

# Markus Müschen

## Lymphoide Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen: Eine funktionelle Genomanalyse<sup>1</sup>

Die fundamentale Rolle des Thymus in der Entstehung und Reifung von T-Lymphozyten konnte in athymischen Mäusen bereits vor mehr als vierzig Jahren gezeigt werden.<sup>2</sup> Auch im Menschen wurde bereits vor einigen Jahren der formale Beweis für die entscheidende Bedeutung des Thymus in der T-Lymphozytenreifung erbracht: Durch Transplantation von Thymusgewebe in athymischen Säuglingen mit komplettem DiGeorge-Syndrom (Neuralleistendefekt mit Thymusaplasie) konnte eine weitgehend normale T-Lymphozytenentwicklung rekonstituiert werden.<sup>3</sup>

Darüber hinaus belegen verschiedene Mausmodelle, dass ein funktionell aktiver Thymus für eine normale T-Lymphozytenreifung unerlässlich ist.<sup>4</sup> Lehrbuchdarstellungen der T-Lymphozytenentwicklung beschreiben daher eine gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*; CLP), die aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgeht. CLPs haben noch das Entwicklungspotential für alle drei lymphoiden Differenzierungslinien, nämlich der B- und T-Lymphopoese und der Entwicklung zu natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Während in der weiteren Entwicklung B-lymphoide Vorläuferzellen innerhalb des Knochenmarks zu B-Lymphozyten differenzieren können, müssen T-lymphoide Vorläuferzellen das Knochenmark verlassen. Nach diesem Konzept findet eine Festlegung auf die T-lymphoide Differenzierungslinie erst statt, nachdem undeterminierte CLPs das Knochenmark verlassen haben und in den Thymus emigriert sind.<sup>5</sup> Wir wollten daher der Frage nachgehen, aufgrund welcher Signale bisher undeterminierte CLPs entweder im Knochenmark bleiben – wobei eine „Vorentscheidung“ für eine spätere Reifung zu B-Lymphozyten fällt – oder aber das Knochenmark verlassen und auf diese Weise die Weichen für eine anschließende T-Lymphozyten- oder NK-Zell-differenzierung gestellt werden. Auf der Suche nach molekularen Signalen, die Verweilen im Knochenmark *versus* Emigration steuern, haben wir lymphoide Vorläuferzellen aus humanem Knochenmark aufgereinigt, die bereits frühe Merkmale einer eventuellen späteren T-lymphoiden Prädisposition trugen. Die von uns aufgereinigten lymphoiden Vorläuferzellen exprimieren nämlich das früheste bisher bekannte T-Lymphozytenantigen CD7 auf ihrer Oberfläche. Anhand einer genomweiten Genexpressionsprofilanalyse sollte nun nach differentiell exprimierten Genen in den aufgereinigten T-lymphoiden Vorläuferzellen (TLPs), in hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und in humanen Knochenmark-prä-B-Zellen gesucht werden. Dabei sollte nicht nur nach Signalen gefahndet werden, die die

<sup>1</sup> Dieser Text basiert auf publizierten Daten in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), 10014-10019, und ebd. 100 (2003), 6747-6752.

<sup>2</sup> Vgl. Miller (1961).

<sup>3</sup> Vgl. Markert *et al.* (1999).

<sup>4</sup> Übersicht in: Spits (2002).

<sup>5</sup> Vgl. Blom *et al.* (1997).

Emigration von TLPs aus dem Knochenmark steuern, sondern auch analysiert werden, ob und inwieweit bereits eine Festlegung auf die spätere Entwicklung innerhalb der T-lymphoiden Differenzierungslinie stattgefunden hat. Eine solche Festlegung (*lineage commitment*) ist nach derzeit gültiger Lehrmeinung nur im Thymus möglich.

## SAGE-Analyse hämatopoetischer Progenitorzellen

Aus Knochenmarkproben gesunder Spender wurden CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> CD38<sup>low</sup> hämatopoetische Progenitorzellen, CD15<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> myeloische Vorläuferzellen, CD10<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> prä-B-Zellen und CD7<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> TLPs aufgereinigt. Von diesen Populationen und auch von diversen reifen B-Lymphozyten-Subsets stehen inzwischen genomweite Genexpressionsprofile zur Verfügung.<sup>6</sup> TLPs machen insgesamt in humanem Knochenmark mit weit weniger als 0,5 Prozent der mononukleären Zellen nur eine sehr kleine Population aus (Abb. 1). Von den aufgereinigten Populationen wurde die mRNA isoliert und die Summe aller exprimierten Gene (Transkriptom) mit Hilfe der SAGE-Methode (*serial analysis of gene expression*)<sup>7</sup> analysiert. Für jede dieser Vorläuferpopulationen der menschlichen Hämatopoese wurden rund 100.000 so genannte SAGE-Tags ausgewertet, wobei jedes SAGE-Tag im Abgleich mit der genomweiten Datenbank UniGene<sup>8</sup> ein mRNA-Molekül (Transkript) definiert. Während das Repertoire der Genexpression in HSC und myeloischen Vorläuferzellen mit etwa 40.000 unterschiedlichen Transkripten sehr breit angelegt ist, zeigen B- und T-lymphoide Vorläufer mit jeweils nur etwa 16.000 unterschiedlichen Transkripten ein deutlich schmaleres und spezialisierteres Genexpressionsmuster.<sup>9</sup> Damit verglichen wurden auch zwei SAGE-Profile zu akuten lymphoblastischen Leukämien (B-ALL1 und B-ALL2), in denen jeweils nur etwa 9.000 unterschiedliche Transkripte identifiziert wurden.

