

Zweidimensionale Trennung von
Knochenmarkslymphozyten der Ratte
und ihre Charakterisierung
durch physikalische Parameter
und Differenzierungsantigene

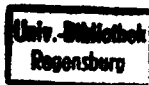
Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ernil Hansen
aus München

Dezember 1979

T 8 1 / 2 2 4

23/W 6.19/533



619/533

1. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Cleve

2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Bohn

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 1980

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1976 bis Juli 1979 unter der Anleitung von Herrn Priv.Doz.Dr.K.Zeiller in der Abteilung von Herrn Prof.Dr. K.Hannig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried durchgeführt.

Großen Dank schulde ich Herrn Priv.Doz.Dr.K.Zeiller für die Anregung dieser Arbeit, für ihre kompetente Leitung, für wissenschaftliche Diskussionen und viele wertvolle Ratschläge. Sein kürzlicher Tod erfüllt mich mit tiefer Trauer. In dankbarer Erinnerung möchte ich ihm diese Arbeit widmen.

Herrn Prof.Dr.K.Hannig danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Abteilung für biochemische Arbeitsmethoden.

Danken möchte ich auch Herrn Prof.Dr.H.Cleve für die bereitwillige Betreuung dieser Dissertation.

Frau C.Eckelt und Frä. R.Wiemeyer haben durch sehr zuverlässige Mitarbeit wesentlich bei der Durchführung der Experimente mitgeholfen.

Schließlich gilt meine Anerkennung für ständige Hilfs- und Gesprächsbereitschaft Frau I.Voss, Frau Dipl.Chem.G.Pascher, Herrn Dipl.Phys. L.Voet, Herrn R.Schmoltz, Herrn W.Dersch und Herrn Dr.W.Jilg.

"It is lots of fun to blow bubbles, but it is wiser
to prick them yourself before someone else tries to."

O.T. Avery

A EINLEITUNG

1	Die Differenzierung von Lymphozyten.....	1
2	Die Komplexität des Knochenmarks.....	2
3	Lymphozyten unbekannter Natur.....	4
4	Die Ratte als Versuchstier.....	5
5	Ziel der Arbeit.....	6

B MATERIAL UND METHODEN

1	Untersuchungsobjekt.....	8
1.1	Versuchstiere.....	8
1.2	Zellpräparation.....	8
1.3	Rekonstitution thymektomierter und letal bestrahlter Ratten.....	9
1.3.1	Thymektomie.....	10
1.3.2	Letale Bestrahlung.....	10
1.3.3	Rekonstitution.....	10
2	Zelltrennmethoden.....	11
2.1	1-g Sedimentation.....	11
2.1.1	Trennapparatur.....	12
2.1.2	Trennbedingungen.....	14
2.1.3	Probenapplikation und Fraktionierung.....	15
2.2	Zellelektrophorese.....	15
2.2.1	Trennapparatur.....	17
2.2.2	Trennbedingungen.....	17
2.2.3	Probenapplikation und Fraktionierung.....	18
2.3	Die Kombination von Zellsedimentation und Zellelektrophorese.....	18
3	Zellzahl, -vitalität, -morphologie und -volumen.....	19
3.1	Zellzahl.....	19
3.2	Zellvitalität.....	19
3.3	Zellmorphologie.....	20
3.4	Elektronische Zellvolumenmessung.....	20
3.4.1	Messung.....	20
3.4.2	Auswertung der Histogramme.....	21
3.4.3	Fehlerquellen.....	21
4	Biochemische und biologische Eigenschaften.....	22
4.1	DNS-Stoffwechsel.....	22
4.2	Fc-Rezeptoren.....	23
4.3	Intrazelluläres Immunglobulin.....	23
4.4	Nachweis von Stammzellen (CFU-S).....	24
5	Oberflächenantigene.....	25
5.1	Antiseren.....	25
5.1.1	Xenoantiseren.....	26
5.1.2	Alloantiseren.....	29
5.1.3	Präparation von F(ab') ₂	30
5.1.4	FITC- und TRITC-Kopplung.....	31
5.2	Qualitativer Nachweis von antigentragenden Zellen.....	31
5.2.1	Direkte Immunfluoreszenz.....	31
5.2.2	Cytotoxizitätstest.....	32

	Seite	
5.3	Quantitativer Vergleich der Antigenmenge auf der Zelloberfläche.....	33
5.3.1	Durchfluß-Cytofluorometrie.....	33
5.3.2	Absorptionsstudien.....	35
 C ERGEBNISSE		
1	Trennprofile, Zellvolumen und Morphologie.....	37
1.1	Zellsedimentation.....	37
1.2	Zellelektrophorese.....	42
2	Biochemische und biologische Eigenschaften.....	46
2.1	DNS-Stoffwechsel.....	46
2.2	Fc-Rezeptoren.....	48
2.3	Intrazelluläres Immunglobulin.....	48
2.4	Stammzellaktivität (CFU-S).....	49
3	Oberflächenantigene.....	51
3.1	Qualitativer Nachweis von antigentragenden Zellen.....	51
3.1.1	Zellsedimentation.....	51
3.1.2	Zellelektrophorese.....	53
3.1.3	FITC/TRITC Doppelmarkierungen.....	55
3.2	Quantitativer Vergleich der Antigenmenge auf der Zelloberfläche.....	57
3.2.1	Durchfluß-Cytofluorometrie.....	57
3.2.2	Absorptionsstudien.....	64
4	Thymusabhängigkeit von Knochenmarkslymphozyten.....	67
4.1	Trennprofile, Zellvolumen und Morphologie rekonstituierten Knochenmarks.....	68
4.2	Oberflächenantigene.....	70
5	Zellen mit Thy-1 Antigen in anderen lymphatischen Organen und ihre Thymusabhängigkeit.....	73
5.1	Milz.....	73
 5 DISKUSSION		
1	Lymphozytenpopulationen im Knochenmark der Ratte.....	81
2	Die dominierende, Thy-1 positive Lymphozytenpopulation des Knochenmarks.....	84
3	Thy-1 positive Lymphozyten in Milz und Lymphknoten.....	86
4	Einordnung der dominierenden Lymphozytenpopulation des Knochenmarks.....	87
4.1	Vergleich mit Stammzellen.....	87
4.2	Vergleich mit B-Vorläuferzellen.....	88
4.3	Vergleich mit T-Vorläuferzellen.....	90
4.4	"Killer"-Zellen und terminale Zellentwicklung.....	93
5	Nutzen der zweidimensionalen Zelltrennung.....	94
E	ZUSAMMENFASSUNG	96
F	LITERATURVERZEICHNIS	98

ABKÜRZUNGEN

B-Zellen	Bursa- bzw. Knochenmark-abhängige Lymphozyten
T-Zellen	thymusabhängige Lymphozyten
KM	Knochenmark
Lk	Lymphknoten
TDT	Ductus Thoracic Lymphe
Thy	Thymus
EB	elektrophoretische Beweglichkeit
L-	Bereich niederer EB
M-	Bereich mittlerer EB
H-	Bereich hoher EB
Thy-1	Theta- oder Thymus/Hirn-Antigen
RThyA	Ratten thymusspezifisches Antigen
RBLA	Ratten B-Zell-spezifisches Antigen
RTLA	Ratten-T-Zell-spezifisches Antigen
RHLA	Ratten-T-Zellen-hoher-EB-spezifisches Antigen
H-1	Haupt-Histokompatibilitätsantigene der Ratte
Ig	Immunglobulin
F(ab') ₂	bivalentes Antikörperfragment nach Pepsin-Verdauung
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
C	Komplement
V	Variationskoeffizient
Wi	Wistar Ratten
BN	Brown Norway Ratten
Puck-G	Zellkultur-Medium
BSA	Rinderserum-Albumin
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Terminal-Deoxynukleotidyl-Transferase
SRBC	Hammelerythrozyten
EA	Erythrozyten-Ambozeptor Komplex
GvH	Reaktion eines Transplantats gegen den Empfänger
spf	frei von spezifischen pathogenen Keimen
CFU-S	milzkoloniebildende Stammzellen
FLC	fetale Leberzellen
ADCC	Antikörper-abhängige-zellvermittelte Cytotoxizität
NK	natürliche-zellvermittelte Cytotoxizität

A EINLEITUNG

1 Die Differenzierung von Lymphozyten

Lymphozyten sind Zellen, die Immunität vermitteln, d. h. die Fähigkeit, (a) "Selbst" und "Fremd" zu unterscheiden, (b) gegen ein körperfremdes Antigen eine antigenspezifische Abwehrreaktion aufzubauen und (c) dies bei einem sekundärem Kontakt in verstärktem Maße zu tun. Sie erlauben dem Wirbeltierorganismus gegenüber Infektionen, Parasiten und Tumorstadium sein individuelles Integrität zu bewahren.

Nach Art der Immunantwort unterscheidet man T-Lymphozyten mit einer zellulären Reaktion und B-Lymphozyten mit einer humoralen Reaktion, die über die Bildung von Antikörpern abläuft. Diese Dichotomie des Immunapparates spiegelt sich auch wider in der unterschiedlichen Verteilung und Lokalisation dieser Zellen in den lymphatischen Organen, und in unterschiedlichen Differenzierungswegen. So läuft die Reifung der T-Zellen im Thymus ab, die der B-Zellen - bei Vögeln in der bursa de Fabricii - bei den Säugetieren zumindest "thymusunabhängig" ab (1).

Die Vorläuferzellen für beide Differenzierungswege stammen beim erwachsenen Tier aus dem Knochenmark. Aus pluripotenten Stammzellen, die in letal bestrahlten Tieren das gesamte hämopoetische System rekonstituieren können, entstehen hier Zellen, die auf die Lymphopoese festgelegt sind (2-4). Auch die endgültige Zugehörigkeit von Vorläuferzellen zur T- oder B-Zellreihe scheint sich schon im Knochenmark zu entscheiden. So wurden kürzlich im Knochenmark der Maus Pro-Thymozyten nachgewiesen, bei denen durch Thymusextrakte und andere Aktivatoren Mitogenstimulierbarkeit und thymusspezifische Oberflächenantigene in vitro induzierbar sind (5,6), und die die Fähigkeit besitzen, selektiv zum Thymus zu

wandern (7). Schon länger ist bekannt, daß die T-Zell Differenzierung im Thymus durch einen ständigen Zufluß von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark aufrechterhalten wird (8). Den Thymus verlassen nach weiteren Differenzierungsschritten "post-thymische" T-Vorläuferzellen, die in Knochenmark und Milz gefunden werden und in der Peripherie die abschließende Umwandlung zu reifen T-Lymphozyten erfahren (9).

Noch weitergehend ist die Beteiligung des Knochenmarks der Säuger an der B-Zell-Entwicklung. Aus Stammzellen entstehen laufend B-Vorläuferzellen, die im Knochenmark oder in der Milz über "Prä-B" Vorstufen zu reifen B-Lymphozyten differenzieren, wobei zunehmend Immunglobulin auf ihrer Oberfläche nachweisbar wird (10,11). Ein wichtiges Merkmal für die Beschreibung gerade von unreifen Lymphozyten und für ihre Einordnung in die T- oder B-Zellreihe sind die Differenzierungsantigene. Dies sind Oberflächenstrukturen, die von Allo- oder Xeno-Antisera erkannt werden, und beschränkt sind auf einen bestimmten Zelltyp. Sie stellen Produkte selektiver Genwirkung dar, die an festliegender Stelle der Differenzierung auftreten bzw. verschwinden.

2 Die Komplexität des Knochenmarks

Mit den verschiedenen Reifungsstufen ist die Vielfalt der Lymphozyten noch nicht erschöpft. Nach ihrer Reifung lassen sich sowohl bei T- als auch bei B-Lymphozyten Subpopulationen verschiedener Funktion unterscheiden (1). Über das Blut siedeln sie in die peripheren lymphatischen Organe aus und gelangen durch Rezirkulation zum Teil auch in das Knochenmark (12,13). Schließlich ist es die besondere Eigenschaft reifer Lymphozyten, nach Antigenkontakt noch weitere Teilungen und Veränderungen im Zuge einer Immunantwort erfahren zu können. So ergibt sich insgesamt eine Fülle von Lymphozytenformen und -reifungsstufen, die zum

großen Teil im Knochenmark anzutreffen sind.

Doch nur 1/3 bis 1/4 der Knochenmarkszellen sind lymphoiden Charakters. Zur Vielfalt der Lymphozyten kommt die Vielfalt der anderen Blutzellen: Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, sowie Thrombozyten werden fortlaufend im Knochenmark, und fast ausschließlich dort, gebildet.

Zellen verschiedener Funktion und unterschiedlicher Reifungsstufe liegen also nebeneinander vor, was das Knochenmark zu einem äußerst komplexen Organ macht. Die Abb. 1 versucht diese Komplexität und die zentrale Rolle des Knochenmarks in der Lymphopoese darzustellen.

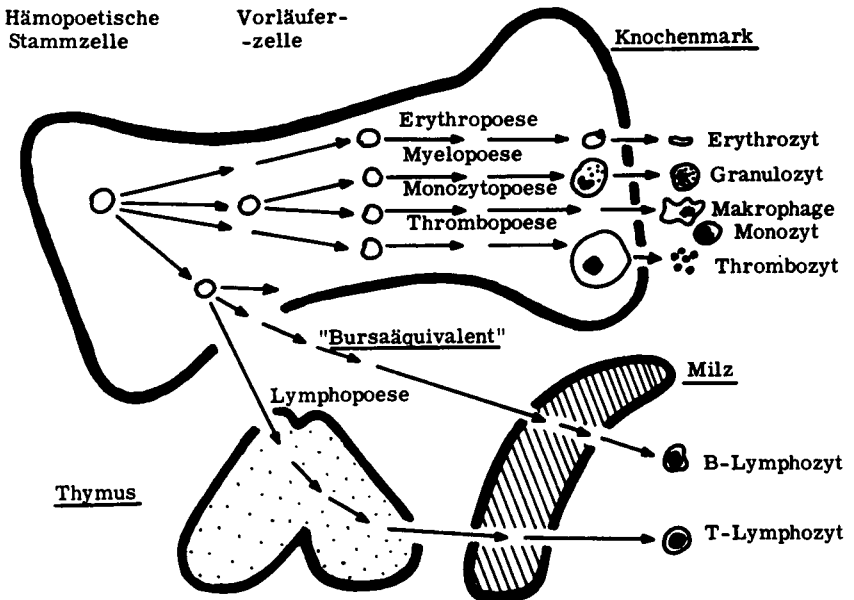


Abb.1 Schematische Darstellung der Hämopoese zusammengestellt nach (1,2)

Bei der Untersuchung komplexer Zellgemische, insbesondere von Lymphozyten, haben sich Zelltrennmethoden als äußerst nützlich erwiesen (14-16). Denn die meisten Messungen von Funktionen und Eigenschaften an Zellen sind ein Durchschnitt der gesamten untersuchten Zellprobe. Die Zuordnung zu einer bestimmten Zellart ist in dem Maße möglich, wie es gelingt, das vorliegende Gemisch aufzutrennen. Bei der ungeheueren Vielzahl von verschiedenen Zelltypen im Knochenmark ist eine Aufgliederung besonders nötig, aber auch vielversprechend. Die Vorteile von Trennungen speziell nach physikalischen Parametern wie Dichte, Volumen oder Oberflächenladungsdichte sind, daß die Nebenwirkungen auf die Zellen meist gering und abschätzbar sind, daß die Gesamtheit der Zellen erfaßt wird und kein selektiver Verlust eintritt, daß sie differentiell arbeiten, was besonders wichtig ist, weil die meisten Unterschiede zwischen Zellen auch wirklich mehr quantitativer als qualitativer Art sind und, daß sie analytisch arbeiten, d. h. gleichzeitig mit der Trennung eine Meßzahl liefern, die zur Beschreibung der Zelle herangezogen werden kann und die auch geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen anzeigt.

3 Lymphozyten unbekannter Natur

In den bisherigen Untersuchungen an getrenntem Knochenmark wurde besonders auf bestimmte Funktionen, wie Antigenerkennung durch reife T- oder B-Zellen (17,18) oder Milzkolonienbildung durch Stammzellen (19-21) geachtet und ihre Verteilung in der Separation verfolgt. Der Teil der lymphoiden Knochenmarkselemente, der durch solche funktionellen Tests erfaßt werden kann, ist jedoch gering. Neben all den erwähnten Zelltypen

und Differenzierungsstufen - die auch nur teilweise charakterisiert sind - ist die weitaus größte Menge der Knochenmarkslymphozyten ihrer Funktion nach unbekannt: Stammzellen und Vorläuferzellen machen höchstens 1% muriner Knochenmarkszellen aus (2,22-24), reife T- und B-Lymphozyten aus der Rezirkulation finden sich in geringer Zahl, entsprechend einer nur geringen Immunreaktionsfähigkeit des Knochenmarks (25-31), und auch der Anteil der B-Zellvorstufen ist beschränkt (10,18).

Mehr als 50% muriner und menschlicher Knochenmarkslymphozyten sind "Nullzellen", die weder T- noch B-Zell-spezifische Oberflächenantigene besitzen (10-13). Sicher ist, daß sie im Knochenmark selbst fortlaufend und rasch gebildet werden (12,32) und immuninkompetent sind (33). Über ihre Rolle und ihre Zugehörigkeit zur T- oder B-Zellreihe herrscht noch große Unklarheit.

Es ist daher eine sinnvolle Möglichkeit, bei der Anwendung physikalischer Trennmethode nicht Funktionen, sondern die Zellzusammensetzung der einzelnen Fraktionen zu untersuchen. Für eine dabei charakterisierte und angereicherte Zellpopulation gelingt es dann vielleicht auch, die Funktion zu finden.

Ein großes Interesse am Knochenmark ergibt sich also zum einen aus seiner wichtigen Rolle bei gerade der frühen Differenzierung des Immunapparates und zum anderen aus der unklaren Einordnung eines Großteiles der Lymphozyten. Erschwert wird die Untersuchung dieser Lymphozyten durch die Komplexität des Knochenmarks und die Unkenntnis ihrer Funktion.

4 Die Ratte als Versuchstier

Bevorzugtes Objekt immunologischer Forschung war lange Zeit die Maus, doch liefert die Ratte bedeutend mehr Ausgangsmaterial an Zellen für

ein präparatives Arbeiten, ist sie für operative Eingriffe zugänglicher und erleichtert mengenmäßig die Herstellung von Alloantisera. Die Ergebnisse bei der Ratte fügen sich meist gut in das ausführlicher untersuchte Maus-System ein.

Von besonderem Interesse erwiesen sich gerade die Knochenmarkslymphozyten der Ratte, als Zeiler und Dolan (34). nach elektrophoretischer Anreicherung auf ihnen thymusspezifisches Antigen nachweisen konnten. Dieser für die Ratte eigene Befund wurde bestätigt und das gut beschriebene Thy-1 Antigen identifiziert (35).

5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, Knochenmarkslymphozyten der Ratte zu isolieren und zu charakterisieren. Das Augenmerk war auf die Erfassung des mengenmäßig überwiegenden Teiles der kleinen Marklymphozyten gerichtet.

Das Problem der Komplexität des Knochenmarks wurde angegangen durch die Anwendung einer zwei-dimensionalen Separation, bestehend aus aufeinanderfolgender Zellsedimentation und Zellelektrophorese. Dadurch sollte versucht werden, die Heterogenität a) bezüglich der lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen, und b) innerhalb der Lymphozyten aufzulösen.

Eine Charakterisierung der isolierten Lymphozyten wurde wegen der zum Teil unbekanntem Funktion durch physikalische Parameter und durch Differenzierungsantigene angestrebt, insbesondere mit dem Ziel einer Zuordnung zur B- oder T-Zellreihe. Der Besitz thymusspezifischer Oberflächenantigene sollte dabei nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ bestimmt werden.

Um die Thymusabhängigkeit dieser Antigene zu prüfen, wurde das Auftreten der entsprechenden Knochenmarkslymphozyten in thymektomierten, letal bestrahlten und mit Stammzellen rekonstituierten Ratten untersucht. Dabei mußte die Herkunft vom Spender sichergestellt werden.

Die Arbeit sollte Voraussetzungen schaffen, um an gereinigten und gut charakterisierten Zellpopulationen später Versuche über ihre Herkunft und Funktion zu ermöglichen.

B MATERIAL UND METHODEN

1 Untersuchungsobjekt

1.1 Versuchstiere

Das Knochenmark für die Versuche stammte von 2 Monate alten isogenen Wistar-Ratten (Wi), die von der GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN- UND UMWELT-FORSCHUNG, Neuherberg bezogen wurden. Isogene Brown-Norway-Ratten (BN) für die Herstellung eines H-1 Alloantisierums und die Züchtung von BN/Wi F1-Hybriden wurden ursprünglich vom MPI FÜR IMMUNOLOGIE, Freiburg, zur Verfügung gestellt und später selbst weitergezüchtet.

1.2 Zellpräparation

Zur Präparation von Knochenmark wurden den mit Äther getöteten Tieren Tibiae und Femura entnommen und das Mark mit Zellkulturmedium Puck-G (DIFCO), supplementiert mit 1% deionisiertem BSA (ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY) von pH 7,2 und 290 mosmol, herausgespült. Durch gelindes Auf- und Abziehen in einer Plastikpipette wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und durch Gazefiltration von Knochensplittern und Geweberesten befreit. Zelldebris und Aggregate wurden entfernt durch zweimaliges Waschen in Puck-G (100 x g, 10 min) und Filtration durch wenig Watte in Pasteurpipetten.

Wenn nötig, wurden Milz-, Lymphknoten- oder Thymuszellen präpariert durch Zerzupfen der Organe mittels Kanüle und Pinzette. Leber, Hirn oder größere Mengen von Milzen wurden in einem Mixer verarbeitet.

Alle Präparationen wurden bei 4°C auf Eis durchgeführt, um bakterielles Wachstum und freiwerdende Enzyme zu hemmen und die Vitalität der Zellen

zu erhalten.

1.3 Rekonstitution thymektomierter und letal bestrahlter Ratten

Die Thymusabhängigkeit einer Zellpopulation kann erkannt werden in einem Tier, in dem nach Thymusentfernung das lymphatische System aus Stammzellen wiederaufgebaut wird. Drei Punkte sind dabei von entscheidender Bedeutung:

- 1) Der Thymus muß restlos entfernt sein. Dies ist an erwachsenen Tieren sicherer möglich als an neugeborenen. Die Vollständigkeit der Thymektomie wurde vor Verwendung der Zellen nochmals makroskopisch kontrolliert. Ein sicheres Zeichen ist der Ausschluß von reifen T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen der rekonstituierten Ratten.
- 2) Die im Empfänger ursprünglich vorhandenen Lymphozyten müssen eliminiert sein. Dies wird gewöhnlich durch letale Bestrahlung erreicht (23,36-38). Es ist eine wichtige Kontrolle, für die untersuchten Lymphozyten die Herkunft vom Spender nachzuweisen. Chromosomenmarker können nur an sich teilenden Zellen und nach Verlust der Zellstruktur beobachtet werden. Deshalb wurde ein allogenes System angewandt, in dem Abkömmlinge von Spenderzellen in vitalem Zustand durch ein rassenspezifisches Antigen serum erkannt werden (39,23). Die Spender waren F1-Hybride, deren Zellen nicht gegen Elternzellen reagieren; die Empfänger waren von einem Elterntyp und durch die Bestrahlung tolerant.
- 3) Die Stammzellen sollten frei von reifen Lymphozyten und Vorstufen sein. Da dies bei dem oft verwendeten "T-Zell-verarmten Knochenmark" nicht der Fall ist (39) wurde fetale Leber als Quelle für Stammzellen genommen. Die Feten hatten ein Alter, in dem im Thymus noch keine große Zellvermehrung und Lymphozytenausschüttung stattgefunden hat (40).

1.3.1 Thymektomie

6 Wochen alte spf Wistar-Ratten wurden über einen Evaporator (Connel 201, PITMAN-MOORE) mittels Methoxyfluoran (Penthrane^R, ABBOTT) narkotisiert, bei freigelegter Trachea unter Sichtkontrolle mit einem dünnen Siliconschlauch intubiert und künstlich beatmet (Beatmungsgerät nach Schuler, BRAUN-MELSUNGEN). Der Thorax wurde parasternal eröffnet und der Thymus stumpf herauspräpariert, ohne dessen Bindegewebskapsel zu verletzen. Anschließend wurde der Thorax wieder dicht zugenäht (Mersilene Nr. 3, ETHICON), Restluft durch Druck gegen die Beatmung ausgetrieben und der Hautschnitt geklammert (BN 507, AESCULAP).

1.3.2 Letale Bestrahlung

Nach 2-3 Wochen erhielten die thymektomierten Tiere eine Ganzkörperbestrahlung mit 950 rad in einer ¹³⁷Cs-Doppelbestrahlungsanlage (HWD 2000, GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN UND UMWELTFORSCHUNG, Neuherberg) mit besonders homogenem γ -Strahlenfeld und einer Ionendosisleistung von 125 R/min. Die Energiedosis von 950 rad wurde in Vorversuchen als sicher letal für bis zu 300 Gramm schwere Ratten bestimmt, in Übereinstimmung mit der Literatur (23,37,41). Zwei Tage vor bis 20 Tage nach der Bestrahlung wurden die Tiere durch Gabe eines Breitbandantibiotikum (Terramycin, PFIZER) 2 mg/kg x Tag im Trinkwasser geschützt.

1.3.3 Rekonstitution

4 bis 5 Stunden nach der Bestrahlung erhielten die Tiere fetale Leberzellen als Quelle für Stammzellen. Die dazu benötigten Feten stammten aus Kreuzungen von Wistar-Weibchen mit BN-Männchen und wurden am 14.-15.

Tag der Gestation entnommen. Entnahme und Präparation erfolgten unter sterilen Bedingungen auf Eis. Nach Ablösung von Uterus und Eihäuten wurde die Leber der ca. 12 mm großen Feten präpariert und die Zellen in 1% BSA/Puck-G durch leichtes Pipettieren suspendiert.

Nach Waschen mit Puck-G (100 x g, 10 min) und Wattefiltration in Pasteurpipetten wurde die Konzentration an vitalen Zellen bestimmt. 20-30 x 10⁶ fetale Leberzellen in einem Volumen von 0,1-0,5 ml wurden jedem bestrahlten Tier unter Äthernarkose nach Venaesektion in die Jugularvene injiziert. Letztere Methode erlaubt eine gegenüber intrakardialer Injektion ungefährliche und gegenüber Schwanzveneninjektion sichere und quantitative Applikation der Zellen. Die 30-Tage Überlebensrate nach Rekonstitution betrug nur 60%, was auf die hohe Infektionsanfälligkeit und die nicht spf-mäßige Haltung des bestrahlten Tiere zurückzuführen ist.

2 Zelltrennmethoden

Volumen und Oberflächenladungsdichte sind genetisch fixierte Eigenschaften einer Zelle, die sie von Zellen anderer Art oder Entwicklungsstufe unterscheidet. Entsprechend wurde 1-g Sedimentation ebenso wie Zellelektrophorese erfolgreich in der Untersuchung von Blutzellen eingesetzt (14-16, 42-54). Während die Zellsedimentation gerade bei sehr heterogenen Zellzyklusphasen (46,47) einsetzbar ist, ermöglicht es die Zellelektrophorese T- und B-Lymphozyten voneinander zu trennen (16,48-51), aber auch, verschiedene Differenzierungsstufen innerhalb einer Zellreihe zu unterscheiden (52-54).

2.1 1-g Sedimentation

In einer Flüssigkeit der Dichte ρ' und der Viskosität η sedimentieren

Partikel vom Radius r und der Dichte ρ infolge der Erdbeschleunigung g mit konstanter Geschwindigkeit:

$$s = \frac{2}{9} \frac{(\rho - \rho') g r^2}{\eta}$$

Nach einer Methode von Peterson et al. (44) und Miller et al. (55,56) lassen sich demgemäß Zellgemische, die als Suspension in dünner Schicht auf eine physiologische Lösung aufgetragen werden, innerhalb von einigen Stunden in verschiedenen Populationen auftrennen. Wenn die Dichte des Mediums weit unter der der Zellen liegt, erfolgt die Trennung im wesentlichen entsprechend Δr^2 , und Dichteunterschiede der Zellen spielen nur eine geringe Rolle. Ein flacher Gradient im Sedimentationsmedium stabilisiert dieses gegen Konvektion und Erschütterung. Eine stärkere Anfangssteigung (buffered step) wirkt dabei einem Einbrechen der aufgetragenen Zellbande (streaming) entgegen. Die Zellkonzentration ist dennoch auf 1×10^7 Zellen/ml limitiert (55).

In eigenen, vorangegangenen Arbeiten (57,58) war die Methode der 1-g Sedimentation in Hinblick auf Trennleistung und Auflösungsvermögen untersucht worden. Dabei zeigt sich unter anderem, daß die mit Latex-Partikeln ermittelte apparativ bedingte Dispersion deutlich unter der bei Zellen beobachteten biologischen Streuung liegt. Der kleinste Unterschied im Partikeldurchmesser, der zur vollständigen Trennung notwendig ist, beträgt $0,68 \pm 0,01 \mu\text{m}$. Dies erfordert allerdings einen Sedimentationsweg von mindestens 30 mm, unabhängig von der Teilchengröße.

2.1.1 Trennapparat

Nach Miller (55,56) besteht die Trennapparat aus einem zylindrischem Gefäß mit konisch zulaufendem Boden, durch dessen Öffnung die Zellsuspension und das Trennmedium eingefüllt werden und später fraktioniert

wird. In den eigenen Vorstudien (57,58) wurden Modifikationen der ursprünglichen Methode erarbeitet: Durch ein Schichten der Zellsuspension auf den vorhandenen Gradienten wird eine scharfe Anfangsbande erreicht und Trennung und Mediumzuführung voneinander unabhängig. Durch multiple Auslaßöffnungen im Boden kann das Sedimentationsgefäß vergrößert und der Zelldurchsatz dadurch erhöht werden; bei nur einer Öffnung ist nämlich der Gefäßquerschnitt durch Strudelbildung beim Ein- und Ablassen des Mediums auf ca. 300 cm^2 limitiert.

Es wurden zwei verschiedene Trennapparaturen eingesetzt. Der Versuchsaufbau mit Trennkammer A ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

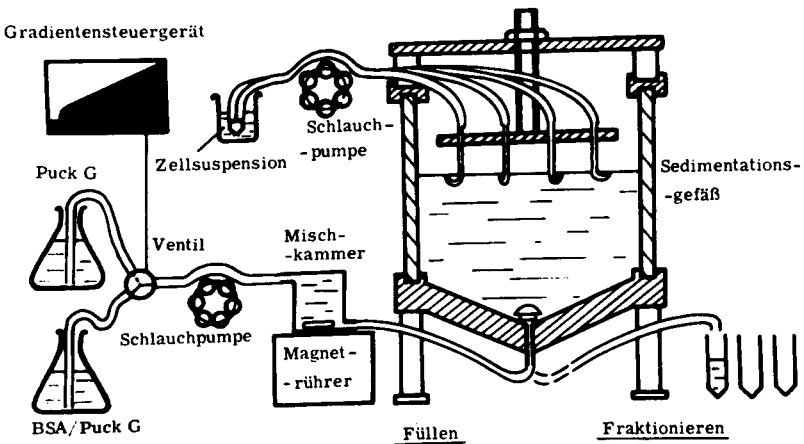


Abb. 2 Versuchsaufbau der 1-g Sedimentation mit Trennkammer A

Sie besteht aus einem Glaszylinder von 150 mm Höhe und 186 mm Innendurch-

messer, der auf einem teflonbeschichteten, konisch zulaufenden (30°) Metallboden steht. Ein Metallknopf über der zentralen Öffnung soll die Turbulenzen beim Füllen und Entleeren verringern (56). Das Auftragen der Zellsuspension erfolgt mittels einer peristaltischen Vielfachschlauchpumpe (DESAGA) über 26 gleichmäßig in der Deckelplatte verteilte Kanülen. Die Enden der Einfüllkanülen sind nach oben gebogen, um ein Einströmen der Zellen in das Sedimentationsmedium beim Auftragen der Suspension zu verhindern. Die Höhe der Deckplatte ist je nach Trennzeit und Partikelgröße verstellbar und wurde auf ein Fassungsvermögen des Sedimentationsgefäßes von 2,2 l eingestellt. Die Kammer A war gerade für die Trennung des Knochenmarks von einem Tier ausreichend. Vier derartige Trennapparaturen standen zum parallelen Betrieb zur Verfügung.

Für Arbeiten mit hohem Materialbedarf wurde eine Trennkammer B entwickelt. Sie hat einen quadratischen Querschnitt mit 400 mm Seitenlänge und einer Höhe von 110 mm. In der beschichteten Aluminium-Bodenplatte sind 64 pyramidenförmige Einsenkungen von 15 mm Tiefe, über deren zentrale Öffnung je eine Glaskugel von 14 mm Durchmesser liegt. Angeschlossen sind Schläuche, die über eine peristaltische Vielfachschlauchpumpe Ab- und Zulauf ermöglichen. Das Auftragen der Zellprobe erfolgt über 64 Kanülen in der verstellbaren Deckplatte. Das Fassungsvermögen dieser Trennkammer war auf 9,2 l eingestellt.

2.1.2 Trennbedingungen

Die Trennungen wurden bei 4°C durchgeführt, um Thermokonvektion, bakterielles Wachstum, Volumenänderungen der Zellen durch Teilung oder Wachstum und Vitalitätsverlust zu vermeiden.

Als Sedimentationsmedium diente ein Gemisch aus Kulturmedium Puck-G und

1,4% BSA in Puck-G. Beide Lösungen wurden auf pH 7,1 und eine Osmolarität von 290 mosmol, isoton zu Rattenserum, eingestellt und durch Membranfilter (SARTORIUS) der Porenweite 0,2 μm filtriert. Ein elektronisches Gradientenmischgerät (Ultragrad 11300, LKB) mischte entsprechend einer vorgelegten Schablone aus den beiden Stammlösungen einen Gradienten mit rascher Anfangssteigung (buffered step) von 0,3-0,4% und anschließendem linearen Anstieg bis 1,2% BSA. Mittels einer pulsfreien Schlauchpumpe (ISMATEC) wurde das Gemisch durch eine Mischkammer von 100 ml (bzw. 250 ml bei Trennkammer B) in das Sedimentationsgefäß gepumpt. Die Füllraten betragen 45 ml/min (bzw. 90 ml/min).

2.1.3 Probenapplikation und Fraktionierung

Die nach 1.2 präparierten Zellen wurden auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und 80 ml innerhalb von 15 min auf den Gradienten aufgetragen, (bzw. 500 ml in 30 min bei Sedimentationsgefäß B), entsprechend einer Bandendichte von 3 mm. Nach 7 Stunden Sedimentationszeit, nach der die optimale Auflösung erreicht war (58) und im Falle von Knochenmark deutlich zwei Banden zu erkennen waren, wurde fraktioniert. Die Fraktionierungszeit betrug 15 min, (bzw. 30 min). Es wurden nach einem Vorlauf 50 ml- (bzw. 200 ml-) Fraktionen gesammelt. Aus der Geometrie der Sedimentationsgefäße, der Sedimentationszeit und der Auftrags- und Fraktionierungsdauer läßt sich für jede Fraktion eine entsprechende Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel in mm/h errechnen.

2.2 Zellelektrophorese

Nach einer Methode von Hannig (59-61) können Zellen entsprechend ihrer unterschiedlichen Oberflächenladungsdichte getrennt werden. In einen

vertikal zwischen zwei Glasplatten laminar fließenden Pufferfilm wird an bestimmter Stelle kontinuierlich die Zellsuspension zugeführt. Durch ein horizontal angelegtes elektrisches Feld werden die Zellen wegen ihrer negativen Überschußladung aus der Fließrichtung mehr oder weniger stark zur Anode hin abgelenkt und können in verschiedenen Fraktionsgefäßen gesammelt werden. In Abb.3 ist die präparative trägerfreie Ablenkungs-Elektrophorese schematisch dargestellt.

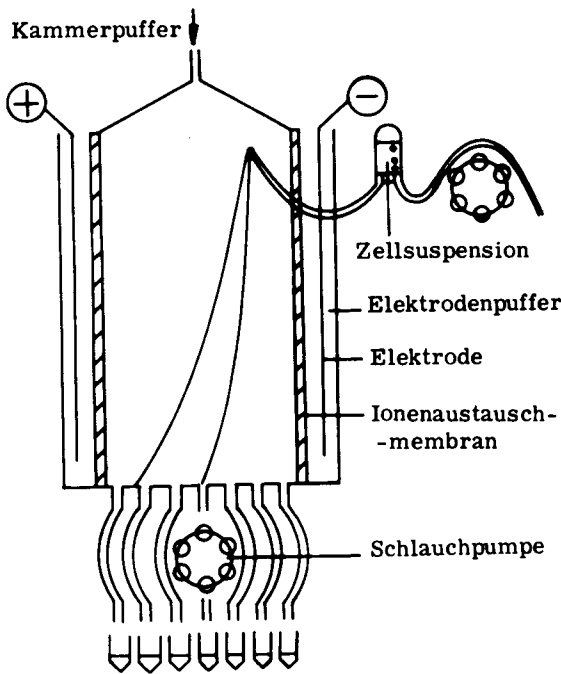


Abb.3 Versuchsaufbau der Zellelektrophorese

Die elektrophoretische Beweglichkeit (EB) der Zellen hängt wesentlich von dem Besatz ihrer Oberfläche mit Sialylsäureresten ab (62). Außerdem wird sie von einer Vielzahl methodischer Faktoren beeinflusst (63),

insbesondere von der Wahl des Trennmediums. Die Bedingungen können so gewählt werden, daß die Auftrennung unabhängig vom Volumen der Zellen nach ihrem Zetapotential (Ladungsdichte) erfolgt (64).

2.2.1 Trennapparatur

Für die Trennungen wurde ein Elektrophoresegerät vom Typ Elpho VAP FF5 (BENDER UND HOBEIN) verwendet. Um apparativ bedingte Schiefen der Histogramme zu vermeiden und um optimale Auflösung zu erreichen, wurde das Zetapotential der Glaswände in der Trennkammer durch Beschichtung mit Polylysin dem der Zellen angeglichen (65).

2.2.2 Trennbedingungen

Die Trennungen wurden unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

Kammerpuffer: 0,015 mol/l Triäthanolamin
0,01 mol/l Glukose
0,24 mol/l Glyzin
0,004 mol/l Kaliumazetat
pH 7,2 eingestellt mit Eisessig
Osmolarität 290 mosmol
Leitfähigkeit $9 \times 10^{-4} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$

Elektrodenpuffer: 0,75 mol/l Triäthanolamin
0,04 mol/l Kaliumazetat
pH 7,2 eingestellt mit Eisessig

Pufferflußrate: 550 ml/h

Temperatur: 4-5°C

elektr. Feldstärke: 80-90 mV/cm

Stromstärke: 250 mA

Testläufe mit Glutardialdehyd-fixierten Rattenerythrozyten vor und nach jeder Trennung ermöglichten die Abschätzung der apparativ bedingten Verteilungsschiefen und der Konstanz der Trennbedingungen. Sie erlaubten ferner die Standardisierung der Trennungen. Da die EB so sehr von den Versuchsbedingungen abhängig ist, ist es nämlich wenig sinnvoll Absolutwerte der Oberflächenladungsdichte anzugeben. Mit der Messung der Verteilung von fixierten Erythrozyten mit und ohne elektrischem Feld ergibt sich aber ein relativer Maßstab, der die verschiedenen Trennungen vergleichbar macht (63).

2.2.3 Probenapplikation und Fraktionierung

Zur Trennung wurden die nach 1.2 präparierten Zellen, bzw. nach 1-g Sedimentation vereinigte Fraktionen, über zwei Waschstufen (100 x g, 10 min) in Trennkammerpuffer übergeführt, dem Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen (0,3 mmol/l) zugesetzt waren (63). Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von $5-6 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt und mit einer Dosier-rate von 5 ml/h in die Trennkammer eingespritzt.

Um Zellschädigung durch die niedrige Ionenstärke des Trennmediums gering zu halten, wurde in den Fraktionsgefäßen je 1 ml BSA/Puck-G vorgelegt und die Zellen spätestens nach 1 Stunde in BSA/Puck-G überführt.

2.3 Die Kombination von Zellsedimentation und Zellelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Kombination der beiden Methoden eine zweidimensionale Trennung erreicht.

Eigene vorangegangene Versuche (57) hatten die Möglichkeit und die Ausbeute einer solchen subsequenten Trennung untersucht. Dabei hatte sich gezeigt, daß Oberflächenladungsdichte und Volumen zwei voneinander un-

abhängig verteilte Eigenschaften von Zellen sind. Jede von ihnen wird durch die vorangegangene Trennung nur geringfügig, wenn überhaupt, verändert. Die Vitalität in den untersuchten Fraktionen lag auch bei aufeinanderfolgender Trennung immer über 90%. Der Zellverlust betrug für jede Methode ca. 30% und schien nicht-selektiv zu sein.

Es wurde die Reihenfolge Sedimentation-Elektrophorese gewählt, weil durch die vorangegangene Anreicherung von Zellklassen die Trenndauer der Elektrophorese abgekürzt werden kann, was sich günstig auf die Vitalität der Zellen auswirkt.

3 Zellzahl, -vitalität, -morphologie und -volumen

3.1 Zellzahl

Zellkonzentrationen wurden mittels eines elektronischen Partikelzählgerätes (Coulter Counter Typ DN) in PBS bestimmt. Die Signalschwelle konnte so gewählt werden, daß nur kernhaltige Zellen und nicht auch Erythrozyten erfaßt wurden.

3.2 Zellvitalität

Membrangeschädigte Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau auf und lassen sich bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast gut von vitalen Zellen unterscheiden.

Im Test wurden 5 μ l der Zellprobe mit 5 μ l einer 1%igen physiologischen Trypanblaulösung gemischt und unter dem Mikroskop der Prozentsatz an blauegefärbten Zellen ausgezählt.

3.3 Zellmorphologie

Lymphozyten können von nichtlymphoiden Zellen lichtmikroskopisch unterschieden werden. Die Differenzierung wurde an Giemsa gefärbten Zellausstrichen durchgeführt. Zur deutlicheren Identifizierung von Erythroblasten wurden die Zellen zuvor mit der Benzidinreaktion auf Hämoglobin gefärbt. Dazu wurden die Ausstriche nach 20 min Einwirken von 2% Benzidin in Methanol für 1 min mit frischer 1%iger Wasserstoffperoxydlösung überschichtet und anschließend gründlich mit Wasser gewaschen. Hämoglobinhaltige Zellen zeigen dann eine grüne Farbe.

3.4 Elektronische Zellvolumenmessung

Die Widerstandsänderung, die ein durch eine Kapillare tretendes Partikel in einem elektrischen Feld hervorruft, ist direkt proportional zu seinem Volumen. Durch einen Pulshöhenanalysator, gekoppelt an ein Coulter-Gerät, lassen sich von einer Zellsuspension Impulse verschiedener Amplitude messen, die elektronisch in getrennten Kanälen gespeichert werden können. Über eine Eichung mit Partikeln bekannter Größe kann man jedem Kanal ein bestimmtes Volumen zuordnen.

3.4.1 Messung

Die Messungen fanden nach der hydrodynamischen Fokussierungsmethode (66) in einem "Metricell" Volumenanalysator (67) bei Raumtemperatur statt. Gemessen wurde mit einer Meßöffnung von 70 μm Durchmesser und einem Strom von 1,2 mA. Die Zellen befanden sich während der Messung in isotonem Kulturmedium Puck-G von pH 7,2.

An den Detektor (MS KV 1-1105/1, AEG-TELEFUNKEN) war ein 256-Vielkanalanalysator (MS VAS 1105, AEG-TELEFUNKEN) und ein XY-Schreiber (HEWLETT)

angeschlossen. Zur Bestimmung der absoluten Zellvolumina wurde das System mit Polystyren-Partikel von 5 und 7,9 μm Durchmesser geeicht (PARTICLE TECHNOLOGY INC.).

3.4.2 Auswertung der Histogramme

Die im Analysator erhaltenen Volumenhistogramme stellen die Summe der in der Probe enthaltenen Zellpopulationen definierten Volumens dar. Durch den Vergleich der Volumenverteilungen in den verschiedenen Fraktionen der Zelltrennung ergibt sich die unveränderte Position dieser einzelnen Populationen bei verändertem Anteil an der Gesamtzellzahl.

Die Auswertung erfolgte mit einem Rechner (9820A HEWLETT-PACKARD CO.), verbunden mit einem Schreiber und einem Computer (4004-150, SIEMENS CORP.). Die experimentellen Histogramme wurden auf gleiche Fläche oder gleiche Peakhöhe gebracht und ihnen Normalverteilungen angenähert, durch eine Methode von wiederholtem "Versuch und Irrtum" (68). Die einzelnen Normalkurven, ihre Summe und ihr Parameter wurden ausgedruckt und so lange verändert, bis errechnete und experimentelle Kurve weitgehend übereinstimmten.

3.4.3 Fehlerquellen

Fehler bei der Volumenmessung können entstehen durch Koinzidenzen, Aggregate, tote Zellen und Veränderungen von pyhsiologischem Volumen und Membranleitfähigkeit der Zellen.

Koinzidenzen, d.h. gleichzeitiger Durchtritt mehrerer Partikel durch die Meßöffnung, wurden durch eine niedere Durchflußrate von 500 - 1000 Zellen/sec klein gehalten (67). In Fraktionen mit hohem Anteil an Erythrozyten verursachen deren Aggregate die Verschiebung der Leukozyten-

Volumenverteilungen. Nach Bestimmung der Volumina von Zweier-, Dreier-, Vierer- und Fünfer-Aggregaten an inkubierten Blut-Erythrozyten und ihrer Auszählung in den gemessenen Fraktionen, konnten sie rechnerisch von der experimentellen Kurve abgezogen werden. Diese Korrektur erschien vorteilhafter als die chemische oder physikalische Eliminierung der roten Blutkörperchen.

Der Anteil toter Zellen ist in den Separationen mit höchstens 10% relativ gering. Sie lassen eine leichte Rechtsschiefe der Volumenverteilungen erwarten. Um die Veränderung des physiologischen Volumens und der Membranleitfähigkeit abzuschätzen, wurden in Vorversuchen ungetrennte Knochenmarks- und Lymphknotenzellen in den Separationsmedien entsprechende Zeiten inkubiert. Die dabei beobachtete geringe Meßimpulsverringerung um etwa 8% schien für alle Zellen gleichmäßig zu gelten, wie auch von anderen Autoren beschrieben (69).

4 Biochemische und biologische Eigenschaften

4.1 DNS-Stoffwechsel

Die Teilungsaktivität von Zellen kann durch Messung des Einbaues von radioaktivmarkiertem Thymidin in deren DNS abgeschätzt werden.

Die Zellen wurden in Kulturmedium RPMI 1640, welches 10% fetales Kälberserum enthielt, suspendiert. Zu 5×10^6 kernhaltigen Zellen in 1 ml wurden $0,285 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Thymidin (60 mCi/mMol, RADIOCHEMICAL CENTRE AMERSHAM) in $100 \mu\text{l}$ gegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C in einem CO_2 -Inkubator (FORMA SCIENTIFIC) wurden die Proben mit eiskaltem 5%igem TCA gefällt, filtriert ($0,45 \mu\text{m}$ Porengröße, SARTORIUS) und in einem Scintillationszähler (PACKARD) die eingebaute Radioaktivität bestimmt.

4.2 Fc-Rezeptoren

Einige Zellen können Immunglobulin über dessen Fc-Teil binden, wenn es als Antigen-Antikörper-Komplex vorliegt (1). Verwendet man Erythrozyten als Antigen, so lassen sich Zellen mit Fc-Rezeptoren durch "Rosettenbildung" nachweisen.

Ein Erythrozyten-Antikörper Komplex (EA) wurde aus Hammelerythrozyten (SRBC, BEHRINGWERKE) und anti-SRBC Immunglobulin aus Kaninchen (6 Wochen je 1 Injektion von 1×10^9 SRBC in 2 ml i.v., inakt., DEAE-Fraktionierung) hergestellt (70). Hierzu wurde das anti-SRBC Immunglobulin entsprechend eines Hämagglutinationstestes subagglutinierend verdünnt (1:32) und 1 ml davon mit 1 ml frischen, gewaschenen 5%igen (v/v) SRBC inkubiert. Nach 1 Stunde bei 37°C wurde der EA zweimal mit Puck-G gewaschen und auf eine Konzentration von 5% (v/v) gebracht.

0,3 ml dieser EA-Präparation wurde mit 1×10^6 Zellen aus der Separation in 0,2 ml Volumen vereinigt, zentrifugiert und das Sediment für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach vorsichtigem Resuspendieren in Puck-G Lösung wurden die gebildeten Rosetten, d.h. Zellen mit mehr als 2 angelagerten Erythrozyten, im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit Erythrozyten, die statt mit Antiserum mit physiologischer Kochsalzlösung (PBS) behandelt worden waren. Im Gegensatz zu Humanlymphozyten bilden Rattenlymphozyten mit SRBC spontan keine Rosetten.

4.3 Intrazelluläres Immunglobulin

In unreifen B-Zellen läßt sich im Gegensatz zu reifen B-Zellen Immunglobulin im Cytoplasma nachweisen (71,72). Dazu muß die Zellmembran durch Fixierung für fluoreszenzmarkierte Antikörper durchlässig gemacht werden.

Luftgetrocknete Zellausstriche verschiedener Fraktionen der 1-g Sedimen-

tation wurden 15 min mit einer 5%igen Lösung von Eisessig in 96%igem Äthanol fixiert. Anti-Ratten-Ig Antiserum wurde in Kaninchen durch wiederholte Injektion s.c. von 5 mg durch Sephadex G-150 Gelchromatographie gereinigtes Ratten-IgG gewonnen. Das Antiserum wurde ausgiebig mit Erythrozyten, Leberhomogenat und Thymozyten aus Ratten absorbiert. Es wurden $F(ab')_2$ -Fragmente der IgG-Fraktion hergestellt (siehe 5.1.3) und mit FITC gekoppelt (siehe 5.1.4).

Als Kontrolle für unspezifische Färbung des Cytoplasmas wurde rhodaminmarkiertes Rinder-IgG (TRITC-BGG, NORDIC) zur Gegenfärbung zuge-mischt. Ein Tropfen dieses Ansatzes (1mg/ml FITC-anti-Ig, 0,5 mg/ml TRITC-BGG) wurde auf den Zellausstrich gebracht, mit einem Deckgläschen bedeckt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen für 15 min mit Puck-G Lösung wurde das gekennzeichnete Feld des Objektträgers im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.4 Nachweis von Stammzellen (CFU-S)

Nach Injektion einer begrenzten Zellzahl von syngeneischem Knochenmark in letal bestrahlte Mäuse entwickeln sich in der Milz des Empfängers abgegrenzte Zellkolonien, die von je einer einzelnen pluripotenten Stammzelle ihren Ursprung nehmen (73). Dieser für die Maus entwickelte Test ist auch auf die Ratte anwendbar (23,41), wenn auch mit geringerer Deutlichkeit.

8 Wochen alte, männliche Wistar-Ratten wurden letal bestrahlt (siehe 1.3.3). Es wurden ihnen zwischen $0,25$ und 10×10^6 Zellen von ungetrenntem bzw. getrenntem Wistar-Knochenmark in $0,5$ ml i.v. (siehe 1.3.4) injiziert. Gruppen von je 3 Tieren wurden mit gleicher Zellpräparation und -konzentration behandelt.

Nach 12 Tagen wurden die Milzen entnommen und sogleich auf Kolonien untersucht. Auch Milzgewicht, Thymusgewicht und rote und weiße Blutzell-

zahlen wurden ermittelt (23), doch nur die Milzkolonienzahl zeigte eine strenge Dosisabhängigkeit. Für diese Versuche fanden Zellpräparation und -trennungen unter sterilen Bedingungen statt.

5 Oberflächenantigene

5.1 Antiseren

Werden einem Tier artfremde Zellen injiziert, so bildet es Antikörper gegen die als fremd erkannten Oberflächenstrukturen. Verschiedene Zellen eines Organismus unterscheiden sich als Folge selektiver Genwirkung, entsprechend verschiedener Funktion, Reifungs- und Aktivierungsgrades in solchen Oberflächendeterminanten. Dies ergibt sich wohl daraus, daß zu einem großen Teil Zellfunktion, -kommunikation, -regulation und Organverteilung über die Plasmamembran vermittelt werden. Andererseits ist für keines der durch Antiseren beschriebenen Differenzierungsantigene, die aus Glyko- und Lipoproteinkomplexen bestehen, bisher eine Funktion bekannt. Mit ihrer Hilfe lassen sich aber morphologisch einheitliche Zellen wie Lymphozyten in funktionelle Untergruppen klassifizieren (1,74-76).

Ein für eine bestimmte Zellart spezifisches Antiserum erhält man, wenn man aus dem durch Immunisierung gewonnenen Gemisch an Spezifitäten durch Inkubation mit geeigneten Zellen Antikörper unerwünschter Spezifität herausabsorbiert.

Zur Charakterisierung von Rattenlymphozyten finden vorwiegend Xenoserumantiseren, d.h. in einer anderen Tierart induzierte Antikörper, Anwendung (40). Alloantiseren, die durch Immunisierung zwischen verschiedenen Rattenstämmen gewonnen werden, spielen dagegen nur eine geringe Rolle, im Gegensatz zur Maus, bei der eine Reihe von lymphozytenuntergruppenspezifischen Alloantigenen beschrieben ist (77).

5.1.1 Xenoantiseren

Es standen nach Zeiller und Pascher (78) bereitete Antiseren (IgG) zur Verfügung. Dabei werden für Immunisierung, Absorption und Spezifitätstestung elektrophoretisch getrennte Lymphozyten verwendet, wie Tabelle 1 zeigt.

"H" steht hier für hohe elektrophoretische Beweglichkeit (hohe EB) und entspricht in Milz und Lymphknoten (Lk) reifen T-Zellen. Der L-Bereich (niedere EB) enthält in den peripheren lymphatischen Organen die B-Zellen, im Thymus die kleinen, cortisonempfindlichen, kortikalen Thymozyten. Entsprechend der guten Trennbarkeit von T- und B-Lymphozyten in der Zellelektrophorese sind die damit hergestellten Antiseren sehr spezifisch.

RBLA ist ein Ratten B-Zell-spezifisches Antigen, das auf reifen und unreifen B-Zellen gefunden wird. Ein vergleichbares Antiserum kann auch durch Immunisierung mit Ductus-Thoracicus-Lymphe (TDL) (79) oder Lymphozyten aus T-Zell-verarmten Ratten (80) und Absorption mit T-Zellen gewonnen werden. Das Antigen ist unabhängig von Oberflächeninmunglobulin, da Zusatz von Ratten-Ig keine Titer-senkung des Antiserums zur Folge hat.

RTLA und RHLA sind T-Zell-spezifische Antigene. RTLA wird auf peripheren T-Lymphozyten, aber auch auf den T-Reifungsstufen im Thymus gefunden. Eine vergleichbare Spezifität wurde von anderen Autoren (25,79-81) nach Immunisierung mit TDL und Absorption mit B-Zell-Präparationen, oder Immunisierung mit Thymus und Absorption mit Knochenmark erhalten. Die RHLA-Spezifität verbleibt nach Absorption mit elektrophoretisch langsamen, kortikalen Thymozyten und ist gegen reife T-Zellen und eine elektrophoretisch schnelle Thymozytenpopulation gerichtet (78). Am ehesten entspricht diese Spezifität dem auf T-Zellen und medullären Thymozyten, allerdings erst nach Manipulationen nachweisbaren "rat masked

SPEZIFITÄT DER ANTISEREN

ANTISERUM	REAGIERT MIT ZELLEN AUS					MAUS THYMUS	
	THYMUS-H	THYMUS-L	MILZ/LK-H	MILZ/LK-L	HIRN	AKR	C3H
ANTI- THY-1	(+)	+	-	-	+	+	+
ANTI- THY-1.1	(+)	+	-	-	+	+	-
ANTI- R _S THY-1	(+)	+	-	-	+	-	-
ANTI- RTHVA	+	+	-	-	-	-	-
ANTI- RTLA	+	+	+	-	-	-	-
ANTI- RHLA	+	-	+	-	-	-	-
ANTI- RBLA	-	-	-	+	-	-	-

HERSTELLUNG DER ANTISEREN

ANTISERUM	IMMUNISIERUNG MIT	ABSORPTION MIT
ANTI- THY-1	THYMUS	ERY, LEBER, MILZ/LK
ANTI- THY-1.1	THYMUS	ERY, LEBER, MILZ/LK, C3H MAUS THYMUS
ANTI- R _S THY-1	THYMUS	ERY, LEBER, MILZ/LK, AKR MAUS THYMUS
ANTI- RTHVA	THYMUS	ERY, LEBER, MILZ/LK, HIRN
ANTI- RTLA	MILZ/LK-H	ERY, LEBER, MILZ/LK-L
ANTI- RHLA	MILZ/LK-H	ERY, LEBER, MILZ/LK-L, THYMUS-L
ANTI- RBLA	MILZ/LK-L	ERY, LEBER, MILZ/LK-H

Tab.1 Schema über Spezifität und Herstellung der verwendeten Antiseren

Thymus-H = Thymozyten hoher EB ≙ medulläre Thymozyten
 Thymus-L = " niederer EB ≙ kortikale Thymozyten
 Milz/Lk-H= Milz+Lymphknotenzellen hoher EB ≙ T-Zellen
 Milz/Lk-B= Milz+ " " " niederer EB ≙ B-Zellen

thymocyte antigen" (82).

Thy-1 bezeichnet einen Antigenkomplex, der in Thymus und Hirn von Ratte und Maus angetroffen wird (83-91). Ursprünglich wurde er mit den allo-genen Determinanten Thy-1.1 (Θ -AKR) und Thy-1.2 (Θ -C3H) bei der Maus beschrieben (83), wo er als T-Zell-Marker verwendet wird. Im Gegensatz zur Maus findet sich das Thy-1 Antigen bei der Ratte nicht auf reifen T-Lymphozyten (84-86). Außerdem wird bei der Ratte nur die eine der beiden Allo-Spezifitäten angetroffen, nämlich Thy-1.1, weswegen Xenoanti-seren Verwendung finden. Dabei zeigen sich Kreuzreaktionen zwischen Ratte und Maus, also artunabhängige Determinanten, Thy-1. Es lassen sich aber auch rattenspezifische Thy-1 Spezifitäten nachweisen, R_s Thy-1. Diese artspezifischen, nicht-artspezifischen und rassenspezifischen Deter-minanten sitzen auf ein und demselben Molekül (85-86). Das Thy-1 Antigen ist aus Thymozyten und Hirn isoliert und biochemisch charakterisiert worden (88-90).

Neben diesem aus anti-Thymozyten Antiserum gewonnenen anti-Thy-1 mit den Unterspezifitäten wurde besonders für die Immunfluoreszenz ein anti-Hirn Antiserum gleicher Spezifität hergestellt. Dazu wurde 10 mal in wöchentlichem Abstand das Hirn einer Ratte nach Quirlen, Wattenfil-tration und Waschen (zweimal, 100 x g, 10 min. in Puck-G) in 2 Kanin-chen (weibl., Weisse Wiener, ca. 3kg) i.p. injiziert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Kaninchen durch die Ohrvene per Vakuum entblutet, das Serum bei 56°C 30 min inaktiviert und die IgG-Fraktion gewonnen (91). Die Präparation zeigt in Immunelektrophorese und Disk-Gelektrophorese eine einzelne Bande von Ig. Das anti-Hirn Immunglobulin wurde 1/10 verdünnt (2 Stufen vor dem Titerabfall gegen Thymozyten), und mit 1/10 Volumen gepackter Rattenerythrozyten, 1/10 Volumen Rattenleberhomogenat und 1/10 Volumen Rattenlymphknotenzellen

absorbiert.

RThyA ist ein weiteres thymozytenspezifisches Antigen. Wenn man anti-Thymozyten Antiserum, das nach Lk-Absorption im wesentlichen gegen Thy-1 gerichtet ist, mit Hirn absorbiert, so bleibt eine Restaktivität gegen Thymozyten übrig; allerdings nur, wenn nicht mit verdünnten, sondern mit dem konzentrierten Serum gearbeitet wird (76). Dieses als RThyA bezeichnete Spezifität unterscheidet sich deutlich vom Thy-1 Komplex:

- 1) Es gibt keine Kreuzreaktion mit Hirn
- 2) Es gibt keine Kreuzreaktion mit Maus-Thymozyten, ist also art-spezifisch.
- 3) Elektrophoretisch schnelle und langsame Thymozyten zeigen gleiche Absorptionskapazität für anti-RThyA Antiseren, wogegen ihr Gehalt an Thy-1 Antigen verschieden ist (78,92).

In eigenen unveröffentlichten Arbeiten konnte ferner ihre molekulare Unabhängigkeit gezeigt werden:

- 4) Mit anti-Thy-1 Antikörpern beladene Zellen (Thymus, Knochenmark) haben die gleiche Absorptionskapazität für anti RThyA wie unbehandelte Zellen. Umgekehrt binden anti-RThyA Antikörper beladene Zellen ebensoviel anti-Thy-1 Antiserum wie nicht-inkubierte (negativer "blocking test" nach Boyse (93)).
- 5) Thy-1 Antigen und RThyA zeigen nach Reaktion mit den betreffenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern unabhängige Verteilungsmuster auf der Zelloberfläche (negatives "co-capping" Phänomen (85,94)).

5.1.2 Alloantisera

Für den Nachweis von Spenderzellen in den rekonstituierten Ratten mußte ein rassenspezifisches Antiserum hergestellt werden. Hierzu wurden weibliche Wistar-Ratten (H-1^W) in wöchentlichem Abstand 10-20 mal mit Milz-

zellen aus BN-Ratten (H-1ⁿ) immunisiert. Die Milzen wurden gequirilt, durch Gaze filtriert und zweimal in Puck-G gewaschen (100 x g, 10 min). Die Zellsuspension wurde mit gleichem Volumen an kompletten Freundschens Adjuvans (DIFCO) gemischt und durch 50 maliges Aufziehen in zwei Plastikspritzen, die durch einen dünnen Schlauch verbunden wurden, luftblasenfrei eine Emulsion hergestellt. Jedem Tier wurde eine Menge s. c. injiziert, die etwa 2×10^7 Zellen entsprach. Den immunisierten Tieren wurde via V. jugularis (siehe 1.3.3) Probeblut entnommen und der cytotoxische Titer gegen Wi/BN Lk-Zellen bestimmt. War das Serum noch in einer Verdünnung von 1/128 aktiv, wurde das Tier entblutet. Um eine hohe Serumausbeute zu erreichen und um Hämolyse gering zu halten wurde in Äthernarkose die Aorta abdominalis freigelegt, mit einem dünnen Teflonschlauch punktiert und das Blut in einem Zentrifugenglas aufzufangen. 6-7 ml Serum konnten so pro Tier gewonnen werden. IgG wurde über eine Sephadex G-150 Säule daraus isoliert. Mit Immunelektrophorese und Disk-Gelelektrophorese wurde die Reinheit der Präparationen überprüft. Ein solches Antiserum ist im wesentlichen gegen die Antigene des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (H-1) gerichtet (95).

5.1.3 Präparation von F(ab')₂

Zellaggregation und unspezifische Bindung über den Fc-Teil der Immunglobuline lassen sich vermeiden, wenn man in die Antigen-Antikörperreaktionen Ig-Fragmente einsetzt. Dazu wurde aus den für Immunfluoreszenz verwendeten Antiseren F(ab')₂ Präparationen hergestellt (96). Die IgG-Präparationen wurden auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml in 0,1 M Natriumazetat Puffer eingestellt und durch Zugabe von 2% Pepsin (BOEHRINGER) bei pH 4,3 verdaut (8 h, 37°C). Die F(ab')₂-Fragmente wurden durch Gelfiltration über eine Sephadex G-150 Säule

gewonnen.

5.1.4 FITC- und TRITC-Kopplung

Für qualitative und quantitative Immunfluoreszenz wurden die $F(ab')_2$ -Präparationen der verwendeten Antiseren mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), ein anti-Thy-1-Antiserum auch mit Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC) gekoppelt (97). Je 10 mg Protein wurden mit 200 µg FITC (Isomer 1, NORDIC), bzw. TRITC (Isomer R, NORDIC) in 0,15 M Na_2HPO_4 Puffer von pH 9,5 für 1 Stunde bei 25°C inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde über Sephadex G-25 entfernt. Es ergab sich ein Verhältnis von 3-4 Farbstoffmolekülen pro Antikörpermolekül (F/P Quotient).

5.3 Qualitativer Nachweis von antigenträgenden Zellen

Die Reaktion der Antiseren mit den komplementären Oberflächenantigenen kann auf verschiedene Weise sichtbar gemacht werden. So führt sie in Gegenwart von Komplement zur Zerstörung der Zellmembran, was sich in einer Durchlässigkeit für den Farbstoff Trypanblau ausdrückt. Die an die Zelle gebundenen Antikörper können aber auch unter UV-Licht im Mikroskop nachgewiesen werden, wenn sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

5.3.1 Direkte Immunfluoreszenz

Bei der direkten Immunfluoreszenz die hier angewandt wurde, ist der Farbstoff chemisch an den Antikörper gekoppelt. Diese Methode liefert zwar geringere Fluoreszenzintensitäten, besitzt aber höhere Spezifität als die indirekte "Sandwich"-Methode, bei der die an die Zelle gebundenen Antikörper durch Reaktion mit einem zweiten, fluoreszenzmarkierten Anti-

serum nachgewiesen werden, das gegen den ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Spezifität der FITC- bzw. TRITC-markierten Antiseren (F(ab')₂-Präparationen) wurde mit elektrophoretisch getrennten Zellen überprüft und der noch gut auswertbare Grenztiter bestimmt. $0,25 \times 10^6$ kernhaltige Zellen wurden mit 20 μ l der jeweiligen Antikörperverdünnung in 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert (30 min, 4°C), zweimal mit 400 μ l Puck-G gewaschen (100 x g, 5 min) und schließlich in 20 μ l suspendiert. Der Prozentsatz an markierten Zellen wurde in einem Fluoreszenzmikroskop (ZEISS) im Auflicht bestimmt.

Durch Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung können zwei verschiedene Antigene auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Hierfür werden die Zellen zuerst mit einem FITC-markierten Antiserum inkubiert und anschließend mit dem TRITC-gekoppelten anti-Thy-1 (Hirn) Antiserum. Im Mikroskop konnte durch verschiebbare Filter schnell und eindeutig zwischen Rhodamin- und Fluoreszein-Fluoreszenz unterschieden werden.

5.3.2 Cytotoxizitätstest

Die Komplement-abhängige Cytolyse wurde mit den IgG-Präparationen der Antiseren durchgeführt. Die zu untersuchende Zellprobe wurde auf eine Konzentration von 15×10^6 kernhaltigen Zellen/ml eingestellt. 5 μ l davon wurden auf Mikrotiterplatten mit 5 μ l des jeweiligen Antiserums, bzw. Kaninchennormalserums als Kontrolle, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 μ l frisches, Rattenmilz-adsorbiertes und verdünntes Meerschweinchenkomplement (BEHRINGWERKE) zugesetzt, gemischt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 μ l physiologischer, 1%iger Trypanblaulösung wurde der Prozentsatz

an farbstoffhaltigen Zellen im Antiserumansatz A und im Kontrollansatz K im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Durch Korrektur mit dem Leerwert erhält man den Cytotoxischen Index

$$C.I. = \frac{100 (A-K)}{100 - K},$$
 der angibt, wieviel Prozent der untersuchten

Zellen durch das betreffende Antiserum lysiert wurden.

5.4 Quantitativer Vergleich der Antigenmengen auf der Zelloberfläche

Bei der Untersuchung der Zelloberfläche stellt sich nicht nur die Frage, ob eine Zellart ein bestimmtes Antigen besitzt, sondern auch in welchem Ausmaße. Quantitative Unterschiede in der Aufnahme von Antikörpern können durch unterschiedliche Größe der Zelloberfläche, Antigen-Antikörper-Bindungsstärke oder Antigendichte bedingt sein.

Es wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, um die Antigenmengen auf verschiedenen Zellen zu vergleichen.

5.4.1 Durchfluß-Cytofluorometrie

Die Durchfluß-Cytofluorometrie bietet die Möglichkeit der Messung von Fluoreszenzintensitäten an Einzelzellen (98). Die markierten Zellen werden dabei in einem feinen Flüssigkeitsstrahl an einer eng fokussierten Lichtquelle vorbeigeleitet und die angeregte Fluoreszenz als Einzelsignal jeder Zelle durch einen Photomultiplier gemessen. Gleichzeitig kann durch einen zweiten Detektor das durch die Zelle verursachte, u.a. zellvolumenabhängige Streulicht erfaßt werden (das die gleiche Frequenz wie das Anregungslicht besitzt). Die gemessenen Fluoreszenzsignale werden über einen Pulshöhenanalysator in einen Vielkanalspeicher gegeben und ausgedruckt. Es ergibt sich die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten für die jeweilige Zellprobe. Die Form dieser Histogramme ist ein

charakteristisches Merkmal der untersuchten Zellen, aber auch des verwendeten Antiserums. Ist der Intensitätsgipfel deutlich außerhalb des exponentiell abfallenden Rauschens (unspezifische Färbung) und ist die Verteilung einigermaßen symmetrisch, so läßt sich eine mittlere Fluoreszenzintensität für die jeweilige Zellpopulation angeben.

Die Messungen wurden an einem in der Abteilung (unter der Leitung von Herrn Dipl.Phys. L.Voet) gebauten Cytofluorometer durchgeführt. Die Anregung erfolgte durch einen 5 Watt Argon Laser (Typ 16 405, SPECTRA PHYSICS) mit 0,8-1 Watt bei 488 nm. Vor den Photomultiplier (Typ C 31034, RCA) waren für die FITC-Messung zwei Interferenzfilter (LP 520 und KP 560, ZEISS) geschaltet. Zur Vermeidung von Koinzidenzen und Verstopfung der Düse ($80 \mu\text{m}$ ϕ) wurde die Durchflußrate unter 1000 Zellen/sec gehalten. Für jede Meßreihe wurde das Gerät mit FITC-markierten Latex-Partikeln ($0,8 \mu\text{m}$ Durchmesser, DUKE SCIENTIFIC CORP.) geeicht, um die Versuchsbedingungen zu standardisieren. Dabei wurde als Maß für das apparative Auflösungsvermögen in den gemessenen Intensitätsbereichen ein Variationskoeffizient von 12% gefunden.

Die Bindungsverhältnisse zwischen fluoreszierenden Antikörpern und Zelloberflächenantigenen sind abhängig von ihrem Verhältnis im Reaktionsansatz. Deshalb reicht eine Messung bei willkürlichem Verhältnis von Antiserum zu Zellen nicht aus. Nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich für die Reaktion zwischen Antikörper und Antigen theoretisch eine sigmoidale Sättigungskurve, wenn man die Konzentration des gebildeten Komplexes (Fluoreszenzintensität) gegen den Logarithmus der eingesetzten Antikörpermenge aufträgt.

Die Messung der gesamten Kurve stößt auf erhebliche Schwierigkeiten. Der mittlere, annähernd lineare Anteil ist jedoch gut meßbar. Die Steigung

und Lage dieser Regressionsgeraden erlaubt den Vergleich des Antigenbesitzes verschiedener Zellarten. Unspezifische Bindung von Antikörpern, z.B. durch tote Zellen, ist gekennzeichnet durch sehr geringe Steigung der Geraden.

Für die Messung bei verschiedenem Verhältnis von Antiserum zu Zellen erwies es sich als unerheblich, welche der beiden Größen man variierte. So wurden 20 μ l des FITC-markierten anti-Thy-1 (Hirn) bzw. anti-H-1ⁿ Antiserums mit 0,25, 0,5, 1,2 und 4 x 10⁶ Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert oder 1 x 10⁶ Zellen mit 5, 10, 20, 40 und 80 μ l Antiserum inkubiert. Nach zwei Waschungen mit 0,5 ml PBS für je 5 min bei 100×g wurden die Zellen in 0,5 ml PBS suspendiert und durch wenig Watte filtriert. Auch die Hüllflüssigkeit für den Zellsuspensionstrahl im Cytofluorometer war PBS.

Um die Zahl der registrierten Pulse einzuschränken, wurden Fluoreszenz und Streulicht koinzident gemessen und für Streulicht eine Schwelle gesetzt, sodaß nur die Fluoreszenz von Partikeln mit mindestens Zellgröße gemessen wurden.

5.4.2 Absorptionsstudien

Ein weiteres Maß für den Besitz bestimmter Oberflächenantigene ist der Verlust an cytotoxischer Aktivität eines Antiserums durch Absorption mit den zu untersuchenden Zellen. Die Spezifität des Antiserums ist dabei durch die verwendeten Zielzellen gegeben, gegen die die verbleibende Aktivität getestet wird.

Die Antikörperbindungskapazität wurde nach einer Methode nach Colley (99) bestimmt. Dazu wurden die Zellen bei 150×g für 7 min zentrifugiert, das gepackte Zellvolumen gemessen und nach Resuspension in Puck-G mittels

Hamilton-Pipetten Proben abgefüllt, die 5 μ l, 2,5 μ l usw. Zellsediment entsprachen. Diese Proben wurden in 1 ml-Eppendorf-Gefäßen abzentrifugiert und dem Sediment je 50 μ l des bis zum Grenztiter verdünnten Antiserums zugefügt. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C wurde der Überstand von den Zellen wieder getrennt (150 x g, 7 min) und darin der cytotoxische Index gegenüber den antiserumspezifischen Zielzellen entsprechend 5.3.2 bestimmt.

C ERGEBNISSE

1 Trennprofile, Zellvolumen und Morphologie

1.1 Zellsedimentation

Knochenmark trennte sich in der 1-g Sedimentation in zwei deutlich sichtbare Banden auf. Die entsprechende bimodale Trennkurve in Abb.3 zeigt einen Gipfel bei einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 3,1 mm/h und

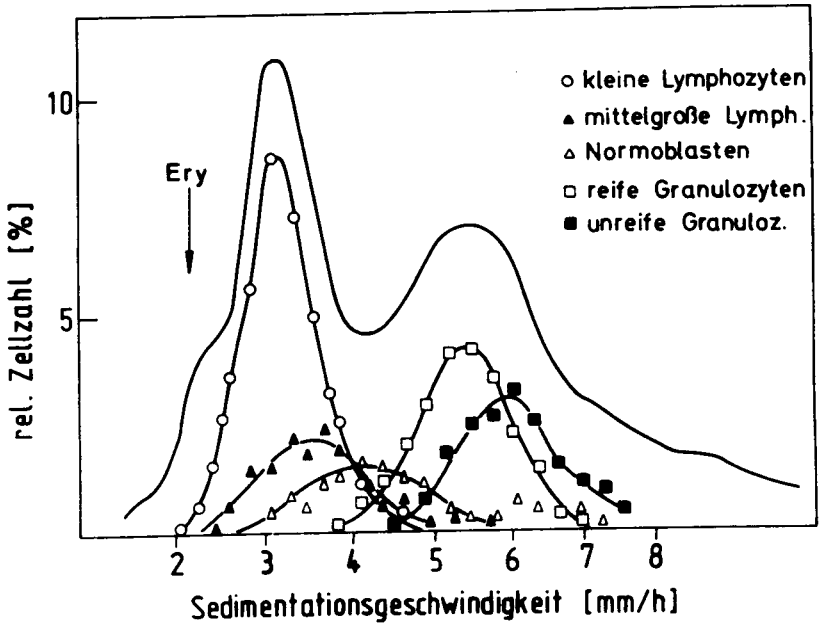


Abb.3 Verteilung von Knochenmarkszellen verschiedener Morphologie in der Zellsedimentation

Die Morphologie wurde in Zellausstrichen nach Benzidin- und Giemsa-Färbung beurteilt.

einen bei 5,7 mm/h. Die Lage dieser Peaks war in über 100 Versuchen konstant, nur ihre relative Höhe schwankte, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Gesundheitszustand der Tiere. In Versuchen mit Ratten im Alter von 2 Tagen, 2 Wochen, 2 Monaten und 1 Jahr erwies sich das Sedimentationsprofil von Knochenmark als altersunabhängig.

Bei 2,2 mm/h zeigt die Kurve eine Schulter, verursacht durch die Verteilung der Erythrozyten und toter Zellen. In allen Fraktionen über 2,4 mm/h war die Zellvitalität größer als 80%.

Da das Knochenmark morphologisch unterscheidbare Zellen enthält, konnte in jeder Fraktion deren Anteil lichtmikroskopisch bestimmt werden. Wie in Abb.3 zu sehen, zeigten sich die einzelnen Zellpopulationen im Sedimentationsprofil an bestimmter Stelle als angenäherte Normalverteilungen, mit einem Variationskoeffizienten V von 30%, bzw. 40% für die Normoblasten. Der Gipfel bei hoher Sedimentationsgeschwindigkeit wird demnach im wesentlichen durch Zellen der Myelopoese (Myeloblasten, Myelozyten, Segmentkernige) gebildet. Hämoglobinhaltige Erythrozytenvorstufen (Erythroblasten, Normoblasten) zeigten eine breite Verteilung um 4,1 mm/h. Der Peak langsam sedimentierender Zellen besteht vorwiegend aus Lymphozyten.

Im Bereich zwischen 2,7 und 3,6 mm/h sind 80-90% der Lymphozyten des Knochenmarks enthalten und zu 90% angereichert. Schon lichtmikroskopisch ließen sich kleine und mittelgroße Lymphozyten unterscheiden.

Um die Volumina der Knochenmarkszellen zu bestimmen, wurden in den Fraktionen die Partikelgrößen elektronisch gemessen. Im Bereich niedriger Sedimentationsgeschwindigkeit wurde der Anteil von Erythrozyten und Erythrozytenaggregaten an der Meßkurve abgezogen. Abb.4 zeigt die Volumenhistogramme der einzelnen Fraktionen (punktierte Linie).

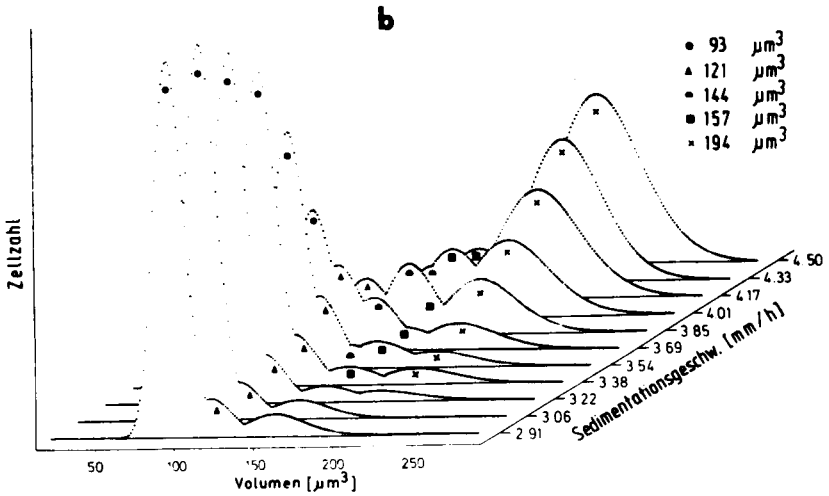
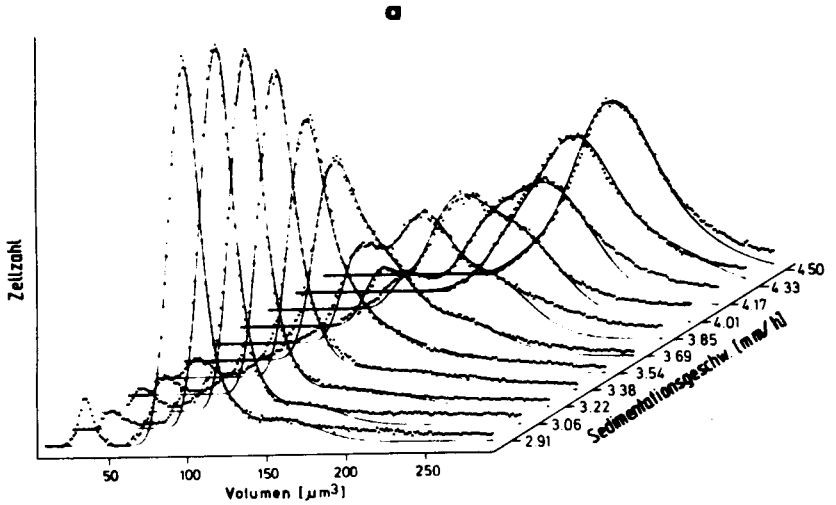


Abb.4a und b Volumensverteilungen von Knochenmarkszellen verschiedener Sedimentationsgeschwindigkeit

- a) experimentelle Volumenhistogramme der Fraktionen (punktier-
te Linie) und Summe der angepaßten Kurven (durchge-
zogene Linie)
- b) die einzelnen Normalverteilungen, die den Volumenhisto-
grammen angepaßt wurden

Im Gegensatz zu den relativ einheitlichen Plastikpartikeln (58) zeigten die Knochenmarkszellen nicht eine gleichmäßige Abnahme des Volumens mit steigender Fraktionsnummer, sondern eine Veränderung in diskreten Schritten. Das Volumenprofil einer Fraktion war gegenüber der vorherigen Fraktion nicht nur verschoben, sondern in seiner Form verändert. Es zeigten sich Gipfel und Schultern in konstanter Position. Das einzelne Volumenhistogramm erschien zusammengesetzt aus Volumenpopulationen, deren Lage jeweils identisch war, deren prozentualer Anteil aber von Fraktion zu Fraktion sich änderte.

Es wurden daher den Histogrammen Normalverteilungen angepaßt (Abb.4b), deren Summe die experimentelle Kurve ergab (Abb.4a, durchgezogene Linie). Im Bereich über 4,5 mm/h verschoben sich die Volumenhistogramme mit steigender Sedimentationsgeschwindigkeit kontinuierlich zu höheren Kanälen, zeigten zunehmend eine Rechtsschiefe und wurden deshalb nicht weiter analysiert. In den anderen Fraktionen jedoch konnte das Volumenhistogramm durch Kombination von 5 verschiedenen Normalverteilungen erklärt werden.

Die Fläche unter den einzelnen angepaßten Kurven ist ein direktes Maß für den Anteil dieser Volumenpopulation in der jeweiligen Fraktion. Durch Multiplikation mit der Zellzahl ergab sich daraus die Verteilung von Zellen definierten Volumens in der 1-g Sedimentation (Abb.5).

Zellen mit mittlerem Volumen von 93, 121, 144, 157 und $194 \mu\text{m}^3$ sedimentierten als diskrete Banden mit Sedimentationsgeschwindigkeiten von 3,1, 3,5, 3,7 und 5,5 mm/h. Dabei betrug der Variationskoeffizient V etwa 20%; nur die Streubreite der $157 \mu\text{m}^3$ -Zellen war mit 11% geringer.

Zum Teil ließen sich die Volumenpopulationen von Abb.5 und die morphologisch definierten Zellarten von Abb.3 korrelieren. So kann es sich bei

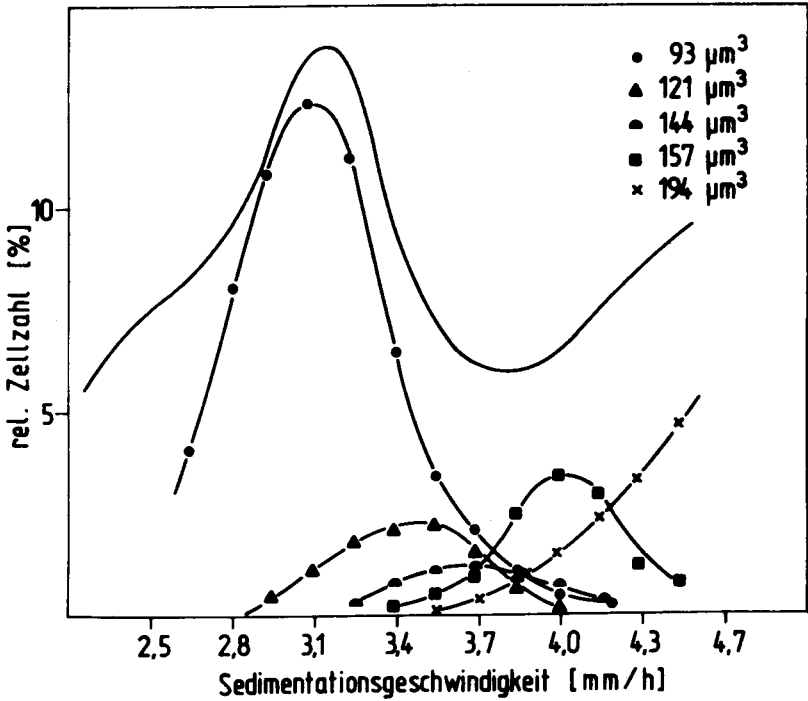


Abb.5 Verteilung von Knochenmarkszellen verschiedenen Volumens in der Zellsedimentation

Der Anteil jeder einzelnen Volumenspopulation wurde in den Fraktionen aus den angepaßten Kurven der Volumen-histogramme errechnet. Die Zeichensymbole stimmen mit denen in Abb.4 überein.

den Zellen mit $194 \mu\text{m}^3$ nur um reife Granulozyten handeln. Die Zellen mit $93 \mu\text{m}^3$ sind sicher kleine Lymphozyten. Dagegen können die Normoblasten ($V=40\%$) nicht allein aus der $157 \mu\text{m}^3$ -Population ($V=11\%$) erklärt werden, sondern einem Teil der erythropoetischen Zellen muß auch kleineres Volumen zugeordnet werden.

Verglichen mit der schmalen Streuung im Volumen ($V=10\%$) zeigten die

einzelnen Populationen eine relativ breite Verteilung in der 1-g Sedimentation ($V=20\%$), die auch doppelt so groß ist wie von Latexpartikeln vergleichbarer Größe (58). Diese Bandenverbreiterung ist nicht apparativ bedingt, sondern kann nur durch Dichteunterschiede innerhalb einer Zellpopulation erklärt werden.

Bezogen auf ihr Volumen sedimentierten Normoblasten und reife Granulozyten vergleichsweise schneller als Lymphozyten. Bekannt ist, daß diese Zellen eine höhere Dichte besitzen (100). Dies bedeutet, daß der Beitrag der Dichte zur Sedimentationsgeschwindigkeit nicht zu vernachlässigen ist.

1.2 Zellelektrophorese

Im Bereich der Lymphozyten waren in der 1-g Sedimentation von Knochenmark mindestens 3 verschiedene Zellgrößen zu unterscheiden. Um die Knochenmarkslymphozyten genauer zu charakterisieren, wurden die Zellen mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 2,7 bis 3,6 mm/h zusätzlich elektrophoretisch getrennt (Abb.6)

In der Zellelektrophorese wanderten die meisten dieser Zellen mit niedriger elektrophoretischer Beweglichkeit (EB), mit einer Schulter bei mittlerer EB und einer geringen Anzahl von elektrophoretisch schnell wandernden Zellen. Um auch kleine Zellpopulationen zu erfassen, ist in Abb.6 für die Ordinate ein logarithmischer Maßstab gewählt. Die Vitalität der Zellen betrug zwischen 80 und 90%, mit einem leichten Abfall bei hoher EB.

Die nichtlymphoiden Zellen in der getrennten Zellprobe, die Normoblasten, fanden sich in Fraktionen mittlerer und hoher EB. In den Fraktionen niedriger EB, die über 80% der aufgetragenen Zellen

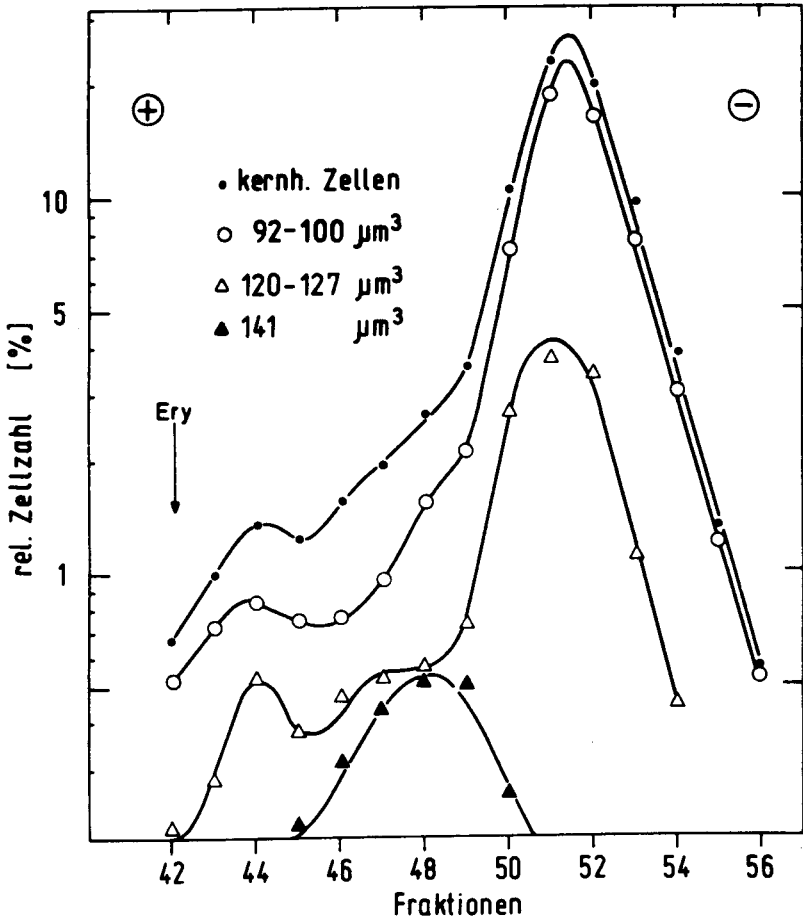


Abb.6 Verteilung von langsam sedimentierenden Knochenmarkszellen
(2,7 bis 3,6 mm/h) mit verschiedenem Zellvolumen in der
Zellelektrophorese

Der Anteil jeder einzelnen Volumenpopulation in den Fraktionen wurde aus den angepaßten Kurven der Volumenhistogramme errechnet. Die Zeichensymbole stimmen mit denen in Abb.7 überein.

enthielten, wurden nur Lymphozyten identifiziert. Im Vergleich zu elektrophoretisch langsamen Milz- oder Lymphknotenzellen, die B-Lymphozyten

darstellen, war die Oberflächenladungsdichte dieser Knochenmarkslymphozyten noch etwas geringer.

In den Fraktionen wurden die Volumenverteilungen gemessen und in den vorderen Fraktionen für Erythrozytenaggregate korrigiert (Abb.7a). Den Volumenhistogrammen wurden Normalverteilungen angepaßt (Abb.7b).

Es zeichneten sich 3 Größenklassen ab. Der Mittelwert jeder dieser Volumenpopulationen war jedoch von Fraktion zu Fraktion nicht genau gleich. So betrug er für die kleinen Zellen (o) in den Fraktionen hoher EB $94 \mu\text{m}^3$, bei mittlerer EB $100 \mu\text{m}^3$ und bei niedriger EB $92 \mu\text{m}^3$. Ebenso lag der Volumenmittelwert bei den etwas größeren Zellen (Δ) in den Fraktionen 42-45 bei $118 \mu\text{m}^3$, in den Fraktionen 46-49 bei $127 \mu\text{m}^3$ und in den Fraktionen 50-54 bei $120 \mu\text{m}^3$. Diese Volumensschwankungen, die so gering sind, daß sie in der Zellsedimentation nicht aufgelöst werden können, spiegeln offensichtlich eine Heterogenität innerhalb von zwei der drei beschriebenen Zellpopulationen wieder. Innerhalb einer solchen Größenklasse fanden sich also geringe Volumensunterschiede, aber große Unterschiede in der EB.

Da die Volumensdifferenzen so gering waren, konnte in der Zellelektrophorese im Überlappungsbereich (Fraktion 46 und 50) der Anteil der einzelnen Zellpopulationen nicht genau bestimmt werden. Es wurden deshalb in Abb.6 die Größenklassen eingetragen. Die $92-100 \mu\text{m}^3$ -Population und die $120-127 \mu\text{m}^3$ -Population zeigten in der Zellelektrophorese trimodale Verteilungen. Zellen mit $141 \mu\text{m}^3$ Volumen wanderten mit mittlerer EB.

Knochenmarkszellen mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit zwischen 2,7 und 3,6 mm/h ergaben in der Zellelektrophorese demnach 7 Populationen, die sich in Volumen und EB unterscheiden. Zwei davon werden von Normoblasten gebildet. Eine Zuordnung dieser nichtlymphoiden Zellen zu

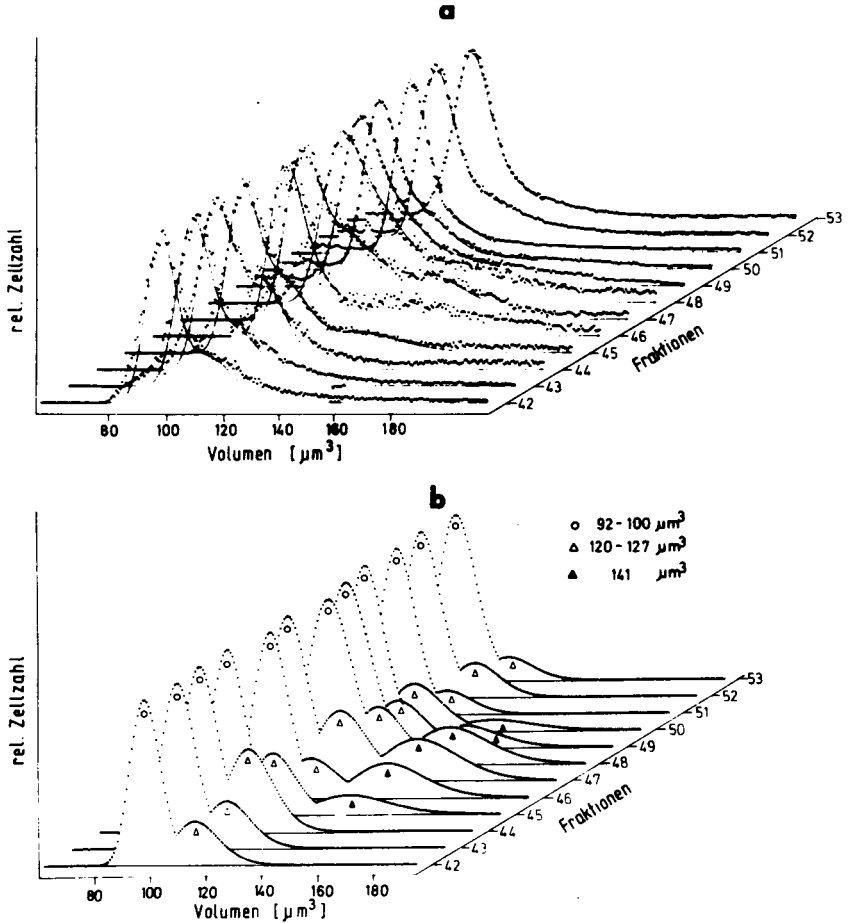


Abb.7a und b Volumensverteilungen von langsam sedimentierenden Knochenmarkszellen (2,7 bis 3,6 mm/h) verschiedener elektrophoretischer Beweglichkeit

- a) experimentelle Volumenhistogramme der Fraktionen (punktierte Linie) und Summe der angepaßten Kurven (durchgezogene Linie)
- b) die einzelnen Normalverteilungen, die den Volumenhistogrammen angepaßt wurden

Die Lage der Kurven stimmt in den Fraktionen nicht genau überein, weswegen die Zeichensymbole Volumensