-sensibilisierten Mäusen beteiligt sein zu können. Außerdem lassen sich keine Unterschiede zwischen TCDD- und Öl-behandelten Mäusen bezüglich der Anteile der RTEs an der Gesamtzellularität im LN feststellen, so dass der Mechanismus Emigration im untersuchten Zeitraum die reduzierte Zunahme der Zellularität in TCDD-exponierten Mäusen nicht erklären kann.

3.10 TCDD führt zu einer Reduktion dendritischer Zellen (DZs) und induziert in ihnen die Herabregulation von CD80 und CD86 im drainierenden LN während der CHS-Reaktion

Die Behandlung euthymischer Mäuse mit TCDD führte im drainierenden LN während der CHS-Reaktion zu einer Reduktion von aktivierten CD4⁺-, CD8⁺- und B-Zellen. Die CHS-Reaktion wird initiiert durch die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen durch epidermale DZs, die anschließend zum drainierenden LN migrieren, wo sie naive antigenspezifische T-Zellen aktivieren können (176), die als wichtige Mediatoren dieser entzündlichen Reaktion fungieren. Basierend auf diesen Grundlagen und den Erkenntnissen verschiedener Studien, die DZs als Angriffsziel für die toxischen Effekte von TCDD und verwandten Substanzen identifizierten (108-111), wurde untersucht, ob TCDD oder ATX einen Einfluss auf die Zellzahl der DZs im drainierenden LN und deren Expression ko-stimulatorischer Moleküle während der CHS-Reaktion hat. Dazu wurden TCDD- und Öl-behandelte ATX- bzw. scheinoperierte Mäuse mit DNFB sensibilisiert und die CHS-Reaktion durch DNFB-Applikation auf die Ohren der Tiere initiiert. 24 h später wurden die drainierenden LN bezüglich ihres Gehaltes an DZs untersucht, die durchflusszytometrisch anhand ihrer

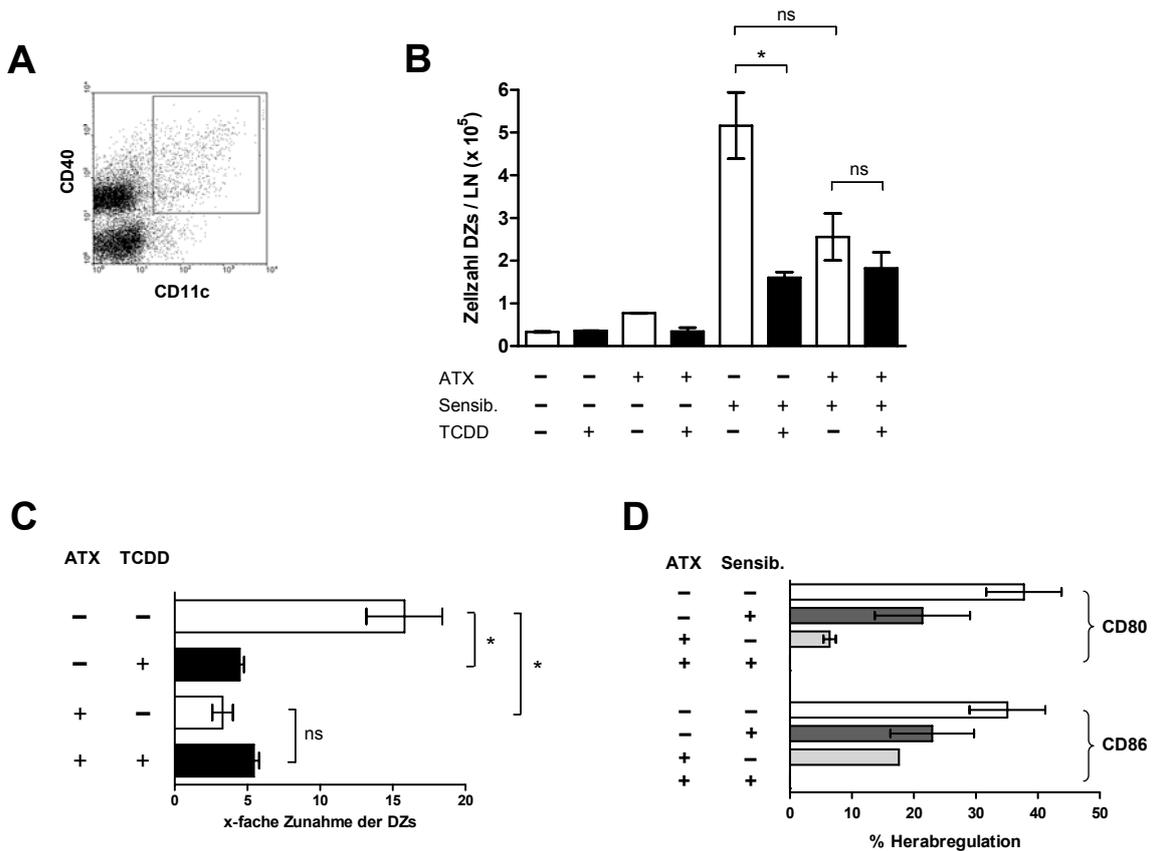


Abb. 20: Effekt von TCDD und ATX auf die Anzahl DZs im LN und ihre Expression kostimulatorischer Moleküle während der CHS-Reaktion. ATX- oder schein-operierte Mäuse wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von DNFB oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute DNFB-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und die durchschnittliche Zellularität pro Maus wurde bestimmt. Die Suspensionen wurden gruppenweise gepoolt und Aliquots wurden mit anti-CD11c-, CD40-, CD80- und CD86-Ak gefärbt. DZs wurden als $\text{CD11c}^+\text{CD40}^+$ -Zellen (A) identifiziert und ihre Zellzahlen pro LN wurden bestimmt (B). (C) Die Zunahme an DZs pro LN wurde in DNFB-sensibilisierten Mäusen im Vergleich mit den entsprechenden unsensibilisierten Tieren bestimmt. (D) Die TCDD-vermittelte Herabregulation von CD80 und CD86 wurde auf den DZs basierend auf den durchflusszytometrisch bestimmten MFI in Relation zu den Lösungsmittelkontrollen berechnet. Abb. B+C enthält die gepoolten Daten aus drei bzw. zwei voneinander unabhängigen Experimenten für die schein-operierten bzw. ATX-Mäuse mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe. Abb. D enthält die gepoolten Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten für die CD80-Expression in schein-operierten Mäusen bzw. aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten für die übrigen Gruppen.

Ko-Expression des Integrins CD11c und CD40 identifiziert wurden (Abb. 20A). Ähnlich wie schon zuvor für T- und B-Zellen beobachtet induzierte die Sensibilisierung mit DNFB auch bei DZs eine deutliche Zunahme der Zellzahl in den drainierenden LN. So enthielten die LN Öl-behandelter euthymischer Mäuse 24 h nach Zweitkontakt mit DNFB etwa 5×10^5 DZs (Abb. 20B). In Gegenwart von TCDD

war die Menge an DZs signifikant auf $1,5 \times 10^5$ Zellen/LN reduziert. Überraschenderweise war jedoch auch der DZ-Gehalt in Öl-injizierten ATX-Mäusen im Vergleich mit euthymischen Mäusen um ca. 50% verringert; der Unterschied war jedoch aufgrund der großen Varianz in den beiden Experimenten nicht signifikant. Wie schon zuvor bei T- und B-Zellen beobachtet, konnte TCDD auch keine weitere Reduktion der DZ-Zellzahl in ATX-Mäusen induzieren. Betrachtet man die Zunahme der DZ-Zellzahl im Vergleich von sensibilisierten Mäusen und den entsprechenden nicht sensibilisierten Gruppen, so zeigt sich, dass die DZs in den drainierenden LN von euthymischen Öl-behandelten Mäusen um den Faktor 15 zunahmten. In TCDD-injizierten Tieren war diese Zunahme signifikant reduziert und erreicht nur den Faktor 5. Auch Öl-behandelte ATX-Mäuse zeigten verglichen mit euthymischen Tieren einen signifikant verminderten Anstieg der DZ-Zellzahl (Faktor 4), was auf einen Einfluss des Thymus und/oder von aus dem Thymus ausgewanderten Zellen auf die Zunahme der DZs während der CHS-Reaktion schließen lässt.

Neben der Präsentation des Antigens ist die Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche einer DZ von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen und somit auch für die Induktion der CHS-Reaktion. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurde die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 durch die DZs in den aurikulären LN der unterschiedlich behandelten Mäuse durchflusszytometrisch analysiert. Anhand der gemessenen durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten (MFI) dieser beiden Marker auf den DZs wurde ihre TCDD-vermittelte Expressionsregulation im Vergleich mit den entsprechenden Öl-behandelten Gruppen bestimmt. Bei DNFB-sensibilisierten euthymischen Mäusen bewirkte die Exposition mit TCDD eine ca. 20%ige Herabregulation der CD80- und CD86-Expression auf der Oberfläche der DZs. Der Effekt war für beide Marker sogar noch deutlicher in nicht sensibilisierten Tieren zu erkennen und erreichte bei diesen jeweils eine 35%ige Reduktion. In nicht sensibilisierten ATX-Mäusen war die TCDD-induzierte Herabregulation von CD80 und CD86 dagegen schwächer ausgeprägt und fehlte sogar vollständig in den Tieren, die zuvor mit DNFB sensibilisiert worden waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die TCDD-vermittelte Herabregulation der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf DZs während der CHS-Reaktion teilweise – entweder direkt oder indirekt – durch den Thymus vermittelt wird.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Exposition mit TCDD zu einer deutlichen Reduktion an DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion führt. Ähnlich wie TCDD kann auch ATX die normalerweise in euthymischen DNFB-sensibilisierten Mäusen im Vergleich mit nicht sensibilisierten Tieren beobachtete starke Zunahme der DZ-Zellzahl unterdrücken. Darüber hinaus induziert TCDD die Herabregulation der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf DZs aus den LN euthymischer Mäuse, aber nicht in DNFB-sensibilisierten ATX-Mäusen.

3.11 Verminderte Proliferation oder verstärkte Apoptose im drainierenden LN spielen keine bedeutende Rolle für die TCDD-vermittelte Reduktion der DZs während der CHS-Reaktion

Eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen sind denkbar, die die TCDD-vermittelte Reduktion der DZ-Zellzahl (oder anderer Zelltypen) in den drainierenden LN während der CHS-Reaktion erklären könnten. Hierzu zählen beispielsweise eine verminderte Proliferation oder aber auch eine verstärkte Apoptose. Zahlreiche Studien konnten z.B. belegen, dass TCDD bzw. der aktivierte AhR die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen, zu denen u.a. DN-Thymozyten, Jurkat T-Zellen und verschiedene Tumorzellen gehören, beeinflussen kann (90,177-179). Der aktivierte AhR induziert in den entsprechenden Zellen für gewöhnlich den Zellzyklusarrest bzw. eine verminderte Proliferation. Obwohl DZs, die im Rahmen ihres Differenzierungsprozesses das Knochenmark in die Peripherie verlassen haben, i.a. als nicht proliferierende Zellen gelten, wurde untersucht, ob dieser Mechanismus von Bedeutung für die Erklärung der TCDD-induzierten Verminderung der DZ-Zellzahl während der CHS-Reaktion sein könnte. Dazu wurde die CHS-Reaktion wie weiter oben beschrieben in TCDD- bzw. Öl-behandelten ATX- oder schein-operierten Mäusen ausgelöst. Nach Induktion der CHS-Reaktion erhielten die Tiere eine einmalige BrdU-Injektion. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und Aliquots der gepoolten Zellsuspensionen jeder Gruppe fixiert, permeabilisiert und mit anti-CD4-/anti-CD19- bzw. anti-CD11c-/anti-CD40-Ak jeweils in Kombination mit anti-BrdU-Ak und 7-AAD gefärbt. Zellen, die sowohl CD11c als auch CD40 exprimierten, wurden als DZs identifiziert. Abb. 21 veranschaulicht

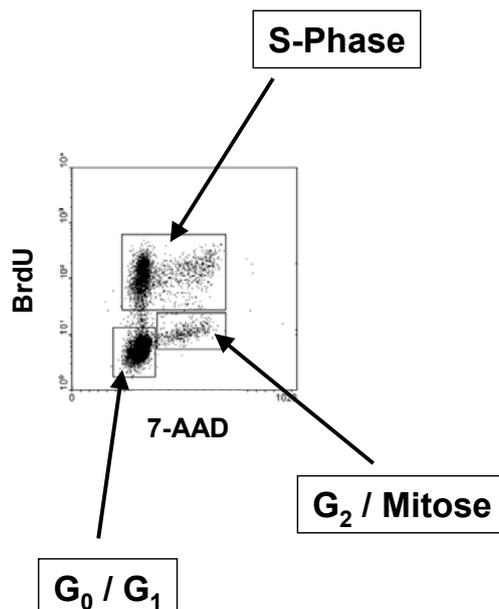


Abb. 21: Beispielhafte Darstellung zur Zellzyklus-Analyse. Die zu untersuchenden Zellen aus BrdU-behandelten Mäusen werden isoliert, fixiert, permeabilisiert und mit anti-BrdU-Ak und 7-AAD gefärbt. Zur Analyse von definierten Subpopulationen werden die Zellen vor der Fixierung mit geeigneten Ak gefärbt. Zellen, die sich in der S-Phase befinden, können als BrdU^{stark}/7-AAD^{-/+} identifiziert werden, während Zellen in der G₂-Phase/Mitose BrdU^{schwach}/7-AAD⁺ sind.

anhand eines Beispiels, wie die verschiedenen Zellzyklus-Stadien mit Hilfe dieser Technik voneinander zu unterscheiden sind.

Überraschenderweise zeigte sich, dass 16-25% der DZs in den drainierenden LN bei allen untersuchten Gruppen 24 h nach Induktion der CHS-Reaktion Anzeichen von Proliferation aufwiesen, wobei der Anteil in den DNFB-sensibilisierten Gruppen jeweils höher war als bei den nicht sensibilisierten Tieren (Tab. 5). Bezogen auf den totalen Anteil proliferierender DZs konnte weder ein TCDD- noch ATX-vermittelter Effekt im Vergleich mit den entsprechenden Kontroll-Gruppen detektiert werden. Differenziert man jedoch zwischen DZs, die sich in der S-Phase befanden und solchen, die bereits die G₂-Phase/Mitose erreicht hatten, so lässt sich erkennen, dass TCDD in den DNFB-sensibilisierten Mäusen den Anteil der DZs reduzierte, die sich in der G₂-Phase/Mitose befanden (12,6% vs. 19,7% in euthymischen Mäusen; 12,4% vs. 17% in ATX-Mäusen). Dagegen enthielten die aurikulären LN der TCDD-behandelten Tiere mehr DZs, die noch in der S-Phase waren (9,4% vs. 5,0% in euthymischen Mäusen; 10,2% vs. 8,4% in ATX-Mäusen). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TCDD die Proliferation von DZs im drainierenden LN während der

Tab. 5: Einfluss von TCDD und ATX auf den Zellzyklus verschiedener Subpopulationen im drainierenden LN während der CHS-Reaktion.^a

		Kontrolle				ATX					
		Sensib.		-		+		-		+	
		TCDD	-	+	-	+	-	+	-	+	
Dendritische Zellen	S-Phase ^b	4.7	9.9	5.0	9.4	9.7	7.0	8.4	10.2		
	G ₂ / Mitose	11.1	9.9	19.7	12.6	10.7	13.0	17.0	12.4		
CD4 ⁺ -Zellen	S-Phase	0.5	1.2	1.7	1.8	2.2	1.7	4.1	3.1		
	G ₂ / Mitose	1.1	0.8	1.0	0.9	1.4	1.2	1.5	1.4		
B-Zellen	S-Phase	0.3	0.6	0.4	0.5	– ^c	1.2	0.6	0.6		
	G ₂ / Mitose	5.5	5.9	7.9	6.3	–	6.0	7.9	6.2		
CD4-CD19 ⁻ -Zellen ^d	S-Phase	0.7	1.8	2.2	2.7	2.0	2.9	4.1	4.6		
	G ₂ / Mitose	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3		

^a ATX- oder schein-operierte Mäuse wurden mit TCDD oder Öl injiziert, und die CHS-Reaktion wurde wie weiter oben beschrieben ausgelöst. Nach der DNFB-Applikation auf die Ohren wurde den Tieren 1 mg BrdU injiziert. 24 h später wurden die Mäuse getötet, und ihre aurikulären LN wurden entnommen. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden für jede Gruppe gepoolt und Aliquots wurden mit anti-CD4-/anti-CD19- bzw. anti-CD11c- und anti-CD40-Ak gefärbt. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden 4 Mäuse pro Gruppe eingesetzt.

^b Die Zellzyklus-Analyse erfolgte durchflusszytometrisch durch Gegenüberstellung von 7-AAD- und anti-BrdU-Fluoreszenz. Zellen in der S-Phase sind als BrdU^{stark}/7-AAD^{-/+} definiert, während Zellen in der G₂-Phase/Mitose als BrdU^{schwach}/7-AAD⁺ charakterisiert sind. Die angegebenen Zahlen repräsentieren die prozentualen Anteile der jeweiligen Subpopulation, die proliferieren.

^c nicht bestimmt

^d CD4-CD19⁻-Zellen bestehen im wesentlichen – abgesehen von NK-Zellen, die etwa 5% ausmachen – aus CD8⁺-Zellen.

CHS-Reaktion verzögert. Da der totale Anteil proliferierender DZs aber nicht verringert war, spielt dieser Effekt aber vermutlich nur eine untergeordnete Rolle für die Erklärung der TCDD-vermittelten Reduktion der DZs bei dieser Immunantwort.

Die Zellzyklus-Analyse von CD4⁺-Zellen zeigt, dass in den drainierenden LN von euthymischen Mäusen nur zwischen 1,6% und 2,7% dieser Zellen proliferierten, und es konnte kein TCDD-vermittelter Effekt detektiert werden, wie aus den ähnlichen Frequenzen im Vergleich zu den Öl-behandelten Tieren hervorgeht. Im Gegensatz zu den DZs befand sich die Mehrheit der proliferierenden CD4⁺-Zellen in fast allen Gruppen noch in der S-Phase und hatte die G₂-Phase/Mitose noch nicht erreicht. Verglichen mit den euthymischen Gruppen enthielten die drainierenden LN von ATX-Mäusen – insbesondere bei den DNFB-sensibilisierten Tieren – einen höheren Anteil an proliferierenden CD4⁺-Zellen, der 5,6% bei den Öl- und 4,5% bei den TCDD-behandelten Mäusen betrug.

Das Proliferationsverhalten der B-Zellen unterschied sich deutlich von dem der CD4⁺-Zellen. Die große Mehrheit der sich teilenden B-Zellen (83-95%) in den verschiedenen Gruppen befand sich bereits in der G₂-Phase/Mitose. Auch bei den nicht sensibilisierten Mäusen betrug die Frequenz an proliferierenden B-Zellen bereits 6-7% und stieg in Öl-behandelten sensibilisierten Tieren bis auf über 8% an. In TCDD-exponierten Mäusen war dieser geringe sensibilisierungsbedingte Anstieg nicht zu erkennen und der Anteil der proliferierenden B-Zellen blieb bei etwa 7%. ATX per se schien keinen Einfluss auf die Proliferation der B-Zellen zu haben, da die Frequenzen sich nicht von denen in euthymischen Mäusen unterschieden.

Die Proliferation von CD8⁺-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht separat untersucht, aber durch den gleichzeitigen durchflusszytometrischen Ausschluß von CD4⁺- und CD19⁺-Zellen kann man eine starke Anreicherung von CD8⁺-Zellen innerhalb der verbliebenen Lymphozyten erreichen, die im wesentlichen nur noch durch eine kleine Population von NK1.1⁺-Zellen kontaminiert wurden (~5% der CD4⁻CD19⁻-Lymphozyten). Die somit erhaltenen Daten spiegeln zum Teil die Ergebnisse wider, die bei der Analyse des Zellzyklus von CD4⁺-Zellen erhalten wurden. In euthymischen Mäusen proliferierten 1-3% der CD4⁻CD19⁻-Zellen, wobei die klare Mehrheit dieser Zellen sich noch in der S-Phase befand. Der Anteil an proliferierenden CD4⁻CD19⁻-Zellen war größer in DNFB-sensibilisierten Tieren. Die drainierenden LN der ATX-Mäuse enthielten im direkten Vergleich mit der jeweiligen euthymischen Gruppe eine höhere Frequenz an sich teilenden Zellen, die in den sensibilisierten Gruppen bis auf 5% anstieg. Auffällig war, dass infolge der TCDD-Exposition der Anteil an CD4⁻CD19⁻-Zellen, die sich in der S-Phase befanden, im Vergleich mit der entsprechenden Öl-behandelten Gruppe anstieg, während für die G₂-Phase/Mitose keine Unterschiede zwischen sämtlichen Gruppen beobachtet werden konnten (jeweils 0,2-0,3% aller CD4⁻CD19⁻-Zellen).

Diese Ergebnisse zeigen, dass DZs – anders, als bisher angenommen – die Kapazität haben, in peripheren LN nach zuvor erfolgter Exposition mit Antigen zu proliferieren und diese Proliferation ist verstärkt, wenn die Mäuse zuvor im Rahmen der Sensibilisierung mit dem Antigen schon einmal in Kontakt gekommen sind. TCDD hat zwar keinen Einfluss auf den totalen Anteil sich teilender DZs, aber die Proliferation scheint sowohl in euthymischen als auch in ATX-Mäusen verzögert zu sein. Darüber hinaus bewirkt TCDD eine schwache Reduktion bei der Proliferation von B-Zellen in DNFB-sensibilisierten Mäusen, hat aber gleichzeitig zumindest in

euthymischen Mäusen keinen Effekt auf den Zellzyklus von CD4⁺-Zellen. Außerdem zeigen diese Daten, dass ein erhöhter Anteil an CD4⁺- und CD4⁻CD19⁻-Zellen (\approx CD8⁺-Zellen) in ATX-Mäusen während der CHS-Reaktion im drainierenden LN im Vergleich mit euthymischen Tieren proliferiert.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der für die TCDD-vermittelte Reduktion der DZ-Zellzahl im aurikulären LN während der CHS-Reaktion von Bedeutung sein könnte, ist die Apoptose dieser Zellen. Zahlreiche voneinander unabhängige Studien haben Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben als einen der Mechanismen identifiziert, durch den TCDD seine Toxizität zu vermitteln scheint (180-184). Zur Analyse der DZ-Apoptose wurden Aliquots aus Zellsuspensionen der aurikulären LN 24 h nach Initiierung der CHS-Reaktion mit anti-CD11c-, CD40-Ak und Annexin V gefärbt. Wie aus Abb. 22A hervorgeht, waren 43-55% der DZs in den LN euthymischer Mäuse apoptotisch. Es konnte jedoch keine verstärkte DZ-Apoptose in TCDD-behandelten Mäuse detektiert werden, der Anteil war sogar eher zumindest in unsensibilisierten Tieren erniedrigt. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch für die ATX-Mäuse, aber der Anteil an apoptotischen DZs war bei ihnen mit 33-47% generell etwas niedriger als in den euthymischen Tieren. Betrachtet man die Gesamtheit der im drainierenden LN befindlichen Zellen, so variierte der Anteil an apoptotischen Zellen zwischen 10% und 17% (Abb. 22B), aber auch in diesem Fall verursachte die Exposition mit TCDD keine Zunahme der Apoptose. Auch ATX hatte keinerlei Effekt auf die Frequenz an apoptotischen Zellen. Eine verstärkte Apoptose von B-Zellen, die die vorherrschende Population in den drainierenden LN DNFB-sensibilisierter Mäuse repräsentieren, trug ebenfalls nicht zur Reduktion der Zellularität in den LN von TCDD-behandelten oder ATX-Mäusen bei, da von diesen Zellen in den verschiedenen Gruppen nur 1-3% Annexin V⁺ waren (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass weder eine verminderte Proliferation noch eine verstärkte Apoptose von DZs im drainierenden LN die TCDD-vermittelte Reduktion der DZ-Zellzahl während der CHS-Reaktion erklären kann.

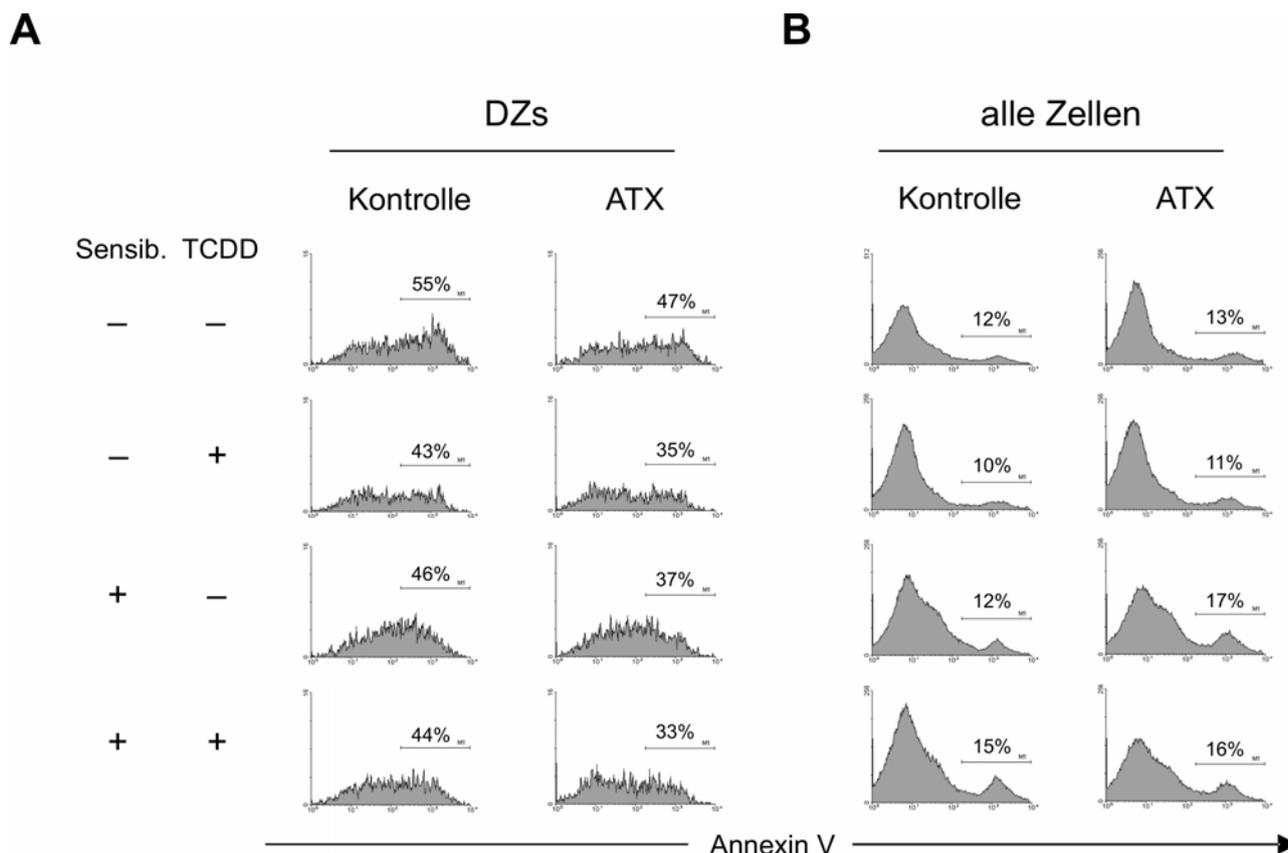


Abb. 22: Effekt von TCDD und ATX auf die Apoptose von DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion. ATX- oder schein-operierte Mäuse wurden mit 10 µg/kg TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von DNFB oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute DNFB-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet. Die Suspensionen wurden gruppenweise gepoolt und Aliquots wurden mit anti-CD11c-Ak und Annexin V gefärbt. (A) Der Anteil an Annexin V⁺-Zellen unter den CD11c⁺-Zellen im drainierenden LN der verschiedenen Behandlungsgruppen ist dargestellt. (B) Zum Vergleich ist der Anteil an Annexin V⁺-Zellen unter der Gesamtheit der Zellen der drainierenden LN dargestellt. Die Daten zeigen die Ergebnisse von einem aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ausgang für die schein-operierten Mäuse bzw. von einem Experiment für ATX-Mäuse. Jede Gruppe bestand aus 4 Mäusen.

3.12 TCDD verhindert, dass Antigen-beladene DZs den drainierenden LN während der CHS-Reaktion erreichen

Die Induktion der CHS-Reaktion (und anderer Immunantworten) ist ein komplexer Vorgang, bei dem für gewöhnlich DZs in den Geweben Antigene an deren Eintrittsstelle in den Körper aufnehmen, prozessieren und darauf zu den drainierenden LN migrieren, wo sie das Antigen präsentieren und antigenspezifische

T-Zellen aktivieren können. Wie zuvor gezeigt, führte die Exposition mit TCDD in euthymischen DNFB-sensibilisierten Mäusen zu einer Reduktion von DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion, wobei der hierbei zugrunde liegende Mechanismus unklar geblieben ist, da in der Gegenwart von TCDD weder eine verminderte Proliferation noch eine erhöhte Apoptose-Rate der DZs im LN beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass TCDD möglicherweise die Migration der DZs von der Antigen-Expositionsstelle (*hier*: Haut der Ohren) zu den drainierenden (aurikulären) LN beeinträchtigen kann. Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, wurde eine CHS-Reaktion in TCDD- und Öl-behandelten euthymischen Mäusen – wie zuvor beschrieben – ausgelöst. Als Antigen für diese Versuche diente jedoch nicht das in den zuvor geschilderten Experimenten benutzte DNFB, sondern es wurde stattdessen FITC verwendet. FITC hat genau wie DNFB sensibilisierende Eigenschaften, aber darüber hinaus bietet diese Substanz den Vorteil, dass sie durch ihre Fluoreszenz Zellen an der Expositionsstelle in der Haut *in situ* markieren kann, darunter auch DZs und Langerhans-Zellen. Diese Zellen haben durch ihre migratorischen Fähigkeiten die Möglichkeit, zum drainierenden LN zu wandern, wo sie als FITC⁺CD11c⁺-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können. Mit dieser Technik lässt sich also der Migrationsweg von DZs von der Antigen-Expositionsstelle bis zum drainierenden LN verfolgen.

TCDD- und Öl-behandelte euthymische Mäuse wurden durch Auftragung von FITC-Lösung auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert (Kontroll-Tiere erhielten nur Lösungsmittel). 5 Tage später wurde die CHS-Reaktion durch FITC-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst, bevor 16 bzw. 24 h darauf die aurikulären LN entnommen wurden. Wie in Abb. 23A gezeigt ist, unterdrückte TCDD die FITC-induzierte Schwellung der drainierenden LN um ca. 40%, ähnlich wie zuvor bei der DNFB-vermittelten CHS-Reaktion beobachtet werden konnte. Im Falle der FITC-vermittelten CHS-Reaktion war diese Suppression so stark, dass kein Unterschied zwischen TCDD-behandelten FITC-sensibilisierten Mäusen und den nicht sensibilisierten Negativkontrollen zu erkennen war. Die Schwellung war nach 16 h noch nicht so stark ausgeprägt wie nach 24 h, aber dennoch war die durch TCDD induzierte Suppression zu beiden Zeitpunkten signifikant. Insgesamt fiel die Schwellung bei den FITC-sensibilisierten Öl-behandelten Mäusen deutlich schwächer

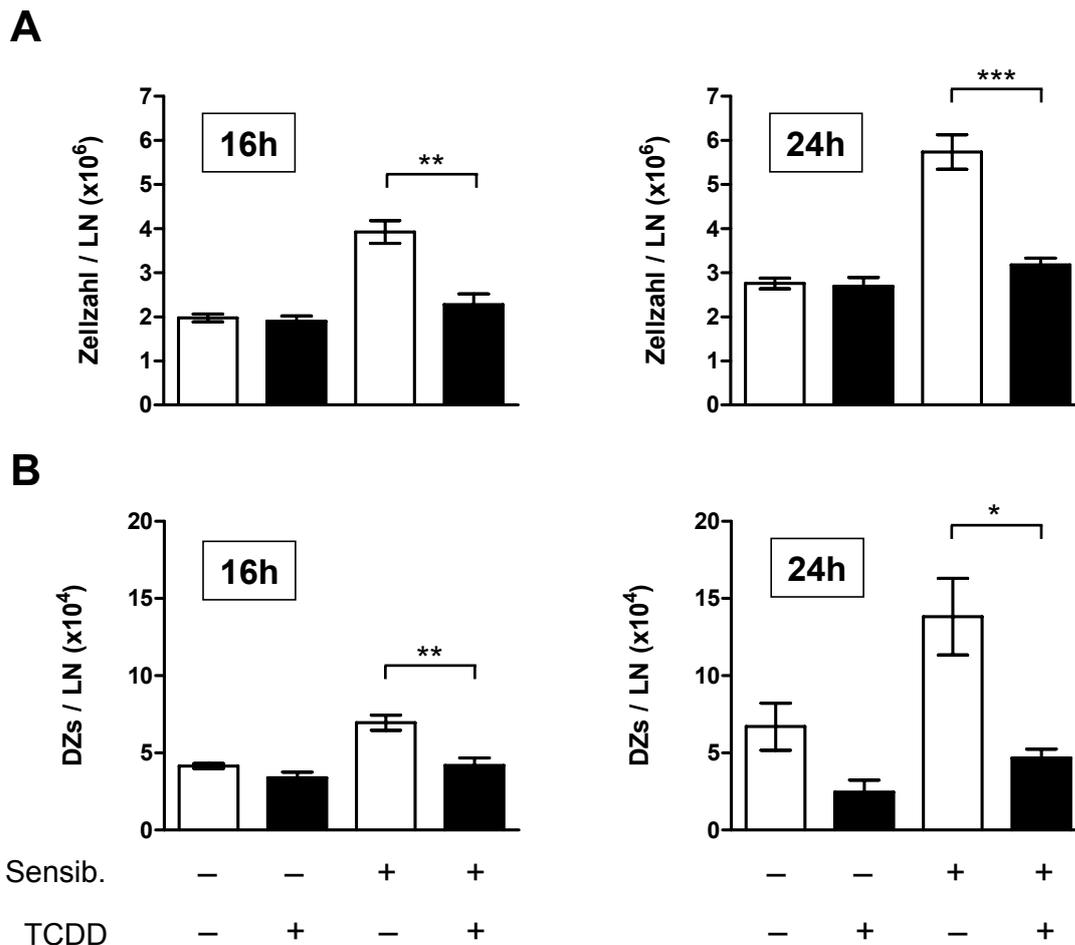


Abb. 23: Einfluss von TCDD auf die Zellularität des drainierenden LN sowie die Anzahl DZs bei der FITC-vermittelten CHS-Reaktion. Euthymische Mäuse wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von FITC oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute FITC-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 16 bzw. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet. Die Zellularität der LN wurde bestimmt (A) und Aliquots jeder einzelnen Maus wurden mit anti-CD11c- und CD40-Ak gefärbt, um die Zellzahl der DZs pro LN berechnen zu können (B). Jeder Balken repräsentiert die durchschnittliche Zellularität von 4 individuell analysierten Mäusen pro Gruppe.

aus im Vergleich mit den entsprechenden DNFB-sensibilisierten Tieren (ca. 50% Reduktion, vergleiche Abb. 17B), was die bekannten stärker sensibilisierenden Eigenschaften von DNFB widerspiegelt. Gleichzeitig bewirkte TCDD analog zu den Ergebnissen der DNFB-vermittelten CHS-Reaktion in sensibilisierten euthymischen Mäusen auch bei der FITC-induzierten Reaktion eine Reduktion der DZ-Zellzahl im drainierenden LN, die sowohl nach 16 h als auch nach 24 h signifikant war (Abb. 23B).

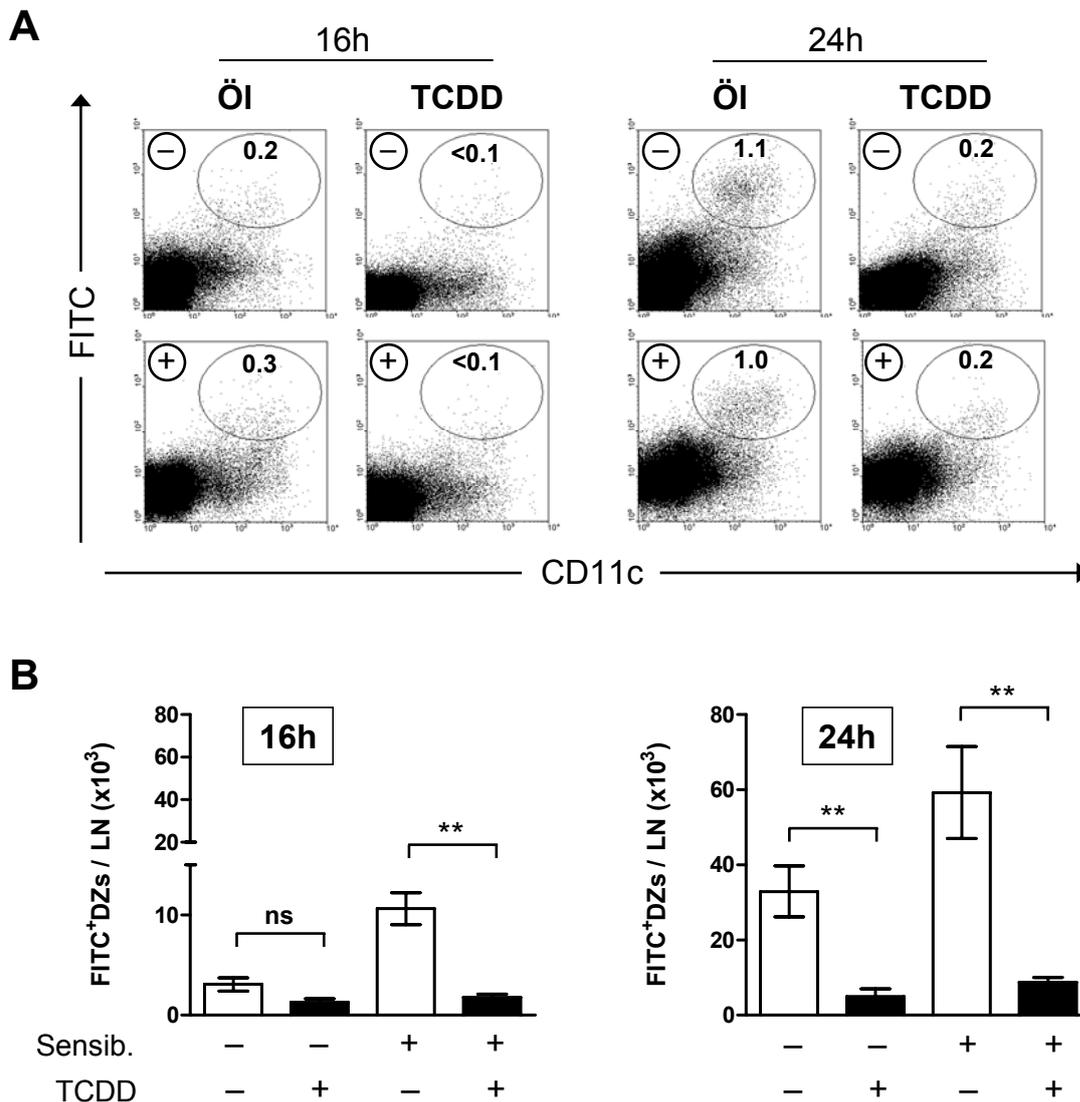


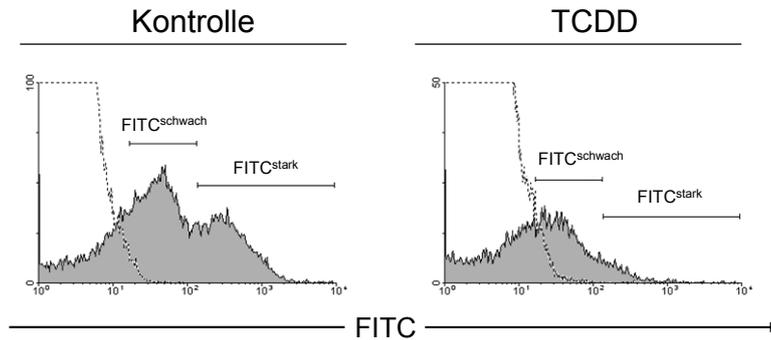
Abb. 24: TCDD reduziert die Anzahl Antigen-beladener DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion. Euthymische Mäuse wurden mit 10 µg/kg TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von FITC oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute FITC-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 16 bzw. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet. Die Zellularität der LN wurde bestimmt, Aliquots jeder einzelnen Maus wurden mit anti-CD11c-Ak gefärbt, und (A) der Anteil an FITC⁺-DZs wurde bestimmt [(-) = unsensibilisiert; (+) = sensibilisiert]. (B) Mit Hilfe der relativen Anteile wurden die absoluten Zahlen an FITC⁺-DZs in den drainierenden LN berechnet. Jeder Balken repräsentiert die durchschnittliche Zellularität von 4 individuell analysierten Mäusen pro Gruppe.

Untersucht man die Zellen aus den drainierenden LN der verschiedenen Behandlungsgruppen bezüglich ihres Gehaltes an FITC⁺-Zellen, so zeigt sich, dass alle Zellen, die größere Mengen FITC gebunden hatten, gleichzeitig CD11c

exprimierten, also wie erwartet DZs sind (Abb. 24A). Die Exposition mit TCDD bewirkte bereits nach 16 h eine Reduktion des Anteils an FITC⁺-DZs im aurikulären LN. Diese Zellen machten hier weniger als 0,1% der Gesamtzellularität aus, während ihre Frequenz in Öl-behandelten Mäusen bei 0,2-0,3% lag. Außerdem zeigt sich, dass sich der Anteil der FITC⁺-DZs infolge der Sensibilisierung mit FITC im Vergleich mit nicht sensibilisierten Mäusen nicht veränderte. 24 h nach dem Auslösen der CHS-Reaktion war die TCDD-vermittelte Reduktion der FITC⁺-DZs im drainierenden LN noch stärker ausgeprägt als 8 h zuvor. In Öl-behandelten Mäusen enthielten die aurikulären LN etwa 1,0% an FITC⁺-DZs, während dieser Anteil in TCDD-exponierten Tieren auf 0,2% vermindert war. In absoluten Zahlen betrachtet war die TCDD-induzierte Reduktion der FITC⁺-DZs nach 16 h nur bei den zuvor mit FITC sensibilisierten Mäusen signifikant (durchschnittlich 2×10^3 FITC⁺DZs/LN mit TCDD vs. 11×10^3 /LN in der Kontrolle; Abb. 24B). Analog zu den relativen Anteilen der FITC⁺-DZs war die Verminderung nach 24 h noch deutlicher zu erkennen. Die drainierenden LN von TCDD-behandelten Mäusen enthielten zu diesem Zeitpunkt – unabhängig davon, ob die Tiere zuvor mit FITC sensibilisiert worden waren oder nicht – nur 15% der FITC⁺-DZs, die in den Kontroll-Mäusen gefunden wurden (5×10^3 vs. 33×10^3 FITC⁺-DZs/LN in nicht sensibilisierten Mäusen; 9×10^3 vs. 59×10^3 FITC⁺-DZs/LN in sensibilisierten Mäusen).

Betrachtet man den Anteil der DZs im drainierenden LN, die das Antigen FITC gebunden haben, so zeigt sich für Öl-behandelte Mäuse, dass 16 h nach Induktion der CHS-Reaktion 50% aller DZs in nicht sensibilisierten Tieren und 60% der DZs in sensibilisierten Tieren FITC⁺ waren (Abb. 25). Ähnlich wie zuvor von Macatonia et al. berichtet, konnten im drainierenden LN nach FITC-Applikation auf der Haut zwei verschiedene FITC⁺-DZ-Populationen detektiert werden, die sich bezüglich ihrer gebundenen Menge an FITC-Molekülen unterschieden und entweder als FITC^{stark} oder als FITC^{schwach} bezeichnet werden können (185, Abb. 25A). 16 h nach FITC-Applikation waren bei den Öl-Kontrollen nur etwa 4% der DZs in nicht sensibilisierten und 10% in sensibilisierten Mäusen FITC^{stark} (Abb. 25B). In TCDD-behandelten Mäusen waren nur 10% (nicht sensibilisiert) bzw. 21% (sensibilisiert) der DZs in den aurikulären LN FITC⁺, und nur 2% der DZs in diesen beiden Gruppen waren FITC^{stark}. Nach 24 h fiel der Unterschied bezüglich des Anteils FITC⁺DZs zwischen TCDD- und Öl-injizierten Mäusen nicht mehr so deutlich aus wie nach 16 h. Bei den Öl-behandelten Gruppen waren ca. 70% der DZs im LN FITC⁺, während diese

A



B

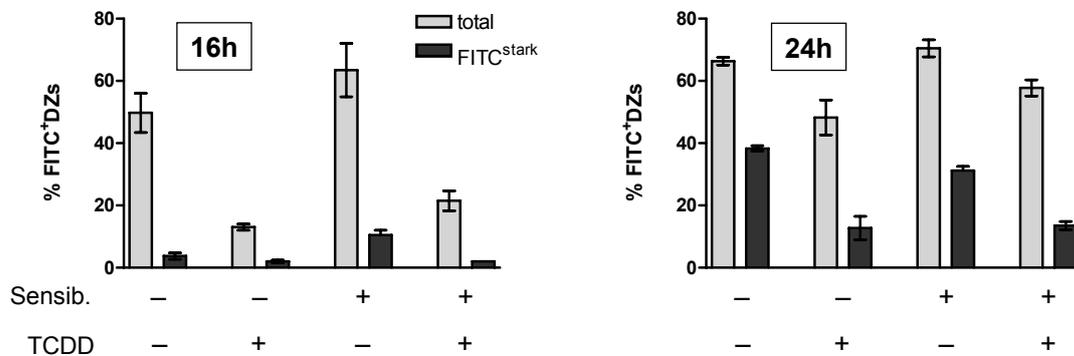


Abb. 25: Effekt von TCDD auf die Antigen-Beladung von DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion. Euthymische Mäuse wurden mit 10 µg/kg TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von FITC oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute FITC-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 16 bzw. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet. Aliquots jeder einzelnen Maus wurden mit anti-CD11c- und CD40-Ak gefärbt, und die FITC-Fluoreszenzintensität auf den DZs (CD11c⁺CD40⁺-Zellen) wurde bestimmt. Abb. A zeigt die typische FITC-Fluoreszenz von DZs im drainierenden LN von TCDD- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen 24 h nach Zweitexposition mit FITC. Es lassen sich zwei FITC⁺-Populationen voneinander unterscheiden, die eine unterschiedliche Fluoreszenz-Intensität aufweisen (FITC^{stark}/FITC^{schwach}). Die gestrichelte Linie repräsentiert die FITC-Fluoreszenz von LN-Zellen aus Mäusen, die nicht mit FITC behandelt wurden. Basierend auf der Definition der FITC⁺-DZ-Populationen in Abb. A zeigt Abb. B den Anteil an FITC⁺-DZs sowie FITC^{stark}-DZs bezogen auf die Gesamtheit der DZs im LN für alle Gruppen. Jeder Balken repräsentiert den durchschnittlichen Anteil von 4 individuell analysierten Mäusen pro Gruppe.

Frequenz in TCDD-behandelten Tieren auf 50% (nicht sensibilisiert) bzw. 60% (sensibilisiert) reduziert war. 30-40% der FITC⁺DZs in den Kontroll-Gruppen waren zugleich FITC^{stark}, wohingegen ihr Anteil in den TCDD-behandelten Mäusen nur 10% betrug.

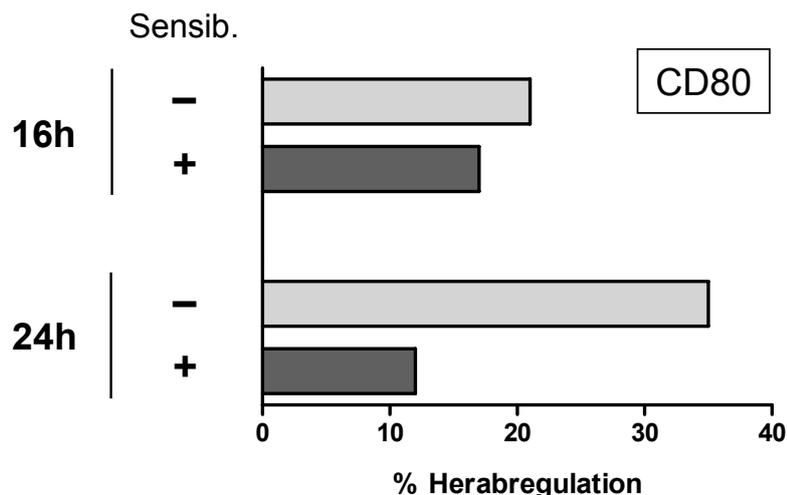


Abb. 26: TCDD-vermittelte Herabregulation von CD80 auf FITC⁺-DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion. Euthymische Mäuse wurden mit 10 µg/kg TCDD oder Lösungsmittel injiziert. 5 Tage später wurden sie durch Applikation von FITC oder Lösungsmittel zur Kontrolle auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Die CHS-Reaktion wurde weitere 5 Tage später durch erneute FITC-Applikation auf die Oberfläche der Ohren ausgelöst. 16 bzw. 24 h später wurden die drainierenden aurikulären LN entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet. Aliquots jeder einzelnen Maus wurden mit anti-CD11c-, CD40- und CD80-Ak gefärbt, um den MFI für die CD80-Expression auf den DZs zu bestimmen. Basierend auf dem MFI für die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurde die Herabregulation dieses Markers durch TCDD berechnet. Jeder Balken repräsentiert die durchschnittliche Herabregulation in 4 individuell analysierten Mäusen pro Gruppe.

Bei der DNFB-induzierten CHS-Reaktion bewirkte TCDD eine Herabregulation der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den DZs im drainierenden aurikulären LN. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt die Antigen-beladenen DZs betrifft, wurden die FITC⁺-DZs in den unterschiedlichen Gruppen im Hinblick auf ihre CD80-Expression untersucht. Wie in Abb. 26 dargestellt ist, induzierte TCDD auf den FITC⁺-DZs 16 h nach Initiierung der CHS-Reaktion eine 15-20%ige Herabregulation der CD80-Expression. Am deutlichsten war dieser Effekt nach 24 h in den nicht sensibilisierten Tieren zu erkennen, wo die CD80-Expression auf den FITC⁺-DZs um 35% reduziert war und somit das bei der DNFB-induzierten CHS-Reaktion erhaltene Ergebnis für die Gesamtheit der DZs im drainierenden LN widerspiegelt (vergleiche Abb. 20D). Die TCDD-vermittelte Herabregulation von CD80 betraf jedoch nicht nur die Antigen-beladenen DZs, da FITC⁻DZs ebenfalls eine Reduktion der Expression dieses Markers mit ähnlichem Ausmaß aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst verdeutlichen diese Ergebnisse, dass TCDD verhindert, dass die Antigen-beladenen DZs während der CHS-Reaktion von der Antigen-Expositionsstelle aus die drainierenden LN erreichen. Gleichzeitig haben die DZs, die in der Gegenwart von TCDD in den LN gelangen, im Vergleich mit den Kontrollen eine geringere Menge an FITC-Molekülen gebunden und zeigen eine abgeschwächte Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD80 auf ihrer Oberfläche. Diese Daten demonstrieren einen bisher unbekanntem Mechanismus, der von großer Bedeutung für das Verständnis der zellulären Grundlagen der TCDD-vermittelten Immunsuppression sein dürfte.

4. Diskussion

Effekte von TCDD auf die Differenzierung und Emigration im fötalen Thymus

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) ist der bekannteste und giftigste Vertreter einer Klasse von Substanzen, die als halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAKs) bezeichnet werden. Eines der Hauptangriffsziele dieser weit verbreiteten Umweltschadstoffe ist das Immunsystem. So führt eine TCDD-Intoxikation in der Maus und zahlreichen anderen untersuchten Spezies zur Entstehung einer allgemeinen Immunsuppression, die sowohl den humoralen als auch zellulär vermittelten Zweig des Immunsystems betrifft. Neben der Immunsuppression gehört auch die Thymustoxizität zu den charakteristischen Effekten einer TCDD-Exposition. TCDD beeinflusst eine Reihe von physiologischen im Thymus ablaufenden Prozessen, darunter Differenzierung, Proliferation, Emigration und Selektion. Dies äußert sich neben der häufig beschriebenen Entstehung der Thymusatrophie z.B. durch die Generierung einer Population von TZR $\alpha\beta$ -CD8⁺-Zellen, die nicht MHC-Klasse I-restringiert ist (95) und deshalb möglicherweise auch nicht in der Lage ist, sich in normalem Umfang an einer entsprechenden Immunantwort zu beteiligen. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Exposition mit TCDD *in vitro* zur Emigration einer ungewöhnlichen Population DN-Zellen aus dem Thymus führt (96,97), ein Effekt, der in einer aktuellen Studie auch *in vivo* bestätigt werden konnte (99). Diese Befunde lassen es möglich erscheinen, dass zwischen den toxischen Effekten, die eine TCDD-Exposition auf den Thymus hat und dem Auftreten der Immunsuppression ein Zusammenhang bestehen könnte, denn es ist durchaus vorstellbar, dass eine TCDD-induzierte verminderte Emigration bzw. die Emigration von nicht-funktionalen T-Zellen oder Zellen mit regulatorischen Eigenschaften einen Einfluss auf das Ausmaß von Immunantworten haben könnte. Auf der anderen Seite sprechen die Ergebnisse zweier Studien mit ATX-Mäusen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Entfernung des Thymus keinen nennenswerten Einfluss auf die durch TCDD oder 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlordibenzo-*p*-dioxin vermittelte Suppression der humoralen Immunantwort gegen SRBCs in der Milz hatte (100,186), gegen eine Beteiligung des Thymus bei der TCDD-vermittelten Immunsuppression.

Die Wirkung, die TCDD auf die Emigration von Zellen aus dem Thymus hat, ist bisher nur unzureichend untersucht worden. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine quantitative und qualitative Analyse der Zellen durchgeführt, die in Gegenwart von TCDD den Thymus verlassen. Als grundlegendes experimentelles System für die durchgeführten Untersuchungen diente vorrangig die FTOC. Sie stellt eine seit vielen Jahren etablierte Methode dar, mit der sich die Entwicklung und Differenzierung von Thymozyten *in vitro* so nachvollziehen lässt, wie sie auch *in vivo* verlaufen wäre und die es dem Experimentator erlaubt, diese Prozesse durch Zugabe von Zusatzstoffen (*hier*: TCDD) zu manipulieren. Die FTOC ist jedoch nicht nur dazu geeignet, die Entwicklung der Thymozyten zu verfolgen, sondern ermöglicht auch die Untersuchung der aus dem fötalen Thymus emigrierenden Zellen. Lee et al. konnten in einer Studie demonstrieren, dass man die Emigration dieser Zellen in der FTOC durch Verwendung von Migrationshemmern wie Cytochalasin D weitestgehend blockieren kann (67), wodurch belegt wird, dass es sich bei diesem Prozess um aktive Emigration und nicht etwa um passive und zufällige Diffusion aus möglicherweise verletzten Thymuslappen handelt.

Wie erwartet induziert TCDD in der FTOC die Atrophie des Thymus und reduziert dabei die Anzahl der Thymozyten um mehr als 60%. Auch in den Kontroll-FTOCs kam es mit fortschreitender Kulturdauer zu einer Abnahme der Thymozytenzahl. Das hängt damit zusammen, dass die kultivierten Thymi im Gegensatz zur Situation im lebenden Organismus vom Blutstrom und somit von der natürlicherweise stattfindenden Immigration unreifer Prothymozyten aus dem Knochenmark (bzw. der fötalen Leber) entkoppelt sind. Durch Apoptose von Thymozyten, die die Selektionsprozesse nicht überstanden haben, aber auch durch die Emigration kommt es zu Zellverlusten im Thymus, doch es rücken keine neuen Zellen aus der Peripherie nach. Auch durch die Proliferation der Thymozyten kann dieser Verlust langfristig nicht ausgeglichen werden, so dass es zwangsläufig zu einem Absinken der Zellularität kommt. Parallel zur TCDD-induzierten Reduktion der Thymozyten-Zellularität kam es auch zu einer signifikanten Verringerung der Emigranten, wobei deren Ausmaß in etwa die Atrophie im Thymus widerspiegelt. Versteht man die Emigration als eine Funktion der Zellularität des Thymus (187), so scheint TCDD keinen spezifischen Einfluss darauf zu haben, wieviele Zellen den Thymus verlassen, da sich der ETO der Gesamtheit der Emigranten für Lösungsmittel- und TCDD-

behandelte Thymuslappen nicht unterscheidet. Dies würde bedeuten, dass die TCDD-vermittelte Reduktion der Gesamtzahl der Emigranten direkt auf die Atrophie des Thymus zurückzuführen ist.

Analysiert man die in der FTOC emigrierenden Zellen bezüglich ihrer Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8, so zeigt sich überraschenderweise, dass der Großteil der aus den Kontroll-Kulturen an Tag 6 emigrierenden Zellen in Analogie zur Zellverteilung im Thymus DP ist, obwohl man eher reife SP-Zellen erwarten würde. Es scheint sich bei diesem Befund jedoch nicht um ein Artefakt zu handeln, da signifikante Mengen DP-Zellen auch im Blut, jedoch nicht in der Milz von neugeborenen Mäusen gefunden wurden. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Bonomo et al., in der gezeigt werden konnte, dass die LN aber nicht die Milz von zwei bis vier Tage alten Mäusen ebenfalls größere Mengen an DP-Zellen enthielten, die aus dem Thymus stammten und innerhalb der ersten drei Lebenswochen der Tiere nahezu vollständig verschwanden (66). Über mögliche physiologische Funktionen dieser zumindest phänotypisch unreifen Zellen, die zu geringen Anteilen auch in den peripheren lymphatischen Organen und im Blut adulter Mäuse detektiert werden können (188), ist nur wenig bekannt. Es wurde vermutet, dass diese Zellen in Autoimmunitäts-Prozesse involviert sein könnten, da sie in männlichen Mäusen, die einen transgenen TZR exprimieren, der spezifisch das H-Y-Antigen erkennt, nicht eliminiert werden (66). Darüber hinaus konnte eine verstärkte Emigration von DP-Zellen, die vermutlich noch nicht der negativen Selektion unterzogen wurden, in mit Cyclosporin A behandelten Ratten festgestellt werden (189). Neuere Studien deuten darauf hin, dass periphere DP-Zellen trotz des scheinbar unreifen Phänotyps sehr wohl Immunkompetenz haben und als Effektor-Gedächtniszellen eine Rolle bei der Bekämpfung viraler Infektionen spielen (190,191).

Die Exposition mit TCDD bewirkt sowohl unter den Emigranten in der FTOC als auch unter den Lymphozyten im Blut neugeborener Mäuse eine deutliche Reduktion der DP-Zellen. Es bleibt jedoch völlig offen, ob der Verlust dieser Zellen in der Peripherie physiologische Konsequenzen für die Tiere hat. Im Gegensatz zur Emigration von DP-Zellen scheint TCDD – trotz verminderter Zellzahlen insbesondere von CD4⁺-Thymozyten – keinen Effekt auf die Auswanderung von SP CD4⁺- und CD8⁺-RTEs aus dem fötalen Thymus zu haben, da sich der ETO für diese beiden Populationen nicht von der Kontrolle unterscheidet. Interessanterweise kommt es in den TCDD-

behandelten FTOCs jedoch zu einer präferentiellen Emigration von DN-Zellen, von denen viele den TZR $\gamma\delta$ exprimieren. Der hohe Anteil von TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen war auch in ähnlichem Ausmaß bei den DN-Thymozyten aus TCDD-behandelten Thymi vorhanden und übertraf den Anteil bei den Kontrollen zu jedem untersuchten Zeitpunkt deutlich. Diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen die Erkenntnisse einer älteren Studie, aus denen hervorgeht, dass die Differenzierung unreifer DN-Thymozyten in Maus-Föten, die *in utero* mit TCDD exponiert wurden, inhibiert ist und dass in den Thymi dieser Tiere gleichzeitig eine Verschiebung zur Generierung von TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen anstelle von TZR $\alpha\beta^+$ -Zellen induziert wird (93). Auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass TCDD die Entwicklung und Differenzierung DN-Thymozyten blockiert. In der FTOC bewirkt TCDD eine Anreicherung von DN-Thymozyten mit hoher Expression von CD44 und intermediärer Expression von CD25 (DN1b), ein Phänotyp, der vor allem unter den TZR $\gamma\delta^+$ - aber auch unter den TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten zu finden war. Noch stärker ausgeprägt war der DN1b-Phänotyp unter den Emigranten, speziell unter den in Gegenwart von TCDD emigrierenden TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen, von denen fast 90% CD44^{stark}CD25^{int} waren. Ein Großteil der DN-Zellen – insbesondere die TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten und Emigranten – aus den TCDD-FTOCs zeigte zusätzlich zur Expression von CD44 und CD25 eine hohe Expression von c-kit, wie man sie für gewöhnlich auf sehr unreifen DN1- und DN2-Thymozyten findet (10). Diese Resultate sowie die Tatsache, dass der Anteil DP-Thymozyten in TCDD-FTOCs dramatisch reduziert ist, deuten darauf hin, dass TCDD die normale Entwicklung von TZR $\alpha\beta^+$ -Zellen via DP-Stadium zwischen dem DN1- und DN2-Stadium blockiert. Die oftmals zitierte präferentielle Generierung von CD8⁺-Thymozyten in Gegenwart von TCDD stellt keinen notwendigen Widerspruch zu dieser Behauptung dar, weil diese Zellen offenbar – im Gegensatz zu CD4⁺-Thymozyten – durch AhR-vermittelte Genregulation nicht im gleichen Maße der Eliminierung durch die normalerweise im Thymus stattfindende positive Selektion unterworfen sind (95). Die Hypothese einer TCDD-induzierten Differenzierungsblockade wird außerdem durch die von M. Frericks durchgeführte Genexpressionsanalyse unterstützt, die zeigen konnte, dass DN-Emigranten aus TCDD-behandelten FTOCs im Gegensatz zu den entsprechenden Zellen aus Kontroll-Kulturen praktisch weder RAG-1 noch TdT exprimieren (192). Beide Gene werden von unreifen DN-Zellen im Thymus exprimiert – wobei RAG-1 erst ab dem DN2-Stadium transkribiert wird (193) – und sind von

entscheidender Bedeutung für die Rekombination der TZR-Gensegmente und somit für die Generierung immunkompetenter T-Zellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Lai et al. überein, die in DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten, welche aus TCDD-behandelten FTOCs isoliert worden waren, ebenfalls eine starke Herabregulation der Expression von RAG-1 und TdT nachweisen konnten (194). Ein weiteres Gen, dessen Transkription in TCDD-behandelten fötalen DN-Emigranten vollständig unterbunden war, ist c-myc. Das entsprechende Protein ist zum einen wichtig für den Fortverlauf der Differenzierung von DN1-Zellen und steuert zum anderen die Proliferation der unreifen Thymozyten nach erfolgter β -Selektion (151,195). Auch die in TCDD-exponierten DN-Emigranten detektierte verminderte Expression von Gfi1, einem transkriptionalen Repressor, der wichtig für Proliferation und Differenzierung unreifer DN-Thymozyten ist, könnte in diesem Zusammenhang ebenso von Bedeutung sein wie die verstärkte Expression des von hämatopoetischen Stammzellen exprimierten Komplementrezeptors C1qR1 sowie die verringerte Expression von pT α und Sox-4, einem Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung unreifer Thymozyten fördert. Die Funktion von c-myc und Gfi1 deutet an, dass die Differenzierung unreifer Thymozyten auch mit deren Proliferationspotential verknüpft ist. Dementsprechend wurden in den TCDD-behandelten fötalen DN-Emigranten auch einige differentiell exprimierte Gene detektiert, deren abgeleitete Proteine in der Regulation des Zellzyklus involviert sind (Cdc6, Cyclin B1, Cyclin E2 und Krüppel-like factor 4). Eine TCDD-induzierte Störung der fötalen T-Zell-Differenzierung könnte auch durch die veränderte Expression der Gene beeinflusst werden, deren Proteine an der Formierung des Zytoskeletts beteiligt sind (Adseverin, Actinin α 2, CapG). Der Entwicklungsprozess unreifer Thymozyten ist abhängig von Interaktionen mit Thymusstromazellen (siehe Ref. 6 für eine Übersicht), wobei es zur Übertragung von für die T-Zell-Differenzierung benötigten Signalen kommt. Um die Zell-Zell-Interaktionen lange genug aufrecht zu erhalten, muss eine Stabilisierung der Kontaktzone erfolgen, für die eine Reorganisation des Zytoskeletts notwendig ist, ein Prozess, der u.a. den katalytischen Abbau von Actinfasern durch Adseverin einschliesst (161). Svensson et al. vermuteten basierend auf diesen Überlegungen, dass die TCDD-induzierte erhöhte Adseverin-Expression in Thymozyten die für die Stabilisierung der Zell-Zell-Kontaktzone nötige Rekonstruktion des Actingeflechts durch dessen kontinuierliche Depolymerisation behindern könnte und somit auch Prozesse wie die Selektion von Thymozyten (161). Auch wenn man sich der

Tatsache bewusst sein muss, dass Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene nicht zwangsläufig zu entsprechenden Änderungen auf Proteinebene führen (196), lassen diese Daten im Zusammenhang mit den im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen der DN-Zellen gewonnenen Erkenntnisse vermuten, dass TCDD die Entwicklung von $TZR\alpha\beta^+$ -Zellen in einem sehr unreifen DN-Stadium (DN1b) blockiert. Trotz der offensichtlichen Auswirkungen auf die Generierung von $TZR\alpha\beta^+$ -Zellen scheint die TCDD-induzierte Entwicklungsblockade nach dem DN1b-Stadium aber die Differenzierung unreifer DN1-Vorläufer zu DN- $TZR\gamma\delta^+$ -Zellen nicht zu beeinträchtigen, was darauf hindeutet, dass sich die Entwicklungswege von $TZR\alpha\beta^+$ - und DN- $TZR\gamma\delta^+$ -Zellen bereits vor dem DN2-Stadium trennen.

In den meisten Studien, die sich mit der Entwicklung von T-Zellen im Thymus befassten (unabhängig davon, ob adulte oder fötale DN-Thymozyten analysiert wurden), konnten keine DN1b-Zellen nachgewiesen werden, bzw. diese Population war so klein, dass ihr keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Interessanterweise konnte jedoch unter den undifferenzierten DN-T-Zell-Vorläufern im Thymus von CCR7-defizienten Mäusen ein deutlich vergrößerter Anteil an $CD44^{\text{stark}}CD25^{\text{int}}$ -Zellen detektiert werden (197). Ähnlich wie die Exposition mit TCDD, führte auch das Ausschalten von CCR7 neben der Anreicherung der DN1b-Zellen zu einer deutlich reduzierten Zellularität im Thymus, wobei insbesondere die Anzahl DP-Zellen im Thymus älterer $CCR7^{-/-}$ -Mäuse vermindert ist. CCR7 ist ein Chemokin-Rezeptor, der offensichtlich durch Wechselwirkung mit seinen Liganden CCL19 und CCL21 sowohl bei der Immigration hämatopoetischer Vorläuferzellen in den Thymus, als auch bei der koordinierten Migration der sich differenzierenden Thymozyten sowie bei der Emigration der Zellen aus dem neonatalen Thymus eine Rolle spielt (198-200). In Thymus von CCR7-defizienten Mäusen kommt es zu einer Anreicherung der DN1b-Zellen an der kortiko-medullären Verbindung, da der Mangel an CCR7 die Zellen offenbar daran hindert, in den Kortex einzuwandern, um ihre normale Differenzierung fortzuführen. Ein Hinweis, der eine Beteiligung von CCR7 an der TCDD-induzierten DN1b-Blockade und der damit einhergehenden Emigration dieser Zellen möglich erscheinen lässt, ist die Tatsache, dass in der Promotorregion von CCR7 ein DRE existiert (M. Frericks; persönliche Kommunikation) und die Expression dieses Gens somit potentiell durch TCDD bzw. den aktivierten AhR reguliert werden kann. Es sei jedoch an dieser Stelle erwähnt, dass im Rahmen der Microarray-Analyse der Genexpression von DN-Emigranten zumindest nach 6-

tägiger FTOC keine differentielle CCR7-Expression in Gegenwart von TCDD detektiert werden konnte. Dies schließt jedoch eine TCDD-vermittelte Regulation von CCR7 im Thymus, insbesondere unter DN-Thymozyten, und somit eine Beteiligung an der DN1b-Blockade, nicht aus.

Neben den CCR7-defizienten Mäusen existieren außerdem noch mindestens zwei weitere Maus-Modelle, in denen eine vergrößerte Population von DN1b-Zellen unter den undifferenzierten DN-Thymozyten detektiert werden konnte. Es handelt sich hierbei zum einen um transgene Mäuse, deren T-Zellen kein *c-myb* exprimieren (ebenso wie die TCDD-exponierten DN-Emigranten) aber dafür *Pim1* überexprimieren, und zum anderen um *Gfi1*-defiziente Mäuse (151,157). Da sowohl *c-myb* als auch *Gfi1* notwendig für die β -Selektion sind, kommt es in beiden Mausstämmen zu einer Entwicklungsblockade unreifer DN-Thymozyten, die in der Atrophie des Thymus resultiert, womit auch diese Tiere dem Phänotyp TCDD-behandelter Mäuse in mehrfacher Hinsicht ähneln. Weitere Parallelen bestehen außerdem darin, dass der Thymus von *Gfi1*-defizienten Mäusen infolge einer beschleunigten positiven Selektion einen größeren Anteil an $CD8^+$ -Zellen und eine verminderte Frequenz an DP-Zellen aufweist. Interessanterweise enthielt die $CD44^{\text{stark}}CD25^{\text{int}}$ -Population in *Gfi1*-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen einen erhöhten Anteil an $IL-7R\alpha$ -exprimierenden Zellen, und es ist bekannt, dass $IL-7R\alpha^+$ -DN-Thymozyten im Vergleich mit $IL-7R\alpha^-$ -DN-Thymozyten ein deutlich höheres Potential besitzen, sich zu $TZR\gamma\delta^+$ -Zellen zu entwickeln (201). Untersuchungen im Rahmen einer von M. Frericks durchgeführten Transkriptionsfaktoranalyse ergaben, dass der Promotorbereich des *Gfi1*-Gens ein DRE enthält und somit seine Expression ebenso wie die von CCR7 theoretisch durch TCDD bzw. den aktivierten AhR reguliert werden kann. Tatsächlich konnte in TCDD-exponierten fötalen DN-Emigranten eine deutliche Herabregulation der Expression von *Gfi1* und auch von *c-myb* nachgewiesen werden (192). Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass das DN1b-Stadium eine Quelle für die Generierung DN- $TZR\gamma\delta^+$ -Zellen darstellt und diesen Zellen gleichzeitig die Auswanderung aus dem fötalen Thymus ermöglicht. Phänotypische Parallelen zwischen TCDD-behandelten Thymi und denen aus *Gfi1*-defizienten Mäusen – insbesondere das deutliche Hervortreten der DN1b-Population – sowie die TCDD-vermittelte Herabregulation der *Gfi1*-Expression in DN-Emigranten lassen vermuten, dass eine Verschaltung des AhR- und *Gfi1*-Signalweges vorliegen könnte. *Gfi1*-Expressions- bzw. Aktivitätsanalysen in AhR-

defizienten Mäusen und Mäusen mit einem konstitutiv aktivierten AhR, die vor wenigen Jahren im Labor von L. Poellinger generiert wurden (202), könnten Aufschluss über die Richtigkeit dieser Hypothese geben.

Neben der Anreicherung von DN1b-Zellen im Thymus bewirkt die Exposition mit TCDD eine präferentielle Emigration von Zellen mit diesem Phänotyp, was scheinbar vor allem für die TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen gilt. TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen besitzen ein hohes Emigrationspotential, welches das von TZR $\alpha\beta^+$ -Zellen klar übersteigt, wie in einer Studie an Lämmern veranschaulicht werden konnte (203). Die TCDD-induzierte präferentielle Emigration von TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen mit dem DN1b-Phänotyp könnte möglicherweise auch *in vivo* von Relevanz sein, da im Blut adulter Mäuse, die mit TCB, einem weiteren AhR-Liganden, behandelt worden waren, ein erhöhter Anteil von CD44-exprimierenden TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen detektiert werden konnte (204). Leider wurde die CD25-Expression der TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen in der genannten Arbeit nicht untersucht, so dass basierend auf diesen Ergebnissen ein präziserer Vergleich mit den *in vitro* emigrierenden TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen nicht möglich ist. Die Tatsache, dass neben den offenbar reifen CD44^{stark}CD25^{int} TZR $\gamma\delta$ -exprimierenden Zellen auch scheinbar unreife CD44^{stark}CD25^{int} TZR $\gamma\delta^-$ -Zellen in der Gegenwart von TCDD den fötalen Thymus verlassen, lässt vermuten, dass Zellen mit DN1b-Phänotyp in der FTOC ein hohes Emigrationspotential besitzen.

Eine weitere phänotypische Auffälligkeit der TCDD-exponierten DN-Zellen bestand darin, dass der Großteil dieser Zellen ein Expressionsprofil bestimmter Oberflächenmarker aufwies, das dem von reifen aktivierten T-Zellen nicht nur bezüglich der Expression von CD44 und CD25 ähnelte. Dieser aktivierte Phänotyp, der außerdem durch eine hohe Expression von CD69, sowie eine schwache Expression von CD45RB, CD62L und CD24 charakterisiert ist, konnte vor allem auf den DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen, insbesondere auf den Emigranten detektiert werden. Ein ähnlicher Phänotyp wurde auf TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen, die einen transgenen MHC Klasse-I-restringierten TZR exprimierten, in einem Modell zur Untersuchung der positiven Selektion von TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen nachgewiesen (205). Die Autoren schlossen aus ihren Daten, dass die positive Selektion von TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen mit der Ausprägung eines aktivierten Phänotyps auf diesen Zellen einhergeht. Auch wenn dieses Modell vielleicht artifiziell erscheinen mag, da sich in einer späteren Studie herausstellte, dass sich im Thymus entwickelnde TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen keine positive Selektion für ihre

Reifung benötigen (206), scheint das Auftreten des aktivierten Phänotyps eng mit der Entwicklung von T-Zellen im Thymus verknüpft zu sein, da er auch bei der Reifung von $TZR\alpha\beta^+$ -Zellen bzw. allgemein auf DN-Thymozyten detektiert wurde (207-209). Bendelac et al. folgerten, dass die positive Selektion einen vorübergehenden reversiblen TZR-vermittelten Aktivierungsprozess repräsentiert, der den Zellen wichtige für ihre Reifung benötigte Signale übermittelt.

Es ist bekannt, dass TCDD und verwandte Substanzen die positive Selektion von $CD8^+$ -Zellen stören und in einer MHC Klasse-I-unabhängigen Weise beschleunigen (95,132). Kronenberg et al. schlossen aus diesen Befunden, dass die TCDD- bzw. AhR-vermittelte Regulation bestimmter Gene die durch die Interaktion von MHC und TZR zustandekommenden Signale im Rahmen der T-Zell-Entwicklung ersetzen oder umgehen kann. Möglicherweise findet ein solcher TCDD-induzierter Signalprozess auch in den DN1b-Zellen statt, der begleitet von der Ausbildung des aktivierten Phänotyps zur Entwicklung von DN- $TZR\gamma\delta^+$ -Zellen führt, die daraufhin aus dem Thymus emigrieren. Denkbar ist auch, dass die Zellen mit dem aktivierten Phänotyp in diesem bei der positiven Selektion normalerweise vorübergehenden Zustand festgehalten werden, weil die benötigten Signale zur Beendigung des Aktivierungsprozesses durch TCDD blockiert werden bzw. nicht übermittelt werden können. Eine beschleunigte positive Selektion unreifer DN-Zellen im Thymus könnte neben der bereits weiter oben erwähnten Entwicklungsblockade auch dazu beitragen zu erklären, warum in der Gegenwart von TCDD mit zunehmender Kulturdauer in der FTOC eine fortschreitende dramatische Reduktion von undifferenzierten T-Zell-Vorläufern und damit einhergehend eine Zunahme von differenzierten reiferen Zelltypen wie $TZR\gamma\delta^+$ -Zellen oder NK(T)-Zellen unter den DN-Thymozyten zu beobachten ist.

Die TCDD-vermittelte Regulation der Expression von bestimmten Aktivierungsmarker auf den DN-Zellen steht möglicherweise auch im Zusammenhang mit deren Emigrationspotential. So gilt CD24 sowohl für die Entwicklung von $TZR\gamma\delta^+$ - als auch von $TZR\alpha\beta^+$ -Zellen im Thymus als ein „Reifemarker“. Im Rahmen der Differenzierung der T-Zellen im Thymus kommt es zur Herabregulation von CD24 und es konnte demonstriert werden, dass nur $CD24^-$ - $TZR\gamma\delta^+$ -Thymozyten reif sind und letztendlich die Fähigkeit haben, den Thymus zu verlassen (33). In Übereinstimmung mit diesen Angaben sind die TCDD-behandelten DN- $TZR\gamma\delta^+$ -Emigranten $CD24^-$, während auf

der anderen Seite ein kleiner Teil dieser Zellen aus den Kontroll-Kulturen noch CD24 exprimiert. Es ist jedoch bekannt, dass Emigranten nach dem Verlassen des Thymus in der Peripherie einen funktionalen und phänotypischen Reifungsprozess durchmachen, der unter anderem die Herabregulation von CD24 einschliesst (65). Die phänotypische Heterogenität, die bei den Emigranten bezüglich ihrer Expression an Oberflächenmolekülen auftritt, könnte möglicherweise auch Hinweise auf unterschiedliche Schicksale in der Peripherie liefern. CD62L ist ein sogenannter „Homing-Rezeptor“, der es den entsprechenden Zellen erlaubt, über die Venolen mit hohem Endothel in die peripheren Lymphknoten zu gelangen. Die meisten DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen, die den fötalen Thymus – vor allem in Gegenwart von TCDD – verlassen, sind CD62L $^-$. In der Maus sind TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen mit CD62L $^-$ -Phänotyp vor allem im Darm anzutreffen, wo sie eine Subpopulation der IEL darstellen. Zusätzlich exprimiert der Großteil dieser Zellen genau wie die TCDD-exponierten DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten neben dem Aktivierungsmarker CD69 (210) auch c-kit, und der fötale Thymus ist als Quelle für IEL bekannt. Da bisher jedoch keine Studie über die Einflüsse von TCDD auf die Besiedelung des lymphatischen Darmgewebes durchgeführt wurde, bleibt es Spekulation, dass DN-CD62L $^-$ CD69 $^+$ c-kit $^+$ -TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten zum Darm migrieren, um sich dort zu IEL zu differenzieren.

Der aktivierte Phänotyp, der die DN-Zellen aus den TCDD-FTOCs charakterisiert, kann jedoch auch in einem anderen Zusammenhang gesehen werden. NKT-Zellen sind dafür bekannt, dass sie neben der Ausprägung NK-Zell-spezifischer Marker wie DX5, Ly49, CD94 oder CD16 (211) einen aktivierten Gedächtniszell-artigen Phänotyp aufweisen, der durch Expression von CD44, CD69, CD25, CD122 und einer schwachen oder nicht vorhandenen Expression von CD62L und CD24 charakterisiert ist (43,212,213). Dieser aktivierte Phänotyp konnte auf humanen NKT-Zellen bereits vor der Geburt identifiziert werden. Wie schon erwähnt, bewirkt die Exposition des fötalen Thymus mit TCDD neben der Induktion des aktivierten Phänotyps in DN-Thymozyten und Emigranten auch eine verstärkte Bildung von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen. Mit fortschreitender Kulturdauer kommt es außerdem in der TCDD-FTOC zu einer zunehmenden Anreicherung von TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen unter den DN-Zellen, die besonders unter den Emigranten weit verbreitet sind. Nach 12-tägiger Kultivierung beträgt der Anteil der TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen unter den TCDD-behandelten DN-Emigranten 40% und unter den DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen sogar 56%, während die Frequenz

unter den DN-Emigranten aus den Kontroll-FTOCs nur etwa 14% bzw. 29% bei den DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen erreicht. Da es nicht auszuschliessen war, dass TCDD lediglich die Expression von NK1.1 auf den DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen heraufreguliert und dass es sich deshalb nicht um „echte“ NKT-Zellen handelt, wurden die DN-NK1.1 $^+$ -Zellen aus den TCDD-FTOCs einer detaillierteren phänotypischen Untersuchung unterzogen. Diese Maßnahme war dadurch begründet, dass in der Promotorregion des Genes CD160, einem weiteren Mitglied der NK-Rezeptor-Familie, ein DRE gefunden wurde, so dass die Expression dieses Genes zumindest potentiell durch TCDD bzw. den aktivierten AhR reguliert werden kann. Tatsächlich konnte in den TCDD-behandelten DN-Emigranten eine gesteigerte Expression von CD160 im Vergleich mit unbehandelten DN-Emigranten nachgewiesen werden (192). Die große Mehrheit der TCDD-behandelten DN-NK1.1 $^+$ -Zellen exprimierte gleichzeitig CD122, CD69, CD16/32 sowie den NK-Zell-Marker 2B4. DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen waren zudem deutlich größer und granulärer im Vergleich zu den DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^-$ -Zellen. Diese Daten lassen darauf schliessen, dass es sich bei den unter TCDD-Einfluss verstärkt generierten DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen tatsächlich um echte NKT-Zellen handelt. Für einen funktionellen Test, beispielsweise einen Zytotoxizitätsassay in Gegenwart von NKT-Zell-sensitiven U937-Zellen (214), der diese Vermutung hätte bestätigen können, waren die Zellzahlen der DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen in der FTOC jedoch zu gering, weshalb in der vorliegenden Arbeit nur eine phänotypische Analyse dieser Zellen durchgeführt wurde. Es stellt sich die Frage, auf welche Weise TCDD bzw. der aktivierte AhR die Zunahme der DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NKT-Zellen in der FTOC induziert. Die Entwicklung von NKT-Zellen ist noch nicht im Detail verstanden, insbesondere fehlen Informationen über TZR $\gamma\delta^+$ -NKT-Zellen, was u.a. an ihrer für gewöhnlich niedrigen Frequenz in den verschiedenen Geweben liegen mag. Eine Studie an CD3 ζ -defizienten Mäusen konnte jedoch demonstrieren, dass der Verlust von CD3 ζ zu einer dramatischen Reduktion von TZR $\alpha\beta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen im Thymus dieser Tiere führt, während dafür eine 6-fache Zunahme an TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen zu verzeichnen war (50). Möglicherweise hat die Ausprägung von CD3 ζ eine inhibitorische Wirkung auf die Generierung von TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen, die mit der Herabregulation bzw. Ausschaltung dieses Gens aufgehoben wird. Ob TCDD die Zunahme der DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NK1.1 $^+$ -Zellen in der FTOC über die Herabregulation von CD3 ζ induziert, ist

allerdings vollkommen unklar und müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Es ist denkbar, dass die vermehrte Bildung und Emigration von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -NKT- bzw. TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen i.a. eine Rolle bei der TCDD-induzierten Immunsuppression spielen könnte, da NKT-Zellen und auch TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen häufig mit regulatorischen Fähigkeiten assoziiert sind, die es ihnen erlauben, Immunantworten abzuschwächen oder zu unterbinden. So ist beispielsweise bekannt, dass NKT-Zellen für die Toleranz-Induktion im ACAID-Modell (anterior-chamber associated immune deviation), bei Allo-/Xeno-Transplantaten sowie gegenüber dem Fötus im Mutterleib von Bedeutung sind (215-218) und außerdem an der Herabmodulation schädlicher Immunantworten im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes oder EAE (experimentelle allergische Enzephalomyelitis) beteiligt sind (219,220). Die regulatorischen Funktionen von TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen wurden vor allem durch Studien an TZR $\gamma\delta^+$ -Zell-defizienten Mäusen enthüllt. Diese Tiere zeigten neben der spontanen Entwicklung einer Dermatitis (221) auch pathologisch verstärkte oder beschleunigte Entzündungsreaktionen nach Infektion mit Organismen wie *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis* (37,222). Ähnlich wie NKT-Zellen scheinen auch TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen eine Rolle bei der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes zu spielen, was in Diabetes-sensitiven NOD-Mäusen durch die Generierung einer Population regulatorischer TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen nach intranasaler Inhalation von Proinsulin demonstriert werden konnte, die den Ausbruch der Krankheit unterdrückte (40). Ebenso wurde von verschiedenen Studien die Existenz von DN-Zellen mit suppressiven/regulatorischen Eigenschaften beschrieben, die weder den TZR $\gamma\delta^+$ - noch den NKT-Zellen zuzuordnen sind (148,149,223).

Die möglichen suppressiven Eigenschaften der fötalen DN-Emigranten wurden in Proliferationstests in Ko-Kultur mit aktivierten CD4⁺-T-Zellen untersucht. CD4⁺-T-Zellen sind von entscheidender Bedeutung für die normale Funktion des Immunsystems, da sie sowohl in der Lage sind, humorale Immunantworten über die Aktivierung von B-Zellen zu induzieren, als auch die Aktivierung von Makrophagen zu steuern. CD4⁺-T-Zell-Defizienz (oder Funktionsstörungen), wie sie z.B. bei AIDS-Patienten beobachtet wird, hat für den Patienten fatale Folgen und endet in der

Regel, vor allem infolge von opportunistischen Infektionen sowie Bildung von Neoplasmen, letal (224).

DN-Emigranten, die nach 6-tägiger FTOC mit TCDD oder Lösungsmittel isoliert worden waren, zeigten keinerlei Anzeichen von Proliferation in Anwesenheit von APZ und anti-CD3-Ak. Auch das Hinzufügen von PMA/Ionomycin, welches in CD4⁺-T-Zellen eine starke Proliferation induziert, die unabhängig vom TZR abläuft (225), konnte an diesem nicht-responsiven Zustand der DN-Emigranten nichts ändern. Ko-Kultur von DN-Emigranten – unabhängig davon, ob sie aus TCDD- oder unbehandelten FTOCs isoliert worden waren – und CD4⁺-T-Zellen führte zu einer signifikant verstärkten Proliferation verglichen mit der Proliferation von CD4⁺-T-Zellen alleine, was zunächst im Widerspruch mit möglichen suppressiven Eigenschaften der DN-Emigranten zu stehen schien. Es stellte sich heraus, dass sich die TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen, die sich unter den DN-Emigranten befanden, innerhalb der 90-stündigen Kulturdauer in Gegenwart der aktivierten CD4⁺-T-Zellen ca. 10-11-mal geteilt hatten und deshalb für die verstärkte Gesamtproliferation verantwortlich waren, während DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Emigranten unter den gegebenen Bedingungen keine Teilungsaktivität zeigten. Gleichzeitig hatte die Anwesenheit der DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten eine moderate suppressive Wirkung auf die Proliferation der ko-kultivierten CD4⁺-T-Zellen. Aktivierte CD4⁺-T-Zellen produzieren und sezernieren eine Reihe unterschiedlicher Zytokine, darunter auch IL-2, das in autokriner Weise eine Verstärkung ihrer eigenen Proliferation, aber auch die von anderen aktivierten T-Zellen bewirken kann. Die Proliferation der DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten scheint nicht von der Anwesenheit der aktivierten CD4⁺-T-Zellen per se abhängig zu sein, da exogen zugefügtes IL-2 deren Präsenz überflüssig macht. Diese Ergebnisse erinnern an die Daten einer Studie von Boursalian et al., in der gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von IL-2 die Proliferationsblockade von adulten, funktional noch unreifen CD4⁺-RTEs in Gegenwart von anti-CD3- und CD28-Ak aufheben kann (65). Die Abhängigkeit der Proliferation von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten von IL-2 deutet darauf hin, dass der suppressive Effekt auf die Proliferation der CD4⁺-T-Zellen möglicherweise weniger ein aktiver Mechanismus ist, aber durch die Konkurrenz dieser beiden Zellpopulationen um das verfügbare IL-2 zu erklären ist. Hierbei scheinen die fötalen DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten einen deutlichen Vorteil gegenüber den CD4⁺-T-Zellen zu haben, da sie nach 90-stündiger Inkubationsdauer bis zu 80% aller lebenden Zellen

ausmachen, obwohl zu Beginn der Kultur nur halb so viele von ihnen eingesetzt wurden.

DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten wären nicht die einzigen Zellen, die die Konkurrenz um IL-2 als regulatorischen Mechanismus nutzen, da auch die suppressive Wirkung von CD4⁺CD25⁺-Zellen auf die Proliferation von naiven CD4⁺-T-Zellen zum Teil auf diesem Phänomen beruht (226). Zusätzlich sind CD4⁺CD25⁺-Zellen in der Lage, die normalerweise stattfindende Aufregulation der CD25-Expression in stimulierten CD4⁺-T-Zellen zu unterbinden. Ob dieser Mechanismus bei der Suppression durch die fötalen DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten ebenfalls von Bedeutung ist, bleibt jedoch unklar. Die vorliegenden Daten zeigen, dass fötale DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Emigranten potentiell suppressive Eigenschaften auf die Proliferation syngener aktivierter CD4⁺-T-Zellen haben, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen aus TCDD- oder Kontroll-FTOCs gefunden wurden. Bedenkt man jedoch, dass TCDD die präferentielle Emigration dieser DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen *in vitro* bewirkt, so ist auch eine Beteiligung dieses Mechanismus an der TCDD-vermittelten Immunsuppression vorstellbar.

Um die *in vivo*-Relevanz dieser Befunde zu überprüfen, wurden schwangere Mäuse mit TCDD behandelt und Thymus, Blut und Milz der neugeborenen Tiere bezüglich ihres Gehaltes an DN-TZR $\gamma\delta^+$ - bzw. DN1b-Zellen untersucht. Unter den DN-Thymozyten war nur eine sehr kleine Population von DN1b-Zellen auszumachen, die einen Anteil von weniger als 3% hatte und statt der in der FTOC nachgewiesenen Zunahme dieser Zellen war ihre Frequenz in TCDD-exponierten Tieren eher vermindert. In Blut und Milz der neugeborenen Mäuse konnte neben den Lymphozyten auch eine vor allem in der Milz sehr auffällige Population von großen granulären Zellen detektiert werden, bei der es sich wahrscheinlich im wesentlichen um Granulozyten handelte. Unter den CD4⁻CD8⁻-Lymphozyten konnten weder in Öl- noch in TCDD-behandelten Mäusen eine DN1b-Population gefunden werden. Interessanterweise bewirkte die Exposition mit TCDD eine deutliche Verringerung des Anteils CD25-exprimierender Lymphozyten, ein Effekt, der in der Milz stärker ausgeprägt war als im Blut. Analog hierzu konnte die Herabregulation von CD25 auch auf der Granulozyten-Population detektiert werden. Auch wenn diese Ergebnisse nicht den Resultaten aus den FTOCs entsprechen, so deuten sie doch beide gemeinsam an, dass TCDD den IL-2-Stoffwechsel einschließlich der

Expression von CD25 auf Lymphozyten bzw. T-Zellen beeinflusst. Diese Annahme wird durch die Erkenntnisse gestützt, dass die Promotorregion des IL-2-Gens drei DRE enthält, und dass die Expression von IL-2 in fötalen Thymozyten durch Exposition mit TCDD induziert werden kann, sowie in Milzzellen durch TCDD in Gegenwart von anti-CD3-Ak (118). Zudem konnte in TCDD-behandelten fötalen DN-Emigranten eine verstärkte Expression von SOCS 2 nachgewiesen werden, einem Gen, dessen abgeleitetes Protein die Signalwirkung von IL-2 verstärken kann (160) und dessen Expression auch in B-Zelllinien infolge einer Exposition mit TCDD induziert werden konnte (159). Man könnte den TCDD-induzierten DN1b-Entwicklungsblock in der FTOC auch als eine Suppression der CD25-Aufregulation in den DN-Thymozyten interpretieren. DN1b-Zellen zeigen nur eine intermediäre CD25-Expression, während DN2- und DN3-Zellen CD25^{stark} sind und unter den TCDD-behandelten DN-TZR $\gamma\delta^-$ -Thymozyten nur einen geringen Anteil ausmachen. Insofern könnte dieses Ergebnis die Befunde in den neugeborenen Mäusen widerspiegeln, da TCDD möglicherweise nicht nur im Thymus, sondern auch in den peripheren Milz- und Blutzellen die Expression von CD25 unterdrückt. Ein solcher Mechanismus könnte im betroffenen Organismus weitreichende Konsequenzen für die Generierung von Immunantworten und die Bekämpfung von Pathogenen haben, da die IL-2-induzierte Expansion antigenspezifischer T-Zellen von der Expression von CD25 als Bestandteil des hochaffinen IL-2-Rezeptors abhängig ist. Dementsprechend würde die TCDD-vermittelte Blockade der CD25-Aufregulation infolge der verminderten Proliferation bzw. biologischen Aktivität antigenspezifischer T-Zellen und anderer IL-2-sensitiver Immunzellen wie B- und NK-Zellen zu einer Immunsuppression führen. Es ist leicht vorstellbar, dass ein solcher Mechanismus speziell in neugeborenen Mäusen, die zuvor durch das mütterliche Immunsystem geschützt wurden und sich nun selbst gegen mögliche Infektionen durch eine Vielzahl von Pathogenen verteidigen müssen, fatale Folgen haben kann. Hierdurch könnte möglicherweise auch erklärt werden, warum viele TCDD-exponierte Jungtiere innerhalb der ersten zwei Lebensstage starben, obwohl zuvor im Vergleich mit den Kontrolltieren keine phänotypischen oder verhaltensmäßigen Anomalien festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Blockade der CD25-Aufregulation unter den Zellen des Thymus und in der Peripherie einen möglicherweise bedeutenden Mechanismus, der an der TCDD-vermittelten Immunsuppression beteiligt ist, repräsentieren könnte. Auf der anderen Seite liess

sich die in den FTOC-Experimenten detektierte TCDD-induzierte Anreicherung von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Thymozyten im Thymus von neugeborenen Mäusen nicht nachweisen. Vielmehr bewirkte die Behandlung mit TCDD eine Verminderung des Anteils der TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen unter den DN-Thymozyten. Auch Hinweise auf eine verstärkte Emigration dieser Zellen konnten zumindest bei der Untersuchung von Milz und Blut der Tiere nicht gefunden werden, da der Anteil an TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen unter den CD4⁻CD8⁻-Lymphozyten in der Milz in der Gegenwart von TCDD eher verringert war, während diese Zellen unter den CD4⁻CD8⁻-Blut-Lymphozyten überhaupt nicht nachweisbar waren. TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen werden im fötalen Thymus in distinkten Wellen generiert, wobei sich die einzelnen Wellen durch die Expression bestimmter V γ -TZR-Gensegmente unterscheiden lassen und jeweils verschiedene Gewebe in der Peripherie wie Haut oder Intestinaltrakt besiedeln (siehe Ref. 31 für eine Übersicht). Es ist nicht auszuschließen, dass die TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen, die präferentiell aus dem TCDD-belasteten Thymus *in vitro* emigrieren, nur einer ganz bestimmten Welle angehören. Möglicherweise haben diese Zellen in den neugeborenen Mäusen infolge der TCDD-Exposition bereits vorzeitig den Thymus verlassen (z.B. aufgrund beschleunigter Reifung), so dass dieser Emigrationseffekt – sofern er auch *in vivo* vorhanden ist – im in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zeitrahmen nicht detektiert werden kann. Es soll jedoch betont werden, dass es sich hierbei nur um Spekulation handelt. Weiterführende Experimente, einschließlich der Analyse der Rekombination der TZR γ - und TZR δ -Gensegmente, müssen klären, ob die TCDD-vermittelte präferentielle Emigration von DN-TZR $\gamma\delta^+$ -Zellen auf eine bestimmte Welle beschränkt ist und in welchen Geweben sich diese Zellen ansiedeln könnten.

Mechanistische Aspekte der TCDD-vermittelten Immunsuppression in An- und Abwesenheit des Thymus am Beispiel der CHS-Reaktion

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse der FTOC-Experimente deuten zwar an, dass der fötale Thymus möglicherweise aufgrund einer präferentiellen Emigration DN-TZR $\gamma\delta^+$ -(NKT)-Zellen eine Rolle bei der TCDD-vermittelten Immunsuppression spielen könnte, aber diese Vermutung liess sich durch die Untersuchung von *in utero* mit TCDD behandelten neugeborenen Mäusen nicht bestätigen. Um klarere Hinweise, die für oder gegen eine mögliche Beteiligung des Thymus an der TCDD-

induzierten Immunsuppression sprechen, zu erhalten, wurde die TCDD-vermittelte Suppression der CHS-Reaktion in adulten euthymischen und ATX-Mäusen untersucht. Diese Immunantwort, die zu den allergischen Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ gehört, wurde durch Applikation des sensibilisierenden Haptens DNFB auf Rücken- und Ohrhaut induziert und mittels der resultierenden Ohrschwellung bzw. Zunahme der Zellularität im drainierenden aurikulären LN gemessen. Zwar deuteten die Resultate von zwei älteren Studien darauf hin, dass die durch TCDD bzw. 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlordibenzo-*p*-dioxin vermittelte Immunsuppression unabhängig vom Thymus erfolgt (100,186), doch im Rahmen dieser Arbeiten wurde die humorale Immunantwort gegen SRBCs in der Milz untersucht, die nur indirekt von T-Zellen bzw. dem Thymus in Form der T_H2-Zell-vermittelten Aktivierung der antigenspezifischen B-Zellen abhängt. Die CHS-Reaktion beruht dagegen auf der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen, und sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen können direkt als Effektorzellen bei dieser inflammatorischen Hautreaktion fungieren (siehe Ref. 169 für eine Übersicht). Deshalb scheint eine solche Immunreaktion geeignet, um die potentielle Thymusabhängigkeit der TCDD-vermittelten Immunsuppression untersuchen zu können.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass TCDD die CHS-Reaktion unabhängig von der Präsenz des Thymus supprimieren kann. Diese Suppression hatte sowohl in euthymischen als auch in ATX-Mäusen in etwa das gleiche Ausmaß und induzierte eine 30-40% Reduktion der Ohrschwellung. Darüber hinaus führte jedoch auch die Entfernung des Thymus als solche unabhängig von der Gegenwart von TCDD zu einer Suppression dieser Immunantwort. Exposition mit TCDD verstärkte den suppressiven Effekt jedoch noch zusätzlich. Diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen die Daten einer Studie von Erard et al., in der zum ersten mal gezeigt werden konnte, dass in ATX-Mäusen im Vergleich zu euthymischen Mäusen nur eine abgeschwächte CHS-Reaktion gegen DNFB induzierbar war (227). Neben der Messung der Ohrschwellung erwies sich auch die Bestimmung der Zellularität des drainierenden LN als geeigneter Parameter für die Untersuchung der TCDD-vermittelten Immunsuppression. Die Tatsache, dass sich bei Messung der Ohrschwellung im Gegensatz zur LN-Zellularität ein signifikanter Unterschied zwischen TCDD-behandelten euthymischen und ATX-Mäusen sowie zwischen Öl- und TCDD-exponierten ATX-Mäusen feststellen liess, zeigt, dass die Ohrschwellung allerdings ein sensitiverer Parameter bei der Analyse

der Immunsuppression ist. Trotzdem induzierte die TCDD-Exposition sowohl bei euthymischen als auch bei ATX-Mäusen eine signifikante Reduktion der Ohrschwellung und der Zellularität im drainierenden LN im Vergleich mit Öl-behandelten euthymischen Tieren.

Um den Mechanismus der TCDD-induzierten Suppression der CHS-Reaktion im Detail zu verstehen, wurden die drainierenden LN der verschiedenen Behandlungsgruppen bezüglich ihres Gehaltes an T- und B-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde der Aktivierungsstatus dieser Zellen analysiert. Die Behandlung mit TCDD bewirkte eine signifikante Verminderung an aktivierten $CD4^+$ -, $CD8^+$ - und B-Zellen in euthymischen Mäusen. Obwohl die CHS-Reaktion bekanntermaßen primär zellvermittelt ist und aktivierte T-Zellen (insbesondere zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen) als Effektorzellen gelten (siehe Ref. 169 für eine Übersicht), machten B-Zellen den Hauptanteil der lebenden Zellen in den drainierenden LN aller DNFB-sensibilisierten Maus-Gruppen aus. Dieser scheinbare Widerspruch bestätigt die Befunde anderer Studien, die ebenfalls nach Exposition mit einer Reihe unterschiedlicher Allergene im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen eine starke Zunahme an B-Zellen in den drainierenden LN von Mäusen detektieren konnten (228-230). Exposition mit TCDD bewirkte eine leichte Suppression der B-Zell-Proliferation in sensibilisierten Tieren. Unklar bleibt allerdings, ob diese Suppression durch direkte Effekte auf die B-Zellen zustandekommt oder indirekt durch Beeinträchtigung der DZs (siehe unten), die B-Zellen durch direkte Interaktion (231,232) oder über die Aktivierung von $CD4^+$ -T-Zellen, die unter TCDD-Einwirkung ebenfalls reduziert waren, beeinflussen können. Im Gegensatz zu den übrigen analysierten Zellpopulationen befand sich der Großteil der proliferierenden B-Zellen im LN 24 h nach Antigenexposition bereits in der G_2 -Phase bzw. Mitose, was darauf hindeutet, dass sich diese Zellen im Verlauf der CHS-Reaktion schneller teilen. Ein TCDD-vermittelter suppressiver Effekt auf die Proliferation von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen konnte dagegen nicht detektiert werden, aber interessanterweise war der Anteil proliferierender T-Zellen in ATX-Mäusen größer als in den entsprechenden euthymischen Kontroll-Gruppen. Dieser Effekt spiegelt möglicherweise die Tatsache wider, dass ATX-Mäuse im Vergleich mit euthymischen Tieren eine höhere Frequenz an T-Gedächtnis-Zellen besitzen (60), die sich schneller und effizienter an einer Immunantwort beteiligen können als naive T-Zellen.

Bedenkt man, dass der Anteil der proliferierenden T- und B-Zellen im drainierenden LN relativ gering ist (ca. 2-8%) und dass ein vollständiger Zellzyklus einer proliferierenden somatischen Eukaryontenzelle gewöhnlich 18-24 h dauert (233), so lässt sich daraus schließen, dass die Zunahme der Zellularität im LN innerhalb von 24 h nach dem zweiten Antigenkontakt nicht in erster Linie auf die Proliferation dieser Zellen zurückgeführt werden kann. Vielmehr ist wahrscheinlich, dass die meisten Zellen, die letztendlich die LN- und Haut-Schwellung während der CHS-Reaktion induzieren, aus der Peripherie in den drainierenden LN geleitet werden und nicht antigenspezifisch sind. Trotzdem besitzt ein bedeutender Anteil der T- und B-Zellen im LN einen aktivierten Phänotyp (CD69⁺) und ist deshalb möglicherweise am Ablauf der Immunantwort beteiligt.

Die Immigration von RTEs scheint nur von untergeordneter Bedeutung für die Schwellung des LN zu sein, da diese Zellen weniger als 1% der Gesamtzellularität ausmachten. Eine präferentielle Emigration DN-Zellen, wie sie zuvor in der FTOC oder in adulten Mäusen unter TCDD-Einfluss beobachtet wurde (99), konnte hier nicht festgestellt werden. Dies mag zum einen daran liegen, dass in der vorliegenden Arbeit die Emigranten 11 Tage nach TCDD-Injektion analysiert wurden (Ref. 99: 6 Tage) und zum anderen, dass in den hier untersuchten Mäusen eine Immunreaktion ausgelöst wurde, die möglicherweise einen Einfluss auf die Emigration ausübt (Ref. 99: naive Mäuse). Interessanterweise war der ETO für den drainierenden LN in Gegenwart von TCDD im Vergleich zu Öl-behandelten Mäusen verdreifacht. Dies deutet auf einen regulatorischen Mechanismus hin, der die Menge an RTEs konstant hält und somit die TCDD-induzierte Thymusatrophie kompensieren kann. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate von Berzins et al., die mit Hilfe von Thymus-Transplantationsexperimenten eine konstante T-Zell-Exportrate in Mäusen nachweisen konnten, die mehr oder weniger unabhängig von der Anzahl und Größe der Thymuslappen zu sein schien (187). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die Emigration durch einen effizienten homöostatischen Regulationsmechanismus konstant gehalten wird.

Die während der CHS-Reaktion beobachtete Reduktion der aktivierten T- und B-Zellen im drainierenden LN wurden von einer starken Reduktion der DZ-Zellzahl im aurikulären LN begleitet, die gegenüber der Öl-behandelten Kontroll-Gruppe um 70% vermindert war. DZs sind hoch-spezialisierte Zellen, die die einzigartige Eigenschaft

besitzen, naive $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen zu aktivieren und auf diese Weise antigenspezifische adaptive Immunantworten zu initiieren (234-236). Erst kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass dermale DZs – und nicht wie zuvor angenommen epidermale Langerhans-Zellen – von entscheidender Bedeutung für die Induktion der CHS-Reaktion sind (237). Während der CHS-Reaktion gegen ein Hapten wie DNFB nehmen DZs Hapten-modifizierte Proteine auf, prozessieren diese und migrieren zu den drainierenden LN, wo sie passierenden $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen einzelne Peptide der Proteine präsentieren. Antigen-spezifische T-Zellen werden aktiviert, verlassen den LN und wandern über die Blutgefäße in die Antigen-exponierten Hautregionen, um sich an der Beseitigung des Antigens zu beteiligen. Es ist naheliegend, dass die Reduktion der DZs im drainierenden LN ein wichtiger Mechanismus sein könnte, der die Verminderung der aktivierten Zellen im LN – neben den direkten Effekten, die TCDD auf diese Zellen ausüben mag – erklären könnte, da bekannt ist, dass eine Zunahme von DZs das Ausmaß $CD4^+$ -Zell- und humoral vermittelter Immunantworten dramatisch verstärken kann (238). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Daten von Shepherd et al. sowie Vorderstrasse und Kerkvliet, die eine signifikante Reduktion von DZs drei bis fünf Tage nach TCDD-Exposition in der Milz von naiven oder Antigen-behandelten Mäusen demonstrieren konnten (108,109).

Überraschenderweise war die Zunahme an DZs im drainierenden LN infolge der zuvor erfolgten Sensibilisierung mit DNFB – genau wie bei TCDD-exponierten euthymischen Mäusen – auch in Öl-behandelten ATX-Mäusen supprimiert. Dieser Befund deutet darauf hin, dass der Thymus eine Rolle bei der Migration von DZs in den drainierenden LN während der CHS-Reaktion spielt, auch wenn sich der zugrundeliegende Mechanismus von dem unterscheiden mag, der für die TCDD-induzierte DZ-Reduktion verantwortlich ist. Unklar bleibt allerdings, ob dieser Effekt direkt durch den Thymus verursacht wird, z.B. durch Sezernierung eines löslichen Faktors, oder indirekt durch emigrierte T-Zellen bzw. B-Zellen, die durch letztere aktiviert wurden. Es existieren Hinweise für die Richtigkeit beider Szenarien. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass aktivierte B-Zellen in der Lage sind, eine Subpopulation Antigen-beladener DZs in die B-Zell-Follikel der Milz zu dirigieren (239). Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, enthielten die drainierenden LN TCDD-exponierter euthymischer Mäuse eine reduzierte Menge aktivierter B-Zellen, ein Umstand, der also durchaus einen Einfluss auf die Anzahl der während der CHS-

Reaktion in den LN geleiteten bzw. migrierten DZs haben könnte. Auf der anderen Seite konnten Erard et al. demonstrieren, dass die Injektion eines zirkulierenden thymischen Faktors (FTS, Thymulin) die normalerweise supprimierte CHS-Antwort in ATX-Mäusen wiederherstellen kann (227). Obwohl bisher vorliegende Studien lediglich eine direkte Wirkung von Thymulin auf NK-Zellen und T-Zellen demonstrieren konnten (240,241), kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Faktor einen direkten oder indirekten Effekt auf DZs ausübt und dadurch dazu beitragen könnte, dass eine normale Immunantwort wieder stattfinden kann. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse an, dass die Reduktion der DZs im drainierenden LN ein wichtiger Grund für die TCDD-vermittelte Suppression der CHS-Reaktion, aber auch anderer Immunreaktionen sein könnte und, dass die Migration bzw. das Erreichen der drainierenden LN durch die DZs teilweise durch den Thymus beeinflusst wird.

Es erscheint plausibel, dass die verringerte DZ-Zellzahl im LN ein wichtiger Grund für die Reduktion aktivierter T- und B-Zellen ist, aber dennoch soll an dieser Stelle betont werden, dass dadurch zusätzliche direkte TCDD-vermittelte Effekte auf T- und B-Zellen nicht ausgeschlossen sind. Neben den DZs haben auch aktivierte B-Zellen die Fähigkeit, als antigenpräsentierende Zellen zu fungieren und antigenspezifische B-Zellen sind darüber hinaus von essentieller Bedeutung für die Expansion von T-Zellen im drainierenden LN während einer Immunreaktion (242). Außerdem konnten Tsuji und Mitarbeiter demonstrieren, dass zumindest B-1-Zellen notwendig für die Induktion der CHS-Reaktion sind (243). Diese Befunde lassen vermuten, dass neben der Reduktion der DZs auch die Verminderung aktivierter B-Zellen in den drainierenden LN von TCDD-exponierten Mäusen noch zusätzlich die Suppression der CHS-Reaktion verstärken könnte. Die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und MHC Klasse II auf B-Zellen im drainierenden LN wurde jedoch durch TCDD nicht verringert (Daten nicht gezeigt).

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise die Reduktion der DZs in den drainierenden LN von TCDD-behandelten Mäusen während der CHS-Reaktion zustande kommt. Eine Möglichkeit bestünde darin, dass TCDD in den DZs verstärkt Apoptose induziert. Dieser Mechanismus gehört zum Spektrum der toxischen Effekte von TCDD und konnte in zahlreichen verschiedenen Zellen bzw. Geweben nachgewiesen werden (180-184). Es ist von entscheidender Bedeutung für den Verlauf einer normalen Immunantwort, dass DZs, nachdem sie aktiviert wurden,

darauf programmiert werden, durch Apoptose zu sterben (76), damit das Ausmaß der Immunreaktion begrenzt wird und mögliche daraus resultierende Schäden für den Organismus vermieden werden. 33-55% der DZs im drainierenden LN zeigten Anzeichen von Apoptose, aber eine Zunahme infolge von TCDD-Exposition konnte nicht festgestellt werden, ebenso wenig wie bei ATX-Mäusen. Diese Daten zeigen, dass eine gesteigerte Apoptose der DZs im drainierenden LN scheinbar nicht an der TCDD-induzierten Reduktion dieser Zellen beteiligt ist, wobei hierdurch eine mögliche direkt an der Antigen-Expositionsstelle in der Haut induzierte Apoptose allerdings nicht ausgeschlossen werden kann. Diese Möglichkeit könnte durch eine Apoptose-Analyse von histologischen Hautschnitten (z.B. mit dem TUNEL-Assay) in den entsprechend behandelten Mäusen untersucht werden.

Als weiterer, zumindest theoretisch möglicher Mechanismus, käme eine durch TCDD verursachte verminderte Proliferation der DZs in Frage, obwohl sie nach Verlassen des Knochenmarkes i.a. als nicht proliferierende Zellen gelten. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten deuten jedoch sehr wohl darauf hin, dass DZs im drainierenden LN nach dem Kontakt mit Antigen die Kapazität haben, Zellteilungen durchzuführen. 16-25% der DZs, die in den drainierenden LN der verschiedenen Maus-Gruppen detektiert wurden, zeigten Anzeichen von Proliferation, wobei dieser Anteil in den zuvor mit DNFB sensibilisierten Tieren jeweils höher war als in den entsprechenden Kontrollen. Betrachtet man die totale Frequenz von proliferierenden DZs in TCDD-behandelten Mäusen, so lässt sich kein Unterschied im Vergleich mit den Öl-injizierten Kontroll-Tieren feststellen. Allerdings ist der Anteil der DZs, die sich bereits in der G₂-Phase/Mitose befinden, in den TCDD-exponierten Tieren zugunsten eines höheren Anteils dieser Zellen in der S-Phase verringert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TCDD die Proliferation von DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion verlangsamt aber nicht verringert, so dass diesem Mechanismus offenbar keine bedeutende Rolle bei der Erklärung für die TCDD-vermittelte Reduktion der DZs zukommt.

Ein weiterer Mechanismus, der die TCDD-vermittelte Reduktion der DZ-Zellzahl im drainierenden LN während der CHS-Reaktion erklären könnte, wäre eine Beeinträchtigung der Migration, die verhindert, dass die DZs von der Antigen-Expositionsstelle aus den LN erreichen. Für eine derartige Untersuchung steht ein seit Jahren etablierter ebenfalls auf der CHS-Reaktion beruhender DZ-

Migrationsassay zur Verfügung, bei dem die Haut des Versuchstieres durch Applikation von FITC sensibilisiert wird und die Antigen-beladenen DZs zeitversetzt im drainierenden LN als FITC⁺-Zellen nachgewiesen werden können (185). Wie sich im Experiment herausstellte, führte die Exposition mit TCDD im drainierenden LN zu einer deutlichen Reduktion der Antigen-beladenen DZs, deren absolute Zahl nur 15% von der Menge im LN der Kontroll-Tieren erreichte. Auffällig war darüber hinaus, dass 24 h nach Antigenkontakt ein Großteil (ca. 75%) der FITC⁺-DZs in den LN TCDD-behandelter Mäuse nur geringe Mengen an FITC-Molekülen gebunden hatte (FITC^{schwach}), ein Effekt, der in deutlich abgeschwächter Form auch nach 16 h in den sensibilisierten Tieren beobachtet werden konnte. Dagegen war zu diesem Zeitpunkt bei den Öl-behandelten Tieren ein ungefähr ausgeglichenes Verhältnis zwischen FITC^{schwach}- und FITC^{stark}-DZs zu erkennen, die jeweils ca. 50% ausmachten. Bereits 1987 konnten Macatonia et al. in den drainierenden LN ebenfalls eine FITC^{schwach}- und eine FITC^{stark}-Population von DZs nach FITC-Applikation auf die Haut identifizieren (185). Weiterführende Experimente in derselben Studie veranschaulichten, dass nur FITC^{stark}-DZs die Kapazität hatten, effizient die Proliferation von T-Zellen zu induzieren, während FITC^{schwach}-DZs auch nur schwache stimulatorische Eigenschaften besaßen. Die TCDD-vermittelte Reduktion von FITC^{stark}-DZs erinnert an die Resultate von Woods et al., die zeigen konnten, dass die topische Behandlung von Mäusen mit dem Karzinogen 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen (DMBA) dazu führte, dass nach erfolgter Applikation von FITC auf die Haut in den drainierenden LN fast nur noch FITC^{schwach}-DZs detektiert werden konnten, die zudem in Proliferationstests kaum in der Lage waren, T-Zellen zu stimulieren (244). Die Autoren erklären dieses Phänomen durch eine DMBA-vermittelte Blockade der Antigen-Akkumulation in den DZs. Auch für das TCDD-Modell ist ein solcher Mechanismus bzw. eine verminderte Phagozytose-Kapazität der DZs als Ursache für das verstärkte Auftreten von FITC^{schwach}-DZs im drainierenden LN denkbar, auch wenn die Daten von Vorderstrasse et al., die in einer *in vivo*-Untersuchung zeigen konnten, dass TCDD in DZs aus der Milz keinen Einfluss auf die Fähigkeit ausübt, Latex-Beads zu phagozytieren, gegen diese Vermutung sprechen (111). Denkbar wäre auch eine TCDD-vermittelte Herabregulation der Antigen-präsentierenden MHC Klasse II-Moleküle auf den DZs, ein Effekt der auch von Shepherd et al. für aus der Milz von TCDD-behandelten Mäusen stammende DZs beschrieben wurde (109). Durchflusszytometrische Analysen der DZs in den drainierenden LN zeigten jedoch,

dass ein solcher Mechanismus scheinbar keine Rolle für das Auftreten der FITC^{schwach}-DZs in TCDD-exponierten Mäusen während der CHS-Reaktion spielt, da keine signifikanten Unterschiede für die Expression von MHC Klasse II-Molekülen im Vergleich mit den Kontroll-Tieren detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Neben den bisher genannten Ansätzen zur Erklärung der Reduktion von FITC^{stark}-DZs ist außerdem eine TCDD-vermittelte Beeinträchtigung der Antigenprozessierung bzw. -präsentation in den DZs vorstellbar, allerdings fehlen derzeit Hinweise in der Literatur, die eine solche Hypothese stützen könnten.

Ein weiterer Effekt von TCDD, der möglicherweise mit dem gerade geschilderten Phänomen in Zusammenhang steht, ist die Tatsache, dass der Anteil an DZs im drainierenden LN, die FITC gebunden haben, zumindest 16 h nach FITC-Applikation gegenüber den Kontroll-Tieren deutlich erniedrigt ist. So beträgt der Anteil an FITC⁺-DZs an der Gesamtheit der DZs in sensibilisierten TCDD-behandelten Mäusen etwa 20%, in Öl-behandelten Tieren aber mehr als 60%. Nach 24 h nimmt die Frequenz der FITC⁺-DZs bei den TCDD-exponierten Mäusen jedoch deutlich zu und der Unterschied zu den Kontroll-Tieren fällt wesentlich schwächer aus. Diese Befunde deuten darauf hin, dass TCDD die Migration der DZs von der Antigenexpositionsstelle in der Haut zum drainierenden LN bzw. den Reifungsprozess mit den damit einhergehenden physiologischen/phänotypischen Veränderungen, die die Migration ermöglichen, verlangsamt.

Antigen-beladene DZs präsentieren Antigen in Form von Peptid/MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche, die von den TZRn antigenspezifischer T-Zellen erkannt werden können. Die Fähigkeit von DZs, naive T-Zellen aktivieren zu können, hängt zusätzlich von ihrem Expressionsgrad ko-stimulatorischer Moleküle ab, die mit den entsprechenden Rezeptoren auf den T-Zellen interagieren können und auf diese Weise ein für die Aktivierung essentielles Signal übermitteln. Das Ausbleiben eines ko-stimulatorischen Signales kann in den T-Zellen die sogenannte Anergie induzieren, einen nicht-responsiven Zustand, der sie refraktär für weitere Aktivierungsversuche macht. Zwei wichtige ko-stimulatorische Moleküle, die von DZs, aber auch von aktivierten B-Zellen und Makrophagen exprimiert werden, sind CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2). Die Bedeutung dieser Moleküle, die auf T-Zellen vor allem mit dem Liganden CD28 in Wechselwirkung treten, konnte mit Hilfe von CD80- bzw. CD86-defizienten Mäusen verdeutlicht werden, deren Immunantworten nur in

deutlich abgeschwächter Form ablaufen (245,246). Während der CHS-Reaktion induzierte TCDD in euthymischen Mäusen die Herabregulation von CD80 und CD86 auf den DZs in den drainierenden LN. Die Reduktion konnte abgeschwächt werden, wenn die Tiere zuvor mit DNFB sensibilisiert worden waren, was möglicherweise auf einen Einfluss der antigenvermittelten Signalstärke bei diesem Phänomen zurückzuführen ist. Diese Resultate stimmen mit denen von Shepherd et al. überein, die zeigen konnten, dass TCDD in euthymischen Mäusen, die mit P815-Tumorzellen injiziert worden waren, die Herabregulation von CD86 und MHC Klasse II-Molekülen auf DZs in der Milz herbeiführt (109). Paradoxe Weise berichteten Vorderstrasse et al. in einer später durchgeführten Studie, dass TCDD im gleichen Modell eine Aufregulation von MHC Klasse II-Molekülen auf DZs bewirkt (111). Hinweise aus anderen Studien auf einen möglichen zugrundeliegenden molekularen Mechanismus lassen eher eine Herabregulation ko-stimulatorischer Moleküle auf DZs plausibel erscheinen, was auf die gegenseitige Unterdrückung der AhR- und NF κ B-vermittelten Signaltransduktion zurückzuführen ist (247). Es ist bekannt, dass NF κ B für Prozesse wie die Differenzierung und Reifung von DZs, einschließlich der Aufregulation ko-stimulatorischer Moleküle, von essentieller Bedeutung ist (248). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Exposition mit TCDD die Aktivierung von NF κ B in einer DZ-Zelllinie unterdrücken kann (249).

Überraschenderweise war die TCDD-induzierte Herabregulation von CD80 und CD86 auf DZs von ATX-Mäusen in nicht sensibilisierten Tieren abgeschwächt und in DNFB-sensibilisierten Tieren überhaupt nicht vorhanden, was wiederum auf einen Einfluss des Thymus auf die DZ-Physiologie hindeutet. Dieser Befund impliziert, dass TCDD die Herabregulation von CD80 und CD86 auf DZs teilweise über seine Effekte auf den Thymus bewirkt, obwohl offen bleibt, welche Prozesse (z.B. veränderte Emigration oder Sezernierung eines löslichen Faktors) hier eine Rolle spielen. Wie aus den Ergebnissen der DZ-Migrationsassays in euthymischen Mäusen hervorgeht, zeigt sich, dass die TCDD-vermittelte Herabregulation von CD80 bei der FITC-induzierten CHS-Reaktion im Vergleich mit der DNFB-induzierten ungefähr das gleiche Ausmaß hat. Diese Experimente konnten darüber hinaus noch demonstrieren, dass die Herabregulation von CD80 nicht nur auf die Antigen-beladenen (FITC⁺-) DZs beschränkt war, sondern auch die gleiche Wirkung auf FITC⁻-DZs hatte (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die relative TCDD-induzierte Herabregulation ko-stimulatorischer Moleküle auf DZs

unabhängig von deren Aktivierung durch Antigen erfolgt. Es ist allerdings schwer einzuschätzen, inwieweit die Herabregulation der ko-stimulatorischen Moleküle auf DZs zu der Suppression der CHS-Reaktion durch TCDD beiträgt, aber trotzdem könnte diesem Mechanismus eine Bedeutung für die Erklärung dieses Phänomens zukommen. Interessanterweise wurde in den drainierenden LN von DMBA-behandelten Mäusen, denen FITC auf die Haut appliziert wurde, neben dem bereits zuvor erwähnten stark reduzierten Anteil an FITC^{stark}-DZs, auch – analog zur Wirkungsweise von TCDD – eine abgeschwächte Expression von CD80 und CD86 auf den DZs detektiert, welche außerdem nur eine schwache Proliferation bei ko-kultivierten T-Zellen induzieren (244). Leider wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht, ob die Behandlung mit DMBA zu einer Reduktion der Gesamtzahl der DZs im drainierenden LN führt. Dennoch lassen diese offenkundigen Parallelen vermuten, dass sowohl die Effekte von TCDD als auch von DMBA über denselben molekularen Mechanismus, die Aktivierung des AhR, bewirkt werden könnten. Neben den HAKs, zu denen auch TCDD gehört, existieren eine Vielzahl anderer Stoffklassen, die Substanzen enthalten, welche als AhR-Ligand fungieren können (siehe Ref. 250 für eine Übersicht). Zu diesen zählt auch die Familie der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs), in der neben Benz(a)pyren und 3-Methylcholanthren auch Benzanthrazen, die unsubstituierte Ausgangssubstanz von DMBA, als AhR-Ligand mit hoher Affinität identifiziert wurde. Diese Übereinstimmungen in der Wirkungsweise bei TCDD und DMBA deuten darauf hin, dass die gefundenen Effekte auf die Physiologie der DZs wie die Reduktion von FITC^{stark}-DZs im drainierenden LN während der CHS-Reaktion oder die Herabregulation der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in Abhängigkeit von der Signaltransduktion über den AhR erfolgen. Diese Vermutung könnte leicht durch Wiederholung der durchgeführten Experimente mit AhR-defizienten Mäusen bestätigt werden.

Die im Rahmen dieser Serie von Experimenten gewonnenen Daten veranschaulichen, dass TCDD verhindert, dass Antigen-beladene DZs während der CHS-Reaktion von der Antigenexpositionsstelle in der Haut aus den drainierenden LN erreichen und zeigen damit einen Mechanismus auf, der von großer Relevanz für die Erklärung der TCDD-vermittelten Immunsuppression – nicht nur im CHS-Modell – sein könnte. Dieser Mechanismus hilft auch dabei, die scheinbaren Widersprüche aus früheren Studien, die sich mit dem Thema “TCDD-induzierte Immunsuppression”

befassten, aufzuklären. So fanden Vorderstrasse et al. in zwei voneinander unabhängigen Studien heraus, dass DZs, die aus TCDD-behandelten Mäusen isoliert worden waren, *in vitro* bei ko-kultivierten T-Zellen entweder eine normale oder sogar im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen erhöhte Proliferation induzierten (108,111). Auf der anderen Seite konnten bisher keine direkten TCDD-vermittelten *in vitro*-Effekte auf T-Zellen nachgewiesen werden, obwohl die Resultate zahlreicher Studien eindeutig belegen, dass die Funktion von T-Zellen *in vivo* durch TCDD-Exposition beeinträchtigt ist (104-107). Außerdem wird durch den genannten Mechanismus auch der Befund verständlich, dass TCDD eine Immunantwort nur dann unterdrücken kann, wenn seine Exposition zu einem frühen Zeitpunkt während des Ablaufs dieser Reaktion erfolgt. Trotz dieser hinzugewonnenen Erkenntnisse erlauben die Daten keine Rückschlüsse auf den präzisen zugrundeliegenden TCDD-vermittelten molekularen/biochemischen Mechanismus, der verhindert, dass die Antigen-beladenen DZs den drainierenden LN erreichen. Wie schon aus den Ausführungen in Abschnitt 1.3 hervorgeht, handelt es sich bei der Induktion von Immunantworten durch DZs einschließlich der Antigen-induzierten Reifung dieser Zellen und allen damit einhergehenden physiologischen Veränderungen, die letztendlich die Migration zum drainierenden LN ermöglichen, um einen hoch komplexen Prozess, der dementsprechend zahlreiche Angriffspunkte für die Beeinträchtigung durch eine Substanz wie TCDD bietet. Eine Reihe unterschiedlicher hypothetischer Szenarien, die mögliche Erklärungen für die TCDD-induzierte Reduktion der DZ-Zellzahlen im drainierenden LN während der CHS-Reaktion bieten, sind nachfolgend zusammengestellt:

- a) TCDD induziert die Apoptose der DZs an der Antigenexpositionsstelle
- b) TCDD unterbindet den Antigen-induzierten Reifungsprozess der DZs und/oder die damit verbundenen physiologischen Veränderungen, die den Zellen letztendlich migratorische Fähigkeiten verleihen
- c) TCDD beeinträchtigt das Migrationsverhalten der DZs, indem es in den Zellen entweder allgemein die Fähigkeit zur Migration blockiert oder eine gerichtete Migration zum drainierenden LN verhindert

Eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle, deren Expression bzw. Funktion durch TCDD beeinträchtigt werden könnte, ist in die Koordination und Steuerung der oben genannten Prozesse involviert. Da eine detaillierte Besprechung der in Frage kommenden Moleküle den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, soll sich der nachfolgende Teil der Diskussion auf einen in diesem Zusammenhang interessanten Kandidaten konzentrieren. Es handelt sich dabei um den bereits im Rahmen der fötalen Thymusentwicklung und Emigration erwähnten Chemokinrezeptor CCR7. Wie schon zuvor geschildert, spielt dieses Gen, welches ein DRE in seiner Promotorregion besitzt, eine wichtige Rolle bei Migrationsprozessen im Thymus. Dies geschieht dadurch, dass CCR7 der entsprechenden Zelle die Fähigkeit verleiht, einem Gradienten der CCR7-Liganden CCL19 und/oder CCL21 bis zur Quelle zu folgen. Neben bestimmten Thymozyten-Populationen wird CCR7 aber auch von reifen DZs und Langerhans-Zellen exprimiert und ist von essentieller Bedeutung, um diesen Zellen die Migration von der Haut bis zu den drainierenden LN zu ermöglichen (251,252), da sowohl CCL19 als auch CCL21 von Zellen in den T-Zell-Zonen der LN sezerniert werden können (75,253). Dementsprechend zeigten CCR7-defiziente Mäuse aufgrund der verminderten Migration der Antigen-beladenen DZs zum drainierenden LN nach subkutaner bzw. intradermaler Applikation verschiedener Antigene eine supprimierte Immunantwort (252). Bei einer systemischen Verabreichung des Antigens verlief eine solche Immunantwort dagegen normal, da hier das Antigen auch ohne die Hilfe von DZs oder Langerhans-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe gelangen kann. Der Mangel an CCR7 hat offenbar keinen Einfluss auf die Mobilisierung der DZs im Rahmen ihres Reifungsprozesses. Vielmehr scheint die Expression dieses Moleküls notwendig zu sein, um den DZs den Eintritt in die dermalen Lymphbahnen zu ermöglichen (252), was in logischer Übereinstimmung mit der Tatsache ist, dass der CCR7-Ligand CCL21 im lymphatischen Endothel exprimiert wird (251). Eine mögliche TCDD-induzierte Herabregulation von CCR7 könnte also nicht nur die Entwicklungsblockade DN-Thymozyten im DN1b-Stadium bewirken, sondern außerdem eine Erklärung dafür liefern, warum Antigen-beladene DZs in der Gegenwart von TCDD den drainierenden LN nicht erreichen können. Diese Möglichkeit könnte anhand der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der CCR7-Aufregulation durch DZs in histologischen Hautschnitten von TCDD-behandelten Mäusen nach Antigenexposition im Vergleich mit Kontroll-Tieren näher untersucht werden. Ferner könnte mit Hilfe der

Fluoreszenzmikroskop-Technik analysiert werden, ob DZs unter dem Einfluss von TCDD in Gegenwart eines Antigens die Haut im gleichen Ausmaße verlassen, wie dies in Kontroll-Tieren der Fall ist.

5. Literaturverzeichnis

1. Vos, J. G., J. A. Moore, and J. G. Zinkl. 1973. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ.Health Perspect.* 5:149-162.
2. Kerkvliet, N. I. 1995. Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ.Health Perspect.* 103 Suppl 9:47-53.
3. Abo, T., H. Watanabe, K. Sato, T. Iiai, T. Moroda, K. Takeda, and S. Seki. 1995. Extrathymic T cells stand at an intermediate phylogenetic position between natural killer cells and thymus-derived T cells. *Nat.Immun.* 14:173-187.
4. Moore, M. A. and J. J. Owen. 1967. Experimental studies on the development of the thymus. *J.Exp.Med.* 126:715-726.
5. Shortman, K., M. Egerton, G. J. Spangrude, and R. Scollay. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin.Immunol.* 2:3-12.
6. Anderson, G. and E. J. Jenkinson. 2001. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat.Rev.Immunol.* 1:31-40.
7. van Ewijk, W., G. Hollander, C. Terhorst, and B. Wang. 2000. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127:1583-1591.
8. Wilson, A., H. R. MacDonald, and F. Radtke. 2001. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J.Exp.Med.* 194:1003-1012.
9. Michie, A. M., J. R. Carlyle, T. M. Schmitt, B. Ljutic, S. K. Cho, Q. Fong, and J. C. Zuniga-Pflücker. 2000. Clonal characterization of a bipotent T cell and NK cell progenitor in the mouse fetal thymus. *J.Immunol.* 164:1730-1733.

10. Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J.Immunol.* 150:4244-4252.
11. Porritt, H. E., L. L. Rumfelt, S. Tabrizifard, T. M. Schmitt, J. C. Zuniga-Pflücker, and H. T. Petrie. 2004. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity.* 20:735-745.
12. Robey, E. and B. J. Fowlkes. 1994. Selective events in T cell development. *Annu.Rev.Immunol.* 12:675-705.
13. MacDonald, H. R., R. C. Budd, and R. C. Howe. 1988. A CD3- subset of CD4-8+ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4+8+ cells. *Eur.J.Immunol.* 18:519-523.
14. Guidos, C. J., I. L. Weissman, and B. Adkins. 1989. Intrathymic maturation of murine T lymphocytes from CD8+ precursors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7542-7546.
15. Groettrup, M. and H. von Boehmer. 1993. A role for a pre-T-cell receptor in T-cell development. *Immunol.Today* 14:610-614.
16. Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat.Rev.Immunol.* 2:309-322.
17. von Boehmer, H., H. S. Teh, and P. Kisielow. 1989. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol.Today* 10:57-61.
18. Anderson, G., N. C. Moore, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu.Rev.Immunol.* 14:73-99.
19. Kuby, J. *Immunology. 3rd edition, W. H. Freeman and Company, New York.*
20. Ellmeier, W., S. Sawada, and D. R. Littman. 1999. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu.Rev.Immunol.* 17:523-554.

21. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 155:1151-1164.
22. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J.Immunol.* 162:5317-5326.
23. Nossal, G. J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229-239.
24. Fowlkes, B. J., L. Edison, B. J. Mathieson, and T. M. Chused. 1985. Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. *J.Exp.Med.* 162:802-822.
25. Scollay, R., A. Wilson, A. D'Amico, K. Kelly, M. Egerton, M. Pearse, L. Wu, and K. Shortman. 1988. Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunol.Rev.* 104:81-120.
26. Chien, Y. H., M. Iwashima, D. A. Wettstein, K. B. Kaplan, J. F. Elliott, W. Born, and M. M. Davis. 1987. T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 330:722-727.
27. Wilson, A., J. P. de Villartay, and H. R. MacDonald. 1996. T cell receptor delta gene rearrangement and T early alpha (TEA) expression in immature alpha beta lineage thymocytes: implications for alpha beta/gamma delta lineage commitment. *Immunity.* 4:37-45.
28. Petrie, H. T., F. Livak, D. Burtrum, and S. Mazel. 1995. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J.Exp.Med.* 182:121-127.
29. Carding, S. R., S. Kyes, E. J. Jenkinson, R. Kingston, K. Bottomly, J. J. Owen, and A. C. Hayday. 1990. Developmentally regulated fetal thymic and extrathymic T-cell receptor gamma delta gene expression. *Genes Dev.* 4:1304-1315.

30. McVay, L. D. and S. R. Carding. 1996. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J.Immunol.* 157:2873-2882.
31. Carding, S. R. and P. J. Egan. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.* 2:336-345.
32. Goodman, T. and L. Lefrancois. 1988. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 333:855-858.
33. Correa, I., M. Bix, N. S. Liao, M. Zijlstra, R. Jaenisch, and D. Raulet. 1992. Most gamma delta T cells develop normally in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:653-657.
34. Bigby, M., J. S. Markowitz, P. A. Bleicher, M. J. Grusby, S. Simha, M. Siebrecht, M. Wagner, C. Nagler-Anderson, and L. H. Glimcher. 1993. Most gamma delta T cells develop normally in the absence of MHC class II molecules. *J.Immunol.* 151:4465-4475.
35. Constant, P., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, and J. J. Fournie. 1994. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264:267-270.
36. Bukowski, J. F., C. T. Morita, and M. B. Brenner. 1999. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity.* 11:57-65.
37. Mombaerts, P., J. Arnoldi, F. Russ, S. Tonegawa, and S. H. Kaufmann. 1993. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 365:53-56.
38. Fu, Y. X., C. E. Roark, K. Kelly, D. Drevets, P. Campbell, R. O'Brien, and W. Born. 1994. Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. *J.Immunol.* 153:3101-3115.
39. Egan, P. J. and S. R. Carding. 2000. Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J.Exp.Med.* 191:2145-2158.

40. Harrison, L. C., M. Dempsey-Collier, D. R. Kramer, and K. Takahashi. 1996. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J.Exp.Med.* 184:2167-2174.
41. Benlagha, K., A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2000. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J.Exp.Med.* 191:1895-1903.
42. Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, L. Gapin, T. Nakayama, M. Taniguchi, C. R. Wang, Y. Koezuka, and M. Kronenberg. 2000. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J.Exp.Med.* 192:741-754.
43. Eberl, G., R. Lees, S. T. Smiley, M. Taniguchi, M. J. Grusby, and H. R. MacDonald. 1999. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J.Immunol.* 162:6410-6419.
44. Bendelac, A., O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, and R. R. Brutkiewicz. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268:863-865.
45. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-1629.
46. Burdin, N., L. Brossay, Y. Koezuka, S. T. Smiley, M. J. Grusby, M. Gui, M. Taniguchi, K. Hayakawa, and M. Kronenberg. 1998. Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J.Immunol.* 161:3271-3281.
47. Lehuen, A., O. Lantz, L. Beaudoin, V. Laloux, C. Carnaud, A. Bendelac, J. F. Bach, and R. C. Monteiro. 1998. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J.Exp.Med.* 188:1831-1839.

48. Smyth, M. J., N. Y. Crowe, Y. Hayakawa, K. Takeda, H. Yagita, and D. I. Godfrey. 2002. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr.Opin.Immunol.* 14:165-171.
49. Gonzalez-Aseguinolaza, G., C. de Oliveira, M. Tomaska, S. Hong, O. Bruna-Romero, T. Nakayama, M. Taniguchi, A. Bendelac, L. Van Kaer, Y. Koezuka, and M. Tsuji. 2000. alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:8461-8466.
50. Arase, H., S. Ono, N. Arase, S. Y. Park, K. Wakizaka, H. Watanabe, H. Ohno, and T. Saito. 1995. Developmental arrest of NK1.1+ T cell antigen receptor (TCR)-alpha/beta+ T cells and expansion of NK1.1+ TCR-gamma/delta+ T cell development in CD3 zeta-deficient mice. *J.Exp.Med.* 182:891-895.
51. Koyasu, S. 1994. CD3+CD16+NK1.1+B220+ large granular lymphocytes arise from both alpha-beta TCR+CD4-CD8- and gamma-delta TCR+CD4-CD8- cells. *J.Exp.Med.* 179:1957-1972.
52. Vicari, A. P., S. Mocci, P. Openshaw, A. O'Garra, and A. Zlotnik. 1996. Mouse gamma delta TCR+NK1.1+ thymocytes specifically produce interleukin-4, are major histocompatibility complex class I independent, and are developmentally related to alpha beta TCR+NK1.1+ thymocytes. *Eur.J.Immunol.* 26:1424-1429.
53. Nishimura, H., J. Washizu, Y. Naiki, T. Hara, Y. Fukui, T. Sasazuki, and Y. Yoshikai. 1999. MHC class II-dependent NK1.1+ gammadelta T cells are induced in mice by Salmonella infection. *J.Immunol.* 162:1573-1581.
54. Miller, J. F. 1961. Immunological function of the thymus. *Lancet* 2:748-749.
55. Taylor, R. B. 1965. Decay of immunological responsiveness after thymectomy in adult life. *Nature* 208:1334-1335.
56. Miller, J. F. 1964. The thymus and the development of immunologic responsiveness. *Science* 144:1544-1551.
57. Metcalf, D. 1960. The effect of thymectomy on the lymphoid tissues of the mouse. *Br.J.Haematol.* 6:324-333.

58. Metcalf, D. 1965. Delayed effect of thymectomy in adult life on immunological competence. *Nature* 208:1336.
59. Miller, J. F. 1965. Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature* 208:1337-1338.
60. Di Rosa, F., S. Ramaswamy, J. P. Ridge, and P. Matzinger. 1999. On the lifespan of virgin T lymphocytes. *J.Immunol.* 163:1253-1257.
61. Scollay, R. G., E. C. Butcher, and I. L. Weissman. 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur.J.Immunol.* 10:210-218.
62. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
63. Lalvani, A., R. Brookes, S. Hambleton, W. J. Britton, A. V. Hill, and A. J. McMichael. 1997. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J.Exp.Med.* 186:859-865.
64. Kelly, K. A. and R. Scollay. 1990. Analysis of recent thymic emigrants with subset- and maturity-related markers. *Int.Immunol.* 2:419-425.
65. Boursalian, T. E., J. Golob, D. M. Soper, C. J. Cooper, and P. J. Fink. 2004. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat.Immunol.* 5:418-425.
66. Bonomo, A., P. J. Kehn, and E. M. Shevach. 1994. Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. *J.Immunol.* 152:1509-1514.
67. Lee, C. K., K. Kim, L. A. Welniak, W. J. Murphy, K. Muegge, and S. K. Durum. 2001. Thymic emigrants isolated by a new method possess unique phenotypic and functional properties. *Blood* 97:1360-1369.
68. Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley, M. Witmer-Pack, and R. M. Steinman. 1990. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int.Rev.Immunol.* 6:197-206.

69. Hackstein, H. and A. W. Thomson. 2004. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat.Rev.Immunol.* 4:24-34.
70. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 176:1693-1702.
71. Ardavin, C., L. Wu, C. L. Li, and K. Shortman. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362:761-763.
72. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182:389-400.
73. Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J.Exp.Med.* 185:317-328.
74. Gunn, M. D., K. Tangemann, C. Tam, J. G. Cyster, S. D. Rosen, and L. T. Williams. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:258-263.
75. Ngo, V. N., H. L. Tang, and J. G. Cyster. 1998. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J.Exp.Med.* 188:181-191.
76. De Smedt, T., B. Pajak, G. G. Klaus, R. J. Noelle, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1998. Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. *J.Immunol.* 161:4476-4479.

77. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J.Exp.Med.* 189:587-592.
78. Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:1036-1041.
79. Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen. 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J.Exp.Med.* 185:541-550.
80. Steinbrink, K., M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J.Immunol.* 159:4772-4780.
81. Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 1999. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634-1642.
82. Yang, A. S. and E. C. Lattime. 2003. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res.* 63:2150-2157.
83. Steinbrink, K., E. Graulich, S. Kubsch, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99:2468-2476.
84. Rowlands, J. C. and J. A. Gustafsson. 1997. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev.Toxicol.* 27:109-134.
85. Vanden Heuvel, J. P. and G. Lucier. 1993. Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environ.Health Perspect.* 100:189-200.

86. Holsapple, M. P., N. K. Snyder, S. C. Wood, and D. L. Morris. 1991. A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. *Toxicology* 69:219-255.
87. Fanelli, R. and S. Garattini. 1991. Human exposure to dioxin. *Prog.Clin.Biol.Res.* 372:167-177.
88. Fine, J. S., A. E. Silverstone, and T. A. Gasiewicz. 1990. Impairment of prothymocyte activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J.Immunol.* 144:1169-1176.
89. Sakai, R., T. Kajiume, H. Inoue, R. Kanno, M. Miyazaki, Y. Ninomiya, and M. Kanno. 2003. TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells. *Toxicol.Sci.* 72:84-91.
90. Laiosa, M. D., A. Wyman, F. G. Murante, N. C. Fiore, J. E. Staples, T. A. Gasiewicz, and A. E. Silverstone. 2003. Cell proliferation arrest within intrathymic lymphocyte progenitor cells causes thymic atrophy mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *J.Immunol.* 171:4582-4591.
91. Greenlee, W. F., K. M. Dold, R. D. Irons, and R. Osborne. 1985. Evidence for direct action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thymic epithelium. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 79:112-120.
92. Faith, R. E. and M. I. Luster. 1979. Investigations on the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on parameters of various immune functions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 320:564-571.
93. Blaylock, B. L., S. D. Holladay, C. E. Comment, J. J. Heindel, and M. I. Luster. 1992. Exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte maturation. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 112:207-213.
94. Lai, Z. W., J. Kremer, E. Gleichmann, and C. Esser. 1994. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl inhibits proliferation of immature thymocytes in fetal thymus organ culture. *Scand.J.Immunol.* 39:480-488.

95. Kronenberg, S., Z. Lai, and C. Esser. 2000. Generation of alphabeta T-cell receptor+ CD4- CD8+ cells in major histocompatibility complex class I-deficient mice upon activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Immunology* 100:185-193.
96. Hundeker, C., T. Pineau, G. Cassar, R. A. Betensky, E. Gleichmann, and C. Esser. 1999. Thymocyte development in Ah-receptor-deficient mice is refractory to TCDD-inducible changes. *Int.J.Immunopharmacol.* 21:841-859.
97. Majora, M. 2002. *Untersuchungen zur Erzeugung von T-Suppressor-Zellen im dioxinbelasteten Thymus* (Diplomarbeit, Universität Düsseldorf).
98. Esser, C., V. Temchura, M. Majora, C. Hundeker, C. Schwarzler, and U. Günthert. 2004. Signaling via the AHR leads to enhanced usage of CD44v10 by murine fetal thymic emigrants: possible role for CD44 in emigration. *Int.Immunopharmacol.* 4:805-818.
99. Temchura, V. V., M. Frericks, W. Nacken, and C. Esser. 2005. Role of the aryl hydrocarbon receptor in thymocyte emigration in vivo. *Eur.J.Immunol.* 35:2738-2747.
100. Tucker, A. N., S. J. Vore, and M. I. Luster. 1986. Suppression of B cell differentiation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol.Pharmacol.* 29:372-377.
101. Luster, M. I., D. R. Germolec, G. Clark, G. Wiegand, and G. J. Rosenthal. 1988. Selective effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and corticosteroid on in vitro lymphocyte maturation. *J.Immunol.* 140:928-935.
102. Wood, S. C. and M. P. Holsapple. 1993. Direct suppression of superantigen-induced IgM secretion in human lymphocytes by 2,3,7,8-TCDD. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 122:308-313.
103. Vecchi, A., A. Mantovani, M. Sironi, W. Luini, M. Cairo, and S. Garattini. 1980. Effect of acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on humoral antibody production in mice. *Chem.Biol.Interact.* 30:337-342.

104. Lang, D. S., S. Becker, G. C. Clark, R. B. Devlin, and H. S. Koren. 1994. Lack of direct immunosuppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on human peripheral blood lymphocyte subsets in vitro. *Arch.Toxicol.* 68:296-302.
105. De Krey, G. K. and N. I. Kerkvliet. 1995. Suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin occurs in vivo, but not in vitro, and is independent of corticosterone elevation. *Toxicology* 97:105-112.
106. Tomar, R. S. and N. I. Kerkvliet. 1991. Reduced T-helper cell function in mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicol.Lett.* 57:55-64.
107. Lundberg, K., L. Dencker, and K. O. Gronvik. 1992. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits the activation of antigen-specific T-cells in mice. *Int.J.Immunopharmacol.* 14:699-705.
108. Vorderstrasse, B. A. and N. I. Kerkvliet. 2001. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the number and function of murine splenic dendritic cells and their expression of accessory molecules. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 171:117-125.
109. Shepherd, D. M., L. B. Stepan, O. R. Hedstrom, and N. I. Kerkvliet. 2001. Anti-CD40 Treatment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-exposed C57Bl/6 mice induces activation of antigen presenting cells yet fails to overcome TCDD-induced suppression of allograft immunity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 170:10-22.
110. Laupeze, B., L. Amiot, L. Sparfel, E. Le Ferrec, R. Fauchet, and O. Fardel. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.* 168:2652-2658.
111. Vorderstrasse, B. A., E. A. Dearstyne, and N. I. Kerkvliet. 2003. Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antigen-presenting activity of dendritic cells. *Toxicol.Sci.* 72:103-112.

112. Funatake, C. J., N. B. Marshall, L. B. Steppan, D. V. Mourich, and N. I. Kerkvliet. 2005. Cutting edge: Activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4⁺ CD25⁺ cells with characteristics of regulatory T cells. *J.Immunol.* 175:4184-4188.
113. Fernandez-Salguero, P. M., D. M. Hilbert, S. Rudikoff, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez. 1996. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 140:173-179.
114. Hossain, A., S. Tsuchiya, M. Minegishi, M. Osada, S. Ikawa, F. A. Tezuka, M. Kaji, T. Konno, M. Watanabe, and H. Kikuchi. 1998. The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines. *J.Biol.Chem.* 273:19853-19858.
115. Tan, Z., X. Chang, A. Puga, and Y. Xia. 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem.Pharmacol.* 64:771-780.
116. Crews, S. T. 1998. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* 12:607-620.
117. Vrzal, R., J. Ulrichova, and Z. Dvorak. 2004. Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.* 148:3-10.
118. Jeon, M. S. and C. Esser. 2000. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J.Immunol.* 165:6975-6983.
119. Lai, Z. W., C. Hundeiker, E. Gleichmann, and C. Esser. 1997. Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol.Pharmacol.* 52:30-37.

120. Sutter, T. R., K. Guzman, K. M. Dold, and W. F. Greenlee. 1991. Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* 254:415-418.
121. Sewall, C. H., G. C. Clark, and G. W. Lucier. 1995. TCDD reduces rat hepatic epidermal growth factor receptor: comparison of binding, immunodetection, and autophosphorylation. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 132:263-272.
122. Hankinson, O. 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem.Biophys.* 433:379-386.
123. Gillner, M., J. Bergman, C. Cambillau, and J. A. Gustafsson. 1989. Interactions of rutaecarpine alkaloids with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis* 10:651-654.
124. Lu, Y. F., M. Santostefano, B. D. Cunningham, M. D. Threadgill, and S. Safe. 1996. Substituted flavones as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists. *Biochem.Pharmacol.* 51:1077-1087.
125. Schrenk, D., D. Riebniger, M. Till, S. Vetter, and H. P. Fiedler. 1997. Tryptanthrins: a novel class of agonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem.Pharmacol.* 54:165-171.
126. Fernandez-Salguero, P., T. Pineau, D. M. Hilbert, T. McPhail, S. S. Lee, S. Kimura, D. W. Nebert, S. Rudikoff, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez. 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268:722-726.
127. Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, and C. A. Bradfield. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:6731-6736.
128. Carver, L. A., J. B. Hogenesch, and C. A. Bradfield. 1994. Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 22:3038-3044.

129. Song, J., M. Clagett-Dame, R. E. Peterson, M. E. Hahn, W. M. Westler, R. R. Sicinski, and H. F. DeLuca. 2002. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:14694-14699.
130. Ball, W. D. and R. Auerbach. 1960. In vitro formation of lymphocytes from embryonic thymus. *Exp.Cell Res.* 20:245-247.
131. Juhlin, R. and G. V. Alm. 1976. Morphologic and antigenic maturation of lymphocytes in the mouse thymus in vitro. *Scand.J.Immunol.* 5:497-503.
132. Esser, C. and M. Welzel. 1993. Ontogenic development of murine fetal thymocytes is accelerated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Int.J.Immunopharmacol.* 15:841-852.
133. Baugh, L. R., A. A. Hill, E. L. Brown, and C. P. Hunter. 2001. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res.* 29:E29.
134. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162:156-159.
135. Van Gelder, R. N., M. E. von Xastrow, A. Yool, D. C. Dement, J. D. Barchas, and J. H. Eberwine. 1990. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:1663-1667.
136. Pabon, C., Z. Modrusan, M. V. Ruvolo, I. M. Coleman, S. Daniel, H. Yue, and L. J. J. Arnold. 2001. Optimized T7 amplification system for microarray analysis. *Biotechniques* 31:874-879.
137. Gautier, L., L. Cope, B. M. Bolstad, and R. A. Irizarry. 2004. Affy-analysis of Affymetrix genechip data at the probe level. *Bioinformatics* 20:307-315.
138. Askenase, P. W. 1998. Effector and regulatory molecules and mechanisms in delayed hypersensitivity. In *Allergy: Principles and practice*. N. F. Adkinson, Jr., ed. Mosby Co., St. Louis, pp. 323-341.

139. Westermann, J., Z. Puskas, and R. Pabst. 1988. Blood transit and recirculation kinetics of lymphocyte subsets in normal rats. *Scand.J.Immunol.* 28:203-210.
140. Chen, H., H. Huang, and W. E. Paul. 1997. NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation. *J.Immunol.* 158:5112-5119.
141. Coles, M. C. and D. H. Raulet. 2000. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *J.Immunol.* 164:2412-2418.
142. Watanabe, H., C. Miyaji, Y. Kawachi, T. Iiai, K. Ohtsuka, T. Iwanaga, H. Takahashi-Iwanaga, and T. Abo. 1995. Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1+ T cells in various immune organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J.Immunol.* 155:2972-2983.
143. Tatsumi, Y., J. C. Pena, L. Matis, D. DeLuca, and J. A. Bluestone. 1993. Development of T cell receptor-gamma delta cells. Phenotypic and functional correlations of T cell receptor-gamma delta thymocyte maturation. *J.Immunol.* 151:3030-3041.
144. Van Beneden, K., A. De Creus, F. Stevenaert, V. Debacker, J. Plum, and G. Leclercq. 2002. Expression of inhibitory receptors Ly49E and CD94/NKG2 on fetal thymic and adult epidermal TCR V gamma 3 lymphocytes. *J.Immunol.* 168:3295-3302.
145. Rodewald, H. R., M. Ogawa, C. Haller, C. Waskow, and J. P. DiSanto. 1997. Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity.* 6:265-272.
146. Laky, K., L. Lefrancois, U. Freedden-Jeffry, R. Murray, and L. Puddington. 1998. The role of IL-7 in thymic and extrathymic development of TCR gamma delta cells. *J.Immunol.* 161:707-713.
147. Crispe, I. N. and M. J. Bevan. 1987. Expression and functional significance of the J11d marker on mouse thymocytes. *J.Immunol.* 138:2013-2018.

148. Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple, and L. Zhang. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat.Med.* 6:782-789.
149. Hamad, A. R., A. S. Mohamood, C. J. Trujillo, C. T. Huang, E. Yuan, and J. P. Schneck. 2003. B220+ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. *J.Immunol.* 171:2421-2426.
150. Allen III, R. D., T. P. Bender, and G. Siu. 2005. C-myb is essential for early T cell development. *Genes & Dev.* 13:1073-1078.
151. Pearson, R. and K. Weston. 2000. c-Myb regulates the proliferation of immature thymocytes following beta-selection. *EMBO J.* 19:6112-6120.
152. Wilson, A. and H. R. MacDonald. 1995. Expression of genes encoding the pre-TCR and CD3 complex during thymus development. *Int.Immunol.* 7:1659-1664.
153. Jordan, C. T., J. P. McKearn, and I. R. Lemischka. 1990. Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell* 61:953-963.
154. Huang, H. and R. Auerbach. 1993. Identification and characterization of hematopoietic cells from yolk sac of the early mouse embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 21:10110-10114.
155. Petrenko, O., A. Beavis, M. Klaine, R. Kittappa, I. Godin, and I. R. Lemischka. 1999. The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4. *Immunity* 10:691-700.
156. Schilham, M. W., P. Moerer, A. Cumano, and H. C. Clevers. 1997. Sox-4 facilitates thymocyte differentiation. *Eur.J.Immunol.* 27:1292-1295.
157. Yücel, R., H. Karsunky, L. Klein-Hitpass, and T. Möröy. 2003. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit+ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J.Exp.Med.* 197:831-844.

158. Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Dev.* 13:20-25.
159. Boverhof, D. R., E. Tam, A. S. Harney, R. B. Crawford, N. E. Kaminski, and T. R. Zacharewski. 2004. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces suppressor of cytokine signaling 2 in murine B cells. *Mol.Pharmacol.* 66:1662-1670.
160. Tannahill, G. M., J. Elliott, A. C. Barry, L. Hibbert, N. A. Cacalano, and J. A. Johnston. 2005. SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. *Mol.Cell Biol.* 25:9115-9126.
161. Svensson, C. and K. Lundberg. 2001. Immune-specific up-regulation of adseverin gene expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol.Pharmacol.* 60:135-142.
162. Robbens, J., J. Louahed, K. de Pestel, I. van Colen, C. Ampe, C. Vandekerckhove, and J. C. Renauld. 1998. Murine adseverin (D5), a novel member of the gelsolin family, and murine adseverin are induced by interleukin-9 in T-helper lymphocytes. *Mol.Cell.Biol.* 18:4589-4596.
163. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21:241-254.
164. Han, Z. C., M. Lu, J. Li, M. Defard, B. Boval, N. Schlegel, and J. P. Caen. 1997. Platelet factor 4 and other CXC chemokines support the survival of normal hematopoietic cells and reduce the chemosensitivity of cells to cytotoxic agents. *Blood* 89:2328-2335.
165. Fleischer, J., E. Grage-Griebenow, B. Kasper, H. Heine, M. Ernst, E. Brandt, H. D. Flad, and F. Petersen. 2002. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J.Immunol.* 169:770-777.

166. Brennan, F. R., K. Mikecz, T. T. Glant, P. Jobanputra, S. Pinder, C. Bavington, P. Morrison, and G. Nuki. 1997. CD44 expression by leucocytes in rheumatoid arthritis and modulation by specific antibody: implications for lymphocyte adhesion to endothelial cells and synoviocytes *in vitro*. *Scand.J.Immunol.* 45:213-220.
167. Lund-Johansen, F. and L. W. Terstappen. 1993. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *J.Leukoc.Biol.* 54:47-55.
168. Fehr, B. S., A. Takashima, H. Matsue, J. S. Gerometta, P. R. Bergstresser, and P. D. Cruz, Jr. 1994. Contact sensitization induces proliferation of heterogeneous populations of hapten-specific T cells. *Exp.Dermatol.* 3:189-197.
169. Saint-Mezard, P., F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 2004. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur.J.Dermatol.* 14:131-138.
170. Kerkvliet, N. I., L. Baecher-Steppan, D. M. Shepherd, J. A. Oughton, B. A. Vorderstrasse, and G. K. DeKrey. 1996. Inhibition of TC-1 cytokine production, effector cytotoxic T lymphocyte development and alloantibody production by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J.Immunol.* 157:2310-2319.
171. Hara, T., L. K. Jung, J. M. Bjorndahl, and S. M. Fu. 1986. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J.Exp.Med.* 164:1988-2005.
172. Cosulich, M. E., A. Rubartelli, A. Risso, F. Cozzolino, and A. Bargellesi. 1987. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:4205-4209.
173. Risso, A., M. E. Cosulich, A. Rubartelli, M. R. Mazza, and A. Bargellesi. 1989. MLR3 molecule is an activation antigen shared by human B, T lymphocytes and T cell precursors. *Eur.J.Immunol.* 19:323-328.

174. Lanier, L. L., D. W. Buck, L. Rhodes, A. Ding, E. Evans, C. Barney, and J. H. Phillips. 1988. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J.Exp.Med.* 167:1572-1585.
175. Hartnell, A., D. S. Robinson, A. B. Kay, and A. J. Wardlaw. 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 80:281-286.
176. Kripke, M. L., C. G. Munn, A. Jeevan, J. M. Tang, and C. Bucana. 1990. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J.Immunol.* 145:2833-2838.
177. Puga, A., S. J. Barnes, T. P. Dalton, C. Chang, E. S. Knudsen, and M. A. Maier. 2000. Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J.Biol.Chem.* 275:2943-2950.
178. Thomsen, J. S., S. Kietz, A. Strom, and J. A. Gustafsson. 2004. HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. *Mol.Pharmacol.* 65:165-171.
179. Ito, T., S. Tsukumo, N. Suzuki, H. Motohashi, M. Yamamoto, Y. Fujii-Kuriyama, J. Mimura, T. M. Lin, R. E. Peterson, C. Tohyama, and K. Nohara. 2004. A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest. *J.Biol.Chem.* 279:25204-25210.
180. Heimler, I., R. G. Rawlins, H. Owen, and R. J. Hutz. 1998. Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Endocrinology* 139:4373-4379.
181. Dong, W., H. Teraoka, S. Kondo, and T. Hiraga. 2001. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in the dorsal midbrain of zebrafish embryos by activation of arylhydrocarbon receptor. *Neurosci.Lett.* 303:169-172.

182. Cantrell, S. M., J. Joy-Schlezing, J. J. Stegeman, D. E. Tillitt, and M. Hannink. 1998. Correlation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptotic cell death in the embryonic vasculature with embryotoxicity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 148:24-34.
183. Partanen, A. M., A. Kiukkonen, C. Sahlberg, S. Alaluusua, I. Thesleff, R. Pohjanvirta, and P. L. Lukinmaa. 2004. Developmental toxicity of dioxin to mouse embryonic teeth in vitro: arrest of tooth morphogenesis involves stimulation of apoptotic program in the dental epithelium. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 194:24-33.
184. Camacho, I. A., N. Singh, V. L. Hegde, M. Nagarkatti, and P. S. Nagarkatti. 2005. Treatment of Mice with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Leads to Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Nuclear Translocation of NF- κ B and Expression of Fas Ligand in Thymic Stromal Cells and Consequent Apoptosis in T Cells. *J.Immunol.* 175:90-103.
185. Macatonia, S. E., S. C. Knight, A. J. Edwards, S. Griffiths, and P. Fryer. 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J.Exp.Med.* 166:1654-1667.
186. Kerkvliet, N. I. and J. A. Brauner. 1987. Mechanisms of 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin (HpCDD)-induced humoral immune suppression: evidence of primary defect in T-cell regulation. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 87:18-31.
187. Berzins, S. P., R. L. Boyd, and J. F. Miller. 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J.Exp.Med.* 187:1839-1848.
188. Blue, M. L., J. F. Daley, H. Levine, and S. F. Schlossman. 1985. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J.Immunol.* 134:2281-2286.

189. Zadeh, H. H. and I. Goldschneider. 1993. Demonstration of large-scale migration of cortical thymocytes to peripheral lymphoid tissues in cyclosporin A-treated rats. *J.Exp.Med.* 178:285-293.
190. Jimenez, E., R. Sacedon, A. Vicente, C. Hernandez-Lopez, A. G. Zapata, and A. Varas. 2002. Rat peripheral CD4+CD8+ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 168:5005-5013.
191. Nascimbeni, M., E. C. Shin, L. Chiriboga, D. E. Kleiner, and B. Rehermann. 2004. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 104:478-486.
192. Majora, M., M. Frericks, V. Temchura, G. Reichmann, and C. Esser. 2005. Detection of a novel population of fetal thymocytes characterized by preferential emigration and a TCRgammadelta+ T cell fate after dioxin exposure. *Int.Immunopharmacol.* 5:1659-1674.
193. Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Garland science publishing, New York.
194. Lai, Z. W., N. C. Fiore, T. A. Gasiewicz, and A. E. Silverstone. 1998. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol affect thymocytes at different stages of development in fetal thymus organ culture. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 149:167-177.
195. Allen III, R. D., T. P. Bender, and G. Siu. 1999. C-myb is essential for early T cell development. *Genes & Dev.* 13:1073-1078.
196. Tomlinson, I. M. and L. J. Holt. 2001. Protein profiling comes of age. *Genome Biol.* 2:1004.1-1004.3.
197. Misslitz, A., O. Pabst, G. Hintzen, L. Ohl, E. Kremmer, H. T. Petrie, and R. Forster. 2004. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J.Exp.Med.* 200:481-491.

198. Ueno, T., F. Saito, D. H. Gray, S. Kuse, K. Hieshima, H. Nakano, T. Kakiuchi, M. Lipp, R. L. Boyd, and Y. Takahama. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J.Exp.Med.* 200:493-505.
199. Ueno, T., K. Hara, M. S. Willis, M. A. Malin, U. E. Hopken, D. H. Gray, K. Matsushima, M. Lipp, T. A. Springer, R. L. Boyd, O. Yoshie, and Y. Takahama. 2002. Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity.* 16:205-218.
200. Bleul, C. C. and T. Boehm. 2000. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur.J.Immunol.* 30:3371-3379.
201. Kang, J., A. Volkman, and D. H. Raulet. 2001. Evidence that gammadelta versus alphabeta T cell fate determination is initiated independently of T cell receptor signaling. *J.Exp.Med.* 193:689-698.
202. Andersson, P., J. McGuire, C. Rubio, K. Gradin, M. L. Whitelaw, S. Pettersson, A. Hanberg, and L. Poellinger. 2002. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:9990-9995.
203. Witherden, D. A., W. G. Kimpton, N. J. Abernethy, and R. N. Cahill. 1994. Changes in thymic export of gamma delta and alpha beta T cells during fetal and postnatal development. *Eur.J.Immunol.* 24:2329-2336.
204. Hundeiker, C. 1997. *Arylhydrocarbonrezeptor-vermittelte Veränderungen der T-Zellontogenese und T-Zellmigration in der Maus* (Dissertation, Universität Düsseldorf).
205. Wells, F. B., Y. Tatsumi, J. A. Bluestone, S. M. Hedrick, J. P. Allison, and L. A. Matis. 1993. Phenotypic and functional analysis of positive selection in the gamma/delta T cell lineage. *J.Exp.Med.* 177:1061-1070.
206. Schweighoffer, E. and B. J. Fowlkes. 1996. Positive selection is not required for thymic maturation of transgenic gamma delta T cells. *J.Exp.Med.* 183:2033-2041.

207. Bendelac, A. and R. H. Schwartz. 1991. CD4+ and CD8+ T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* 353:68-71.
208. Bendelac, A., P. Matzinger, R. A. Seder, W. E. Paul, and R. H. Schwartz. 1992. Activation events during thymic selection. *J.Exp.Med.* 175:731-742.
209. Zuniga-Pflücker, J. C., H. L. Schwartz, and M. J. Lenardo. 1993. Gene transcription in differentiating immature T cell receptor(neg) thymocytes resembles antigen-activated mature T cells. *J.Exp.Med.* 178:1139-1149.
210. Kuo, S., A. El Guindy, C. M. Panwala, P. M. Hagan, and V. Camerini. 2001. Differential appearance of T cell subsets in the large and small intestine of neonatal mice. *Pediatr.Res.* 49:543-551.
211. Maeda, M., S. Lohwasser, T. Yamamura, and F. Takei. 2001. Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. *J.Immunol.* 167:4180-4186.
212. Der Vliet, H. J., N. Nishi, T. D. de Gruijl, B. M. von Blomberg, A. J. van den Eertwegh, H. M. Pinedo, G. Giaccone, and R. J. Scheper. 2000. Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood* 95:2440-2442.
213. Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, H. Ton-That, M. A. Weston, J. E. Coligan, R. H. Schwartz, and D. M. Pardoll. 1987. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329:251-254.
214. Shao, H., L. Van Kaer, S. L. Sun, H. J. Kaplan, and D. Sun. 2003. Infiltration of the inflamed eye by NKT cells in a rat model of experimental autoimmune uveitis. *J.Autoimmun.* 21:37-45.
215. Sonoda, K. H., D. E. Faunce, M. Taniguchi, M. Exley, S. Balk, and J. Stein-Streilein. 2001. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J.Immunol.* 166:42-50.

216. Seino, K. I., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Bashuda, H. Yagita, and K. Okumura. 2001. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:2577-2581.
217. Ikehara, Y., Y. Yasunami, S. Kodama, T. Maki, M. Nakano, T. Nakayama, M. Taniguchi, and S. Ikeda. 2000. CD4(+) Valpha14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J.Clin.Invest* 105:1761-1767.
218. Ito, K., M. Karasawa, T. Kawano, T. Akasaka, H. Koseki, Y. Akutsu, E. Kondo, S. Sekiya, K. Sekikawa, M. Harada, M. Yamashita, T. Nakayama, and M. Taniguchi. 2000. Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:740-744.
219. Naumov, Y. N., K. S. Bahjat, R. Gausling, R. Abraham, M. A. Exley, Y. Koezuka, S. B. Balk, J. L. Strominger, M. Clare-Salzer, and S. B. Wilson. 2001. Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:13838-13843.
220. Singh, A. K., M. T. Wilson, S. Hong, D. Olivares-Villagomez, C. Du, A. K. Stanic, S. Joyce, S. Sriram, Y. Koezuka, and L. Van Kaer. 2001. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Exp.Med.* 194:1801-1811.
221. Girardi, M., J. Lewis, E. Glusac, R. B. Filler, L. Geng, A. C. Hayday, and R. E. Tigelaar. 2002. Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J.Exp.Med.* 195:855-867.
222. D'Souza, C. D., A. M. Cooper, A. A. Frank, R. J. Mazzaccaro, B. R. Bloom, and I. M. Orme. 1997. An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol.* 158:1217-1221.

223. Wang, R., Y. Wang-Zhu, and H. Grey. 2002. Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:2181-2186.
224. Fauci, A. and H. Lane. 1998. Human immunodeficiency virus (HIV) disease: AIDS and related disorders. In *Harrison's principles of internal medicine*. McGraw-Hill, New York, pp. 1791-1856.
225. Thornton, A. M. and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 188:287-296.
226. Barthlott, T., H. Moncrieffe, M. Veldhoen, C. J. Atkins, J. Christensen, A. O'Garra, and B. Stockinger. 2005. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int.Immunol.* 17:279-288.
227. Erard, D., J. Charreire, M. T. Auffredou, P. Galanaud, and J. F. Bach. 1979. Regulation of contact sensitivity to DNFB in the mouse: effects of adult thymectomy and thymic factor. *J.Immunol.* 123:1573-1576.
228. Sikorski, E. E., G. F. Gerberick, C. A. Ryan, C. M. Miller, and G. M. Ridder. 1996. Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fundam.Appl.Toxicol.* 34:25-35.
229. Gerberick, G. F., L. W. Cruse, C. A. Ryan, B. C. Hulette, J. G. Chaney, R. A. Skinner, R. J. Dearman, and I. Kimber. 2002. Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol.Sci.* 68:420-428.
230. Manetz, T. S. and B. J. Meade. 1999. Development of a flow cytometry assay for the identification and differentiation of chemicals with the potential to elicit irritation, IgE-mediated, or T cell-mediated hypersensitivity responses. *Toxicol.Sci.* 48:206-217.

231. Dubois, B., B. Vanbervliet, J. Fayette, C. Massacrier, C. Van Kooten, F. Briere, J. Banchereau, and C. Caux. 1997. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J.Exp.Med.* 185:941-951.
232. Fayette, J., B. Dubois, S. Vandenabeele, J. M. Bridon, B. Vanbervliet, I. Durand, J. Banchereau, C. Caux, and F. Briere. 1997. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J.Exp.Med.* 185:1909-1918.
233. Lewin, B. 1998. Cell cycle and growth regulation. In *Genes VI*. Oxford University Press, New York, pp. 1089-1129.
234. Nussenzweig, M. C., R. M. Steinman, B. Gutchinov, and Z. A. Cohn. 1980. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 152:1070-1084.
235. Macatonia, S. E., P. M. Taylor, S. C. Knight, and B. A. Askonas. 1989. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J.Exp.Med.* 169:1255-1264.
236. Inaba, K., J. W. Young, and R. M. Steinman. 1987. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J.Exp.Med.* 166:182-194.
237. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust, and B. Malissen. 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 22:643-654.
238. Pulendran, B., J. L. Smith, M. Jenkins, M. Schoenborn, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski. 1998. Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J.Exp.Med.* 188:2075-2082.
239. Yu, P., Y. Wang, R. K. Chin, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, M. H. Kosco-Vibois, J. Cyster, and Y. X. Fu. 2002. B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *J.Immunol.* 168:5117-5123.

240. Merlino, P. G. and J. A. Marsh. 2001. Evidence for the direct action of thymulin on avian NK cells. *Dev.Comp.Immunol.* 25:337-343.
241. Parent, G., P. Chevalier, L. Zalles, R. Sevilla, M. Bustos, J. M. Dhenin, and B. Jambon. 1994. In vitro lymphocyte-differentiating effects of thymulin (Zn-FTS) on lymphocyte subpopulations of severely malnourished children. *Am.J.Clin.Nutr.* 60:274-278.
242. Rivera, A., C. C. Chen, N. Ron, J. P. Dougherty, and Y. Ron. 2001. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int.Immunol.* 13:1583-1593.
243. Tsuji, R. F., M. Szczepanik, I. Kawikova, V. Paliwal, R. A. Campos, A. Itakura, M. Akahira-Azuma, N. Baumgarth, L. A. Herzenberg, and P. W. Askenase. 2002. B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. *J.Exp.Med.* 196:1277-1290.
244. Woods, G. M., K. V. Doherty, R. C. Malley, M. J. Rist, and H. K. Muller. 2000. Carcinogen-modified dendritic cells induce immunosuppression by incomplete T-cell activation resulting from impaired antigen uptake and reduced CD86 expression. *Immunology* 99:16-22.
245. Borriello, F., M. P. Sethna, S. D. Boyd, A. N. Schweitzer, E. A. Tivol, D. Jacoby, T. B. Strom, E. M. Simpson, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 1997. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 6:303-313.
246. McAdam, A. J., E. A. Farkash, B. E. Gewurz, and A. H. Sharpe. 2000. B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte generation in the host response to vesicular stomatitis virus. *J.Virol.* 74:203-208.
247. Tian, Y., S. Ke, M. S. Denison, A. B. Rabson, and M. A. Gallo. 1999. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J.Biol.Chem.* 274:510-515.

248. Verhasselt, V., W. Vanden Berghe, N. Vanderheyde, F. Willems, G. Haegeman, and M. Goldman. 1999. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. *J.Immunol.* 162:2569-2574.
249. Ruby, C. E., M. Leid, and N. I. Kerkvliet. 2002. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses tumor necrosis factor-alpha and anti-CD40-induced activation of NF-kappaB/Rel in dendritic cells: p50 homodimer activation is not affected. *Mol.Pharmacol.* 62:722-728.
250. Denison, M. S. and S. R. Nagy. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43:309-334.
251. Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown, and S. T. Hwang. 1999. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J.Immunol.* 162:2472-2475.
252. Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Forster. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 21:279-288.
253. Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J.Exp.Med.* 188:373-386.

6. Anhang

Teile der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht:

Esser, C., V. Temchura, M. Majora, C. Hundeiker, C. Schwarzler, and U. Günthert. 2004. Signaling via the AHR leads to enhanced usage of CD44v10 by murine fetal thymic emigrants: possible role for CD44 in emigration. *Int.Immunopharmacol.* 4:805-818.

Esser, C., S. Steinwachs, C. Herder, M. Majora, and Z.W. Lai. 2005. Effects of a single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, given at post-puberty, in senescent mice. *Toxicol.Lett.* 157:89-98.

Majora, M., M. Frericks, V. Temchura, G. Reichmann, and C. Esser. 2005. Detection of a novel population of fetal thymocytes characterized by preferential emigration and a TCRgammadelta+ T cell fate after dioxin exposure. *Int.Immunopharmacol.* 5:1659-1674.

DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. C. Esser für die Betreuung der vorliegenden Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Für die technische Assistenz und Hilfe möchte ich mich bei Swantje Steinwachs und Alla Velgach bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Markus Frericks nicht nur für die Bereitstellung eigener Daten und für die gute Zusammenarbeit, sondern auch für die stets tatkräftige Unterstützung bei der Rettung des Regenwaldes.

Neben Markus möchte ich auch Karin Roelofs-Haarhuis und Michaela Moors als Gründungsmitgliedern des Pizza-Clubs danken, ohne deren Gesellschaft sicher so mancher Donnerstag-Abend weitaus langweiliger verlaufen wäre, als dies so der Fall war.

Ein weiterer Dank geht an Nicole Schade für die stete Hilfe und Unterstützung sowie die inspirierenden Diskussionen über Wissenschaft et al.

LEBENS LAUF

Name	Marc Majora
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtstag	6.9.1974
Geburtsort	Neuss
Anschrift	Kantstr. 14 41464 Neuss
Familienstand	ledig

Schulbildung

1981 - 1985	Friedrich-von-Bodelschwingh-Grundschule in Neuss
1985 - 1994	Nelly-Sachs-Gymnasium in Neuss
1994 - 1995	Grundwehrdienst in Goslar / Geilenkirchen

Studium

1995 - 2002	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Erzeugung von T-Suppressor- Zellen im dioxinbelasteten Thymus“ Prof. Dr. C. Esser Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH
ab 2003	Promotion: „Untersuchungen zur Rolle des Thymus und des peripheren Immunsystems bei der TCDD-vermittelten Immunsuppression“ Prof. Dr. C. Esser Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

ERKLÄRUNG

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 10.05.06