In einer ersten Durchsicht der SAGE-Daten wurden SAGE-Tags nach dem Quotienten ihrer Häufigkeit in TLPs zu der Summe der SAGE-Tags in HSC, myeloischen Vorläuferzellen, prä-B-Zellen und den beiden B-ALL-Fällen sortiert. Unter den Transkripten, die mit der größten Spezifität in TLPs gefunden wurden, waren zahlreiche Moleküle, die mit dem prä-T-Zellrezeptor (prä-TCR) zusammenhängen, oder prä-TCR-abhängige Signalmoleküle. Das Vorhandensein prä-TCR assoziierter Transkripte in Knochenmark-TLPs ist unerwartet, da nach gültiger Lehrmeinung die Expression des prä-TCR und damit zusammenhängender Signalmoleküle (etwa *LCK*, *ZAP70*, CD3 Signalketten, *TRIM*) ausschließlich in liniendeterminierten Thymozyten und reifen T-Lymphozyten gefunden werden. Das SAGE-Profil für Knochenmark-TLP identifizierte auch zahlreiche T-lymphozytenspezifische Transkriptionsfaktoren, etwa *HES*, *NOTCH1*, *GATA3*, *TCF* und *HTF4* (Tabelle 1). Transgene Expression von *NOTCH1*<sup>10</sup> und des Onkostatins-M-Rezeptors *CD130/gp130*<sup>11</sup> führt im Mausmodell zu massiver extrathymischer T-Lymphozytenreifung. In dieser Hinsicht ist es erwähnenswert, dass sowohl *NOTCH1* (21 SAGE-Tags in TLPs, ein SAGE-Tag in den übrigen hämatopoetischen Populationen) und *CD130* (44

<sup>6</sup> Siehe unter: <http://www.lymphocytes.de/> (29.10.2003).

<sup>7</sup> Vgl. Velculescu *et al.* (1995).

<sup>8</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene> (29.10.2003).

<sup>9</sup> Vgl. Feldhahn *et al.* (2002).

<sup>10</sup> Vgl. Allman *et al.* (2001).

<sup>11</sup> Vgl. Clegg *et al.* (1996).

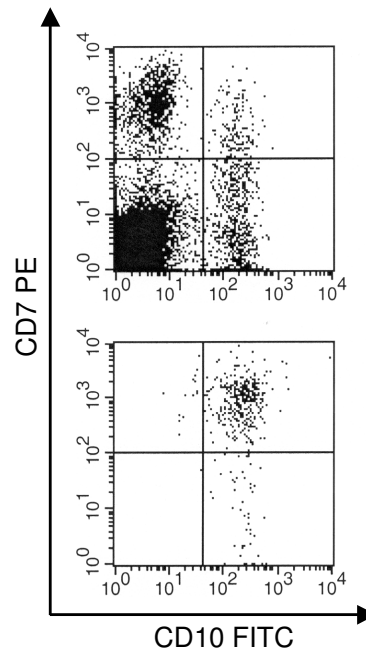


Abb. 1: Anreicherung von  $CD7^+ CD10^+$ -T-lymphoiden Vorläuferzellen aus humanem Knochenmark. Die angereicherte Population (unten) macht weniger als 0,5 Prozent der mononukleären Knochenmarkszellen aus.

SAGE-Tags in TLPs, keine SAGE-Tags in den übrigen hämatopoetischen Populationen) unter den Genen sind, die mit größter Spezifität in Knochenmark-TLPs exprimiert werden (Tabelle 1). Da *lineage commitment* auch die Unterdrückung „*lineage-fremder*“ Differenzierungsmarker impliziert,<sup>12</sup> untersuchten wir, inwieweit Moleküle, die spezifisch in B-lymphoiden und myeloischen Vorläuferzellen exprimiert werden, auch im SAGE-Profil für TLPs gefunden werden. Im Gegensatz zu prä-B-Zellen zeigen TLPs keine Expression von Bestandteilen des prä-B-Zellrezeptors (prä-BCR), keine B-lymphoiden Transkriptionsfaktoren wie *OBF1*, *PAX5*, *EBF* und *OCT2* oder B-Zell-spezifischen Signalmoleküle (*BLNK*, *BTK*, *BLK*, *BAP*, *SYK*). Auch Gene, deren Expression in hämatopoetischen Stammzellen (*CD34*, *CD133*, *AML1*), myeloischen Vorläuferzellen (*GATA1*, *CD11C*, *NF-E2*, *SET*, *CD16*, *CD14*, *MLL*, *IL3R $\alpha$* ) und erythroiden Vorläuferzellen (*glycophorin A*, *CD71*, *CD36*, *NF-E2* und *GATA1*) typischerweise beschrieben ist, wurden in dem SAGE-Profil für TLPs – wenn überhaupt – nur in deutlich reduziertem Ausmaß identifiziert.<sup>13</sup> Diese Befunde legen – entgegen der bisherigen Lehrmeinung über Ursprung und Entwicklung von T-Lymphozyten – nahe, dass bereits im Knochenmark und nicht erst notwendigerweise im Thymus eine Determinierung auf ein T-lymphoides Differenzierungsprogramm stattfinden kann.

<sup>12</sup> Vgl. Müschen *et al.* (2002).

<sup>13</sup> Vgl. Klein *et al.* (2003).

SAGE-Tag	HSC	CMP	pre-B	TLP	B-ALL1	B-ALL2	UniGene	Genname
AACAAGTTAG			125	27	4	4	159376	<i>RAG2</i>
TCAAATGTTT	5		75	16	4		73958	<i>RAG1</i>
CTTTATATGA	1		81	21			272537	<i>TdT</i>
TTTATGACTG	16		75	18	49	44	272537	<i>TdT</i>
CATCTGTCAG				19			169002	<i>preT<math>\alpha</math></i>
GTTTGAAAAA	1	1	1	9	4	4	74647	<i>TCR<math>\alpha</math></i>
TCTTTTGCCC				1	4		74647	<i>TCR<math>\alpha</math></i>
AACTGCACTT		1		1			74647	<i>TCR<math>\alpha</math></i>
ACGCTGCGGC		2		4	4		74647	<i>TCR<math>\alpha</math></i>
AGACTGCCTC						4	74647	<i>TCR<math>\alpha</math></i>
CCTAAGTGAC	1	1	2	28		9	2003	<i>TCR<math>\beta</math> locus</i>
TTCTGTGTGG	1			16	4	4	2003	<i>TCR<math>\beta</math> locus</i>
AATACTTCTC	2	2	2	6		8	2003	<i>TCR<math>\beta</math> locus</i>
GTCAAGAGAA		1	2	151			274475	<i>TCR C<math>\beta</math>1</i>
TATCCCTTTT				16			247927	<i>TCR<math>\beta</math> V7-8</i>
TATGTCTTGG	1	2	2	56			1765	<i>LCK</i>
GCATTCATTG		1	1	16			1765	<i>LCK</i>
CGAGCCTGTT	1		1	28		4	234569	<i>ZAP70</i>
AGACTGGAAG	1		2	50		4	95327	<i>CD3<math>\delta</math></i>
GCTTTGGGGT	1	1		28			211956	<i>CD3<math>\epsilon</math>AP</i>
GTTTAAAGAT	1	1	1	9			2259	<i>CD3<math>\gamma</math></i>
GGGTGCTAAG	1	1	1	44			138701	<i>TRIM</i>
ATAAGAGCTA				44			82065	<i>CD130</i>
TCCCCAACTA	1	1	1	41			234434	<i>HES1</i>
CTGGCTCCCT	1	1		14			234434	<i>HES1</i>
CAGTCCCAGA	2	1		21			129053	<i>NOTCH1</i>
AAGCCTAAAC	1		1	18			169946	<i>GATA3</i>
GATTCCAGTT	1	1		16			233765	<i>TCF</i>
AGATGTTTGC		1	1	14			21704	<i>HTF4</i>
GGCTGATGTT		1	1	14			21704	<i>HTF4</i>
CTGTGGGACC	1	1	1	9			21704	<i>HTF4</i>

**Legende:** HSC, hämatopoetische Progenitorzelle; CMP, gemeinsame myeloische Vorläuferzelle; TLP, T-lymphoide Vorläuferzelle

Tabelle 1: Verteilung von SAGE-Tags, die prä-TCR-assoziierte Signalmoleküle und T-lymphozyten-spezifische Transkriptionsfaktoren identifizieren.

## Umlagerung von V-, D- und J-Segmenten als molekularer Differenzierungsmarker

Wie in Tabelle 1 gezeigt, identifiziert SAGE zahlreiche Transkripte in TLPs, die zu TCR $\beta$ -Gensegmenten gehören. Jedoch kann dabei nicht zwischen umgelagerten TCR $\beta$ -Gensegmenten und Keimbahntranskripten vom TCR $\beta$ -Lokus unterschieden werden. Als möglichen Hinweis auf eine TCR $\beta$ -Genumlagerung untersuchten wir, ob es Hinweise auf eine aktive Rekombinationsmaschinerie gibt: Tatsächlich sind die rekombinationsaktivierenden Gene (*RAG1* und *RAG2*) ebenso wie die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) in TLPs exprimiert, allerdings in geringerem Ausmaß als in prä-B-Zellen. Die Expression von *RAG1* und *RAG2* zusammen mit preT $\alpha$  in TLPs konnte mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR (Abb. 2A) bestätigt werden. T-lymphoide Vorläuferzellen, die *RAG1*, *RAG2* und preT $\alpha$  exprimieren, wurden ausschließlich in humanem Knochenmark und – in geringerem Ausmaß – in Nabelschnurblut, aber nicht in adultem peripheren Blut oder in Tonsillen gefunden (Abb. 2A). Um zu beweisen, dass Knochenmark-TLPs tatsächlich umgelagerte TCR $\beta$  Gensegmente tragen und um TCR $\beta$ -Keimbahnallele, TCR $\beta$ -D-J- und V-DJ-Umlagerungen zu quantifizieren, wurde die Konfiguration der TCR $\beta$ -Allele in einzelnen CD7<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup>-TLPs aus humanem Knochenmark von fünf Spendern mit Hilfe von Einzelzell-PCR analysiert. Dafür wurden zunächst einzelne CD7<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup>-TLPs in PCR-Reaktionsgefäße sortiert. Mit einem unspezifischen linearen Amplifikationsschritt wurden zunächst etwa 30 bis 60 Kopien des gesamten Genoms der einzelnen TLPs erstellt. Von diesen Reaktionsprodukten wurden jeweils Aliquots entnommen, die mit drei unterschiedlichen PCR-Strategien für TCR $\beta$ -Keimbahnkonfiguration, D-J- oder V-DJ-Umlagerungen weiter untersucht wurden (Abb. 3A). Als Positivkontrolle wurden einzelne TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-T-Zellen aus peripherem Blut verwendet und als Negativkontrollen PCR-Reaktionsgefäße, die nur das PCR-Reaktionsgemisch ohne DNA enthielten. Von fünf Donoren wurden insgesamt 88 Knochenmark-TLPs analysiert. Von 69 Zellen konnte in wenigstens einem PCR-Ansatz ein PCR-Produkt amplifiziert werden, die verbleibenden 19 Zellen wurden als ‚nicht informativ‘ eingestuft (Tabelle 2). Von 29 Zellen wurden nur TCR $\beta$ -Keimbahnallele amplifiziert. Von diesen Zellen nehmen wir an, dass sie keine umgelagerten TCR $\beta$ -Allele tragen. In Abwesenheit polymorpher Allele kann allerdings nicht festgestellt werden, ob die Keimbahn-PCR-Produkte nur von einem oder beiden Allelen stammen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil dieser TLPs auf dem zweiten Allel umgelagerte TCR $\beta$ -Gensegmente trägt, die nicht erfolgreich amplifiziert werden konnten. Da aus 21 von 24 TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-T-Lymphozyten erfolgreich eine TCR $\beta$ -Genumlagerung amplifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die eingesetzte PCR Strategie TCR $\beta$ -Genumlagerungen mit hinreichender Sensitivität detektieren kann. TCR $\beta$ -D-J-Umlagerungen in Abwesenheit von V-DJ-Rearrangements wurden aus 19 von 69 informativen TLPs amplifiziert (Tabelle 2). In einigen dieser Zellen konnte ein Keimbahnallel gemeinsam mit einem TCR $\beta$ -D-J-Rearrangement amplifiziert werden, was formal demonstriert, dass es unter Knochenmark-TLPs T-lymphoide Vorläufer gibt, die entweder inkomplett rearrangierte TCR $\beta$ allele tragen oder TCR $\beta$ -Allele, die zum Zeitpunkt der Messung gerade im Umlagerungsprozess begriffen waren. Dagegen konnte aus 21 von 69 informativen TLPs wenigstens ein TCR $\beta$ -Allel mit V-DJ-Umlagerung amplifiziert werden (Tabelle 2). Um zu untersuchen, ob diese V-DJ-Umlagerungen tatsächlich für eine TCR $\beta$ -Kette kodieren können, was als Voraussetzung für die Expression des prä-TCR gilt, wurde die DNA-

A.	TCR $\beta$	Keimbahn <sup>a</sup>	D-J <sup>a</sup>	V-DJ <sup>a</sup>	kein Produkt	
<b>CD7<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup>-TLP</b>						
	Donor I	12/40	9/40	9/40	10/40	
	Donor II	4/12	2/12	4/12	2/12	
	Donor III	5/12	2/12	2/12	3/12	
	Donor IV	7/12	1/12	2/12	2/12	
	Donor V	1/12	5/12	4/12	2/12	
	<b>Summe:</b>	<b>29/88</b>	<b>19/88</b>	<b>21/88</b>	<b>19/88</b>	
<b>TCR<math>\alpha\beta</math><sup>+</sup>-T-Zellen<sup>b</sup></b>						
	mit Donor I	n. d.	n. d.	10/12	2/12	
	mit Donoren II-V	0/12	1/12	11/12	1/12	
	<b>Summe:</b>	<b>0/12</b>	<b>1/12</b>	<b>21/24</b>	<b>3/24</b>	
<b>ohne Zellen<sup>b</sup></b>						
	mit Donor I	0/8	0/8	0/8	8/8	
	mit Donoren II-V	0/12	0/12	0/12	12/12	
	<b>Summe:</b>	<b>0/20</b>	<b>0/20</b>	<b>0/20</b>	<b>20/20</b>	
B.	TCR $\beta$ -PCR-Produkte von einzelnen sortierten CD7 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup> -TLP	C. Sequenzanalyse von TCR $\beta$ -V-DJ-Genumlagerungen <sup>c,d</sup>				
		V $\beta$	D $\beta$	J $\beta$	coding capacity	
1	TCR $\beta$ -Keimbahn	27	V1.1	D1	J2.2	+
			V2.1	D2	J1.2	+
2	TCR $\beta$ -Keimbahn	2	V2.1	D2	J2.3	+
			V2.1	D1	J1.2	+
1	TCR $\beta$ -D-J	11	V2.1	D1	J2.3	-
			V4.1	D1	J1.2 <sup>e</sup>	+
1	TCR $\beta$ -D-J, 1-TCR $\beta$ -Keimbahn	7	V4.1	D1	J1.2 <sup>e</sup>	+
			V4.1	D1	J2.3	+
2	TCR $\beta$ -D-J	1	V4.1	D1	J1.6	+
			V4.1	D1	J2.1	-
1	TCR $\beta$ -V-DJ	9	V6.4	D2	J1.2	+
			V6.4	N <sup>f</sup>	J1.3	-
1	TCR $\beta$ -V-DJ, 1-TCR $\beta$ -Keimbahn	5	V6.6	D2	J1.1	-
			V8.1	D2	J1.2	+
1	TCR $\beta$ -V-DJ, 1-TCR $\beta$ -D-J	5	V8.2	D2	J2.3	-
			V9.1	N <sup>f</sup>	J1.5	-
2	TCR $\beta$ -V-DJ	2	V10.1	D2	J2.3	+
			V13.1	D2	J2.7	-
kein Produkt		19	V14	D2	J2.3	-
			V14	D2	J1.2	-
			V22.1	N <sup>f</sup>	J2.3	+

**Legende:**

- Einstufung als Keimbahn, D-J- oder V-DJ-Konfiguration wie in (A)
- wurden parallel amplifiziert wie angegeben
- Sequenzen sind erhältlich unter EMBL/GenBank AJ549933-549953
- TCR $\beta$ -Gen-Nomenklatur wie in Rowen *et al.* (1996)
- Umlagerungen unterscheiden sich in N-Nukleotid-Sequenzen
- Das umgelagerte D-Segment konnte nicht identifiziert werden.

Tabelle 2: Übersicht über *single-cell* PCR-Analyse von TCR $\beta$ -Allelen in Knochenmark-T-lymphoiden Vorläuferzellen.

Sequenz dieser Genumlagerungen genauer untersucht. Unter den 21 V-DJ-Umlagerungen fanden wir zwölf potentiell produktive Rearrangements und neun Genumlagerungen, bei denen es durch den Umlagerungsprozess zum Verlust des Leserasters gekommen war (Tabelle 2). Daraus kann gefolgert werden, dass zwölf von 69 Knochenmark-TLPs ein TCR $\beta$ -Allel tragen, das vereinbar mit der Expression einer TCR $\beta$ -Kette innerhalb eines prä-TCR-Komplexes ist (Tabelle 2). Die Expression von *RAG1* und *RAG2* zusammen mit dem Befund einer heterogenen Konfiguration des TCR $\beta$ -Lokus in den untersuchten Knochenmark-TLPs legt eine aktive Rekombinationsmaschinerie in diesen Zellen mit kontinuierlich ablaufenden TCR $\beta$ -Genumlagerungen nahe. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurden offene DNA-Doppelstrangbrüche an Rekombinationssignalsequenzen (RSS) innerhalb des TCR $\beta$ -Lokus von aufgereinigten TLPs aus Knochenmark und reifen T-Zellen aus peripherem Blut als Kontrolle amplifiziert. Während somatischer Rekombination von V-, D- und J-Segmenten entstehen Doppelstrangbrüche an den RSS und kovalent geschlossene Haarnadelbindungen (*hairpins*) an den kodierenden Regionen der V-, D- und J-Segmente.<sup>14</sup> Von diesen Doppelstrangbrüchen nimmt man an, dass sie während des Rekombinationsprozesses kurzlebige Reaktionsintermediate bilden. TCR $\beta$ -Gensegmente durchlaufen in festgelegter Reihenfolge D $\beta$  an J $\beta$ - und V $\beta$  an D $\beta$ J $\beta$ -Umlagerungen, während derer zunächst Brüche an J $\beta$ -RSS und anschließend an D $\beta$ -RSS entstehen. V $\beta$  an D $\beta$ J $\beta$ -Umlagerungen generieren Doppelstrangbrüche am stromaufwärts (5') gelegenen RSS-Heptamer des bereits umgelagerten D $\beta$ -Gensegments, das von der Rekombinase angesteuert wird (Abb. 3B). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass *IGH*-Genumlagerungen in T-lymphoiden Vorläufern und *TCR*-Genumlagerungen in B-lymphoiden Progenitorzellen (so genannte *cross-lineage rearrangements*) in niedriger Frequenz vorkommen können, allerdings nur D an J- und niemals V an DJ-Umlagerungen betreffen. Eine V-DJ-Rekombination kann daher als *lineage*-spezifisch angesehen werden. Aus diesem Grund wurden in der hier beschriebenen Untersuchung nur spezifisch T-lymphoide TCR D $\beta$ -RSS-Intermediate mit LM-PCR (*ligation-mediated PCR*) amplifiziert. In diesem Fall werden glatt geschnittene (*blunt end*), am 5' Ende phosphorylierte DNA-Doppelstrangbrüche in 5' Heptamer-RSS von D $\beta$ 1- und D $\beta$ 2-Gensegmenten an ebenfalls glatt geschnittene doppelsträngige Linkermoleküle ligiert (Abb. 3B). Mit PCR-Primern, die 5' gelegene Intronregionen der D $\beta$ 1- und D $\beta$ 2-Segmente und das ligierte Linkermolekül erkennen, wurden D $\beta$ 1-RSS- und D $\beta$ 2-RSS-Intermediate von Knochenmark-TLPs und reifen T-Lymphozyten aus peripherem Blut amplifiziert. D $\beta$ 1-RSS- und D $\beta$ 2-RSS-Intermediate konnten von Knochenmark-TLPs, aber nicht von reifen T-Lymphozyten des peripheren Bluts amplifiziert werden (Abb. 2B).

Zusammenfassend konnte in Knochenmark-TLPs die Expression von rekombinationsaktivierenden Genen (*RAGs*, *SAGE* und RT-PCR) nachgewiesen werden, daneben ein gemischtes Muster von TCR $\beta$ -Keimbahn-, D-J- und V-DJ-Allelen (*single-cell PCR*) und schließlich das spezifische Vorkommen kurzlebiger D $\beta$ 1-RSS- und D $\beta$ 2-RSS-Rekombinationsintermediate (LM-PCR). Wir schlussfolgern, dass Knochenmark-TLPs kontinuierliche Umlagerungsprozesse des TCR $\beta$ -Lokus durchlaufen und bereits ihre T-lymphoide Determinierung abgeschlossen haben.

---

<sup>14</sup> Vgl. Schlissel *et al.* (1993).

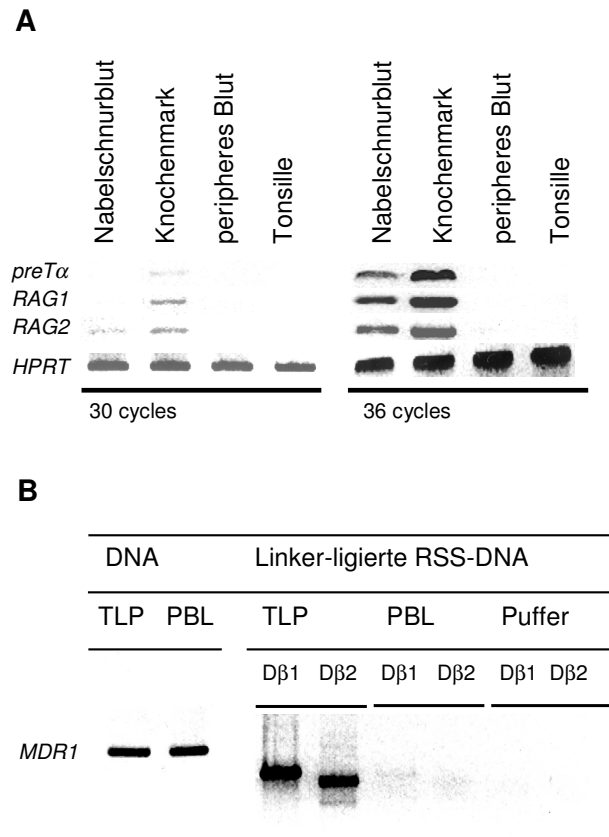


Abb. 2: Expression von preT $\alpha$  und RAGs in humanem Nabelschnurblut, Knochenmark, peripherem Blut und Tonsillen (A) und Nachweis kontinuierlicher Rekombinationsereignisse von TCR $\beta$ -V-an DJ-Segmenten in Knochenmark-TLPs mit LM-PCR (B).

## Expression des prä-TCR auf lymphoiden Vorläuferzellen in humanem Knochenmark

Um zu bestimmen, ob und mit welcher Häufigkeit humane Knochenmark-TLPs einen prä-TCR auf ihrer Oberfläche exprimieren, verwendeten wir einen kürzlich entwickelten Antikörper gegen die humane preT $\alpha$ -Kette<sup>15</sup> zusammen mit einem Antikörper gegen CD3. Während CD3 auch Bestandteil von reifen TCRs ist, lagert sich die preT $\alpha$ -Kette spezifisch innerhalb von prä-TCR-Komplexen an.<sup>16</sup> Etwa fünf Prozent der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in humanem Knochenmark koexprimieren die preT $\alpha$ -Kette, die nur im Komplex mit CD3, jedoch nicht allein auf Zellen gefunden wurde (Abb. 4A). Danach wurde die subzelluläre Lokalisierung von preT $\alpha$  auf einzelnen sortierten CD7<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup>-TLPs mit konfokaler Lasermikroskopie untersucht (Abb. 4B). Ein Teil der CD7<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup>-TLPs exprimierte zusätzlich preT $\alpha$  auf der Zellmembran. PreT $\alpha$  war vor allem innerhalb membranassoziierter Aggregate zu finden, die in ihrer Morphologie an glykolipidreiche Membrandomänen, so genannte *lipid rafts*, erinnern, innerhalb derer auch reife TCRs exprimiert werden (Abb. 4).

<sup>15</sup> Vgl. Ramiro *et al.* (2001).

<sup>16</sup> Vgl. Spits (2002).

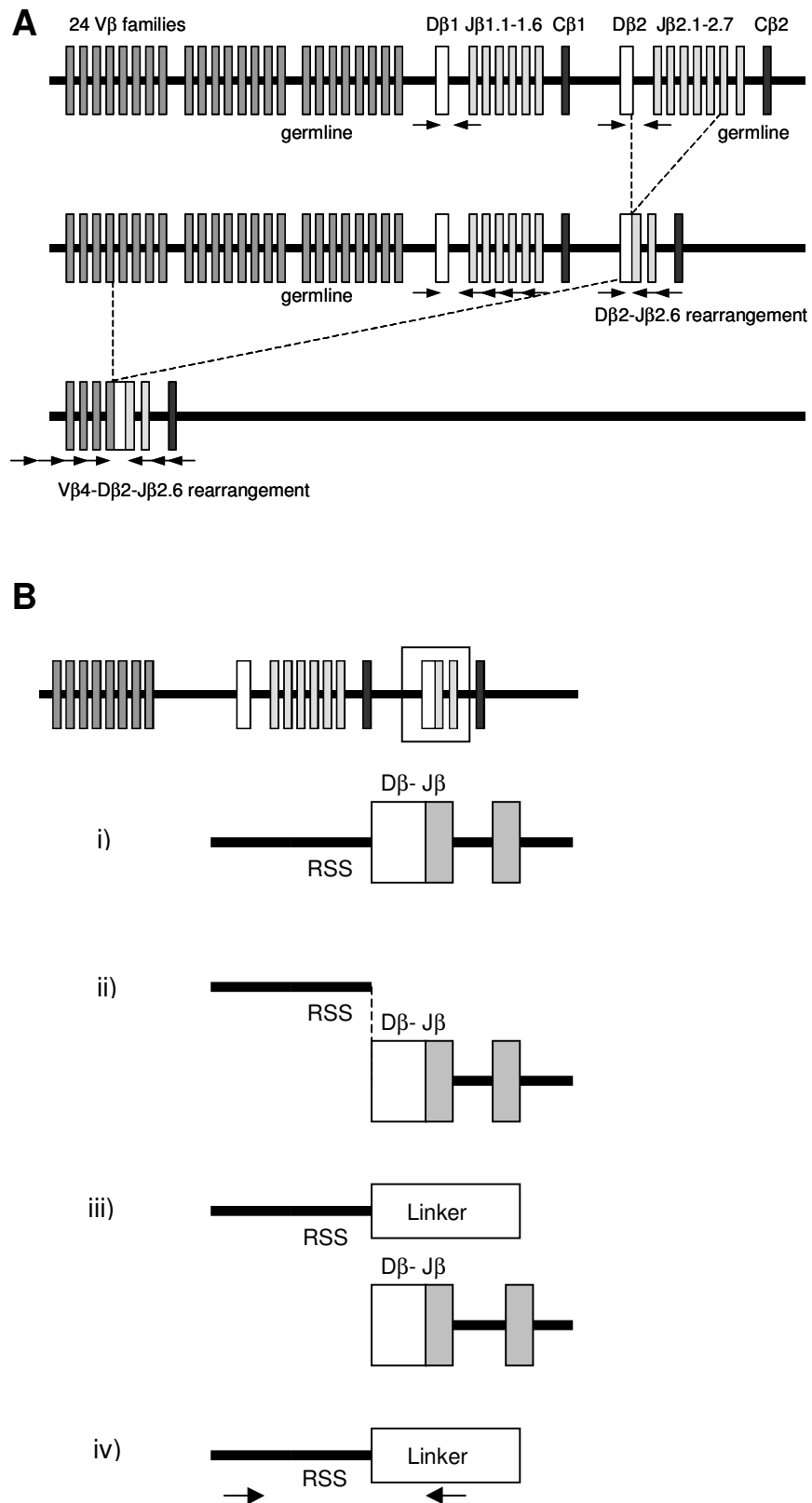


Abb. 3: Experimentelle Strategie zur TCR $\beta$ -single-cell PCR (oben) und LM-PCR (unten).

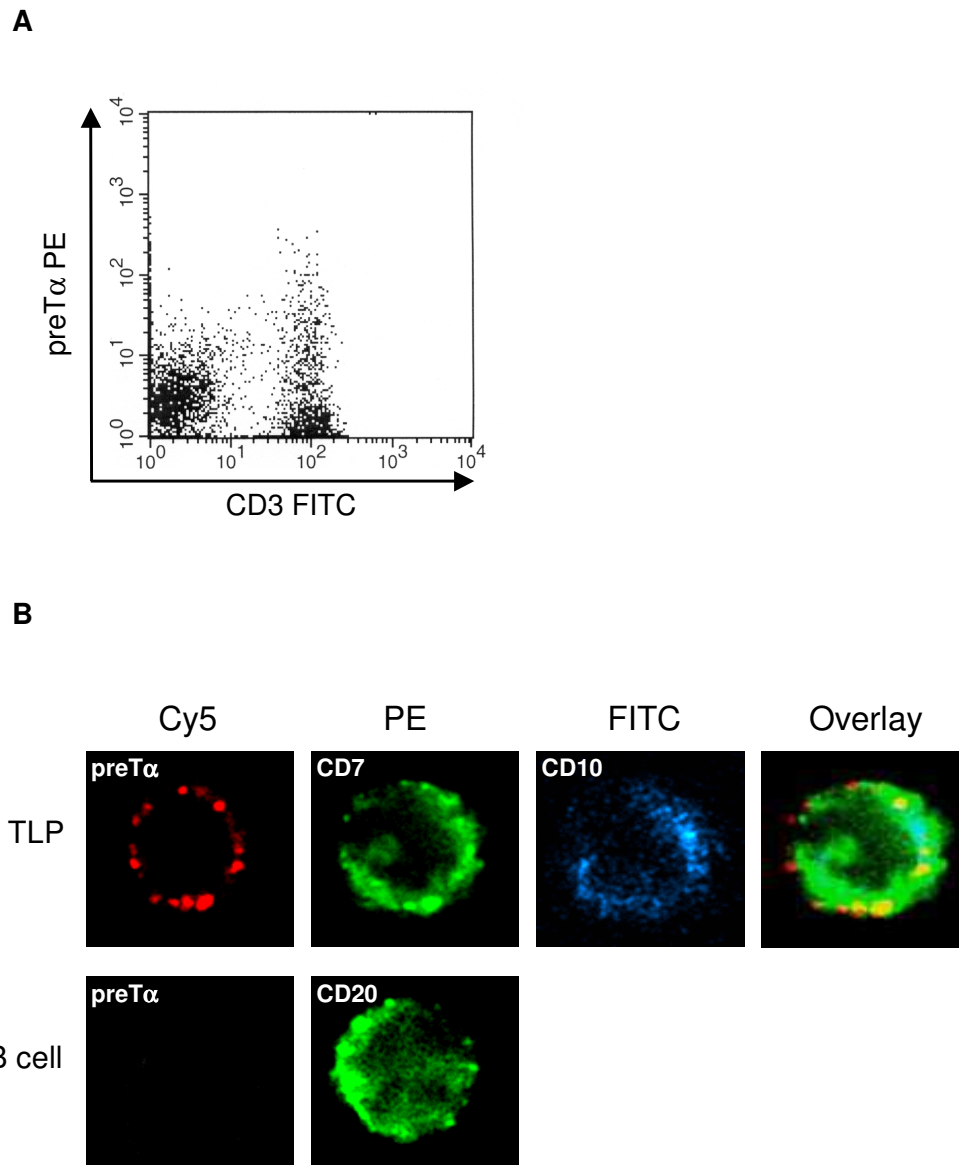


Abb. 4: Expression von preT $\alpha$  innerhalb eines pre-TCR-Komplexes auf der Oberfläche von humanen Knochenmark-TLPs.

## Ausblick

Aktuelle Studien an Mausmodellen sprechen dafür, dass die Festlegung lymphoider Vorläuferzellen auf eine Entwicklung als TCR $\alpha\beta^+$ -T-Lymphozyten nicht vor Besiedelung des Thymus stattfindet.<sup>17</sup> Diese Folgerung basiert auf dem Befund, dass selbst T-lymphoide Vorläuferzellen im Thymus noch in der Lage sind, B- und NK-Zellen zu generieren – obwohl sie bereits T-lymphoide Markergene, wie preT $\alpha$ , exprimieren.<sup>18</sup> An einer Mauslinie mit einem transgenen Reporterkonstrukt konnte formal demonstriert werden, dass die mRNA-Expression von preT $\alpha$  keine B- oder NK-Zelldifferenzierung ausschließt. Daher würde preT $\alpha$ -mRNA-Expression in murinem Knochenmark nicht notwendigerweise für extrathymische T-Lymphozytenentwicklung sprechen, sondern eher widerspiegeln, dass

<sup>17</sup> Vgl. Carlyle und Zuniga-Pflücker (1998).

<sup>18</sup> Vgl. Gounari *et al.* (2002).

in diesen Zellen der preT $\alpha$ -Lokus geöffnet wurde, ohne dass bereits eine T-lymphoide Liniendeterminierung stattgefunden hätte. Hier wird nun allerdings gezeigt, dass es in humanem Knochenmark eine T-lymphoide Population gibt, die unabhängig vom Thymus verschiedene Schritte der frühen T-Lymphozytenentwicklung rekapitulieren kann und die preT $\alpha$  Protein auf der Oberfläche exprimiert. Im Gegensatz zu preT $\alpha$  mRNA schreibt die Expression von preT $\alpha$  Protein auf der Oberfläche einer lymphoiden Vorläuferzelle deren T-lymphoide Identität fest, da preT $\alpha$  die Zellmembran nur innerhalb eines konstitutiv aktiven pre-TCR-Signalkomplexes erreichen kann.<sup>19</sup> Offenbar kann humanes Knochenmark tatsächlich verschiedene Etappen der frühen T-Lymphozytenreifung gewährleisten: konkret gezeigt wurden die T-Zell-Liniendeterminierung, die TCR $\beta$ -Genumlagerung und die Expression eines prä-TCR. Ob Knochenmark-TLPs auch jenseits des prä-T-Zellstadiums bis zu reifen TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Lymphozyten differenzieren können, bleibt nach diesen Untersuchungen offen.

## Bibliographie

- ALLMAN, D., F. G. KARNELL, J. A. PUNT, S. BAKKOUR, L. XU, P. MYUNG, G. A. KORETZKY, J. C. PUI, J. C. ASTER und W. S. PEAR. „Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells“, *Journal of Experimental Medicine* 194 (2001), 99-106.
- BLOM, B., P. RES, E. NOTEBOOM, K. WEIJER und H. SPITS. „Prethymic CD34<sup>+</sup> progenitors capable of developing into T cells are not committed to the T cell lineage“, *Journal of Immunology* 158 (1997), 3571-3577.
- CARLYLE, J. R. und J. C. ZUNIGA-PFLUCKER. „Requirement for the thymus in alphabeta T lymphocyte lineage commitment“, *Immunity* 9 (1998), 187-197.
- CLEGG, C.H., J. T. RULFFES, P. M. WALLACE und H. S. HAUGEN. „Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M“, *Nature* 384 (1996), 261-263.
- FELDHahn, N., I. SCHWERING, S. LEE, M. WARTENBERG, F. KLEIN, H. WANG, G. ZHOU, S. M. WANG, J. D. ROWLEY, J. HESCHELER, M. KRONKE, K. RAJEWSKY, R. KÜPPERS und M. MÜSCHEN. „Silencing of B cell receptor signals in human naive B cells“, *Journal of Experimental Medicine* 196 (2002), 1291-1305.
- GOUNARI, F., I. AIFANTIS, C. MARTIN, H. J. FEHLING, S. HOEFLINGER, P. LEDER, H. VON BOEHMER und B. REIZIS. „Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene“, *Nature Immunology* 3 (2002), 489-496.
- KLEIN, F., N. FELDHahn, S. LEE, H. WANG, F. CIUFFI, M. VON ELSTERMANN, M. L. TORIBIO, H. SAUER, M. WARTENBERG, V. S. BARATH, M. KRÖNKE, P. WERNET, J. D. ROWLEY und M. MÜSCHEN. „T lymphoid differentiation in human bone marrow“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), 6747-6752.
- MARKERT, M. L., A. BOECK, L. P. HALE, A. L. KLOSTER, T. M. McLAUGHLIN, M. N. BATCHVAROVA, D. C. DOUEK, R. A. KOUP, D. D. KOSTYU, F. E. WARD, H. E. RICE, S. M. MAHAFFEY, S. E. SCHIFF, R. H. BUCKLEY und B. F. HAYNES. „Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome“, *New England Journal of Medicine* 341 (1999), 1180-1189.

<sup>19</sup> Vgl. Saint-Ruf *et al.* (2000).

- MÜSCHEN, M., S. LEE, G. ZHOU, N. FELDHAHN, V. S. BARATH, J. CHEN, C. MOERS, M. KRÖNKE, J. D. ROWLEY und S. M. WANG. „Molecular portraits of B cell lineage commitment“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), 10014-10019.
- RAMIRO, A. R., M. N. NAVARRO, A. CARREIRA, Y. R. CARRASCO, V. G. DE YEBENES, G. CARRILLO, J. L. SAN MILLAN, B. RUBIN und M. L. TORIBIO. „Differential developmental regulation and functional effects on pre-TCR surface expression of human pTalpha(a) and pTalpha(b) spliced isoforms“, *Journal of Immunology* 167 (2001), 5106-5114.
- ROWEN, L., B. F. KOOP und L. HOOD. „The complete 685-Kilobare DNA sequence of the human beta T cell receptor locus“, *Science* 272 (1996), 1755-1762.
- SAINT-RUF, C., M. PANIGADA, O. AZOGUI, P. DEBEY, H. VON BOEHMER und F. GRASSI. „Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling“, *Nature* 406 (2000), 524-527.
- SCHLISSEL, M., A. CONSTANTINESCU, T. MORROW, M. BAXTER und A. PENG. „Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated“, *Genes and Development* 7 (1993), 2520-2532.
- SPITS, H. „Development of alphabeta T cells in the human thymus“, *Nature Reviews Immunology* 2 (2002), 760-772.
- VELCULESCU, V. E., L. ZHANG, B. VOGELSTEIN und K. W. KINZLER. „Serial analysis of gene expression“, *Science* 270 (5235) (1995), 484-487.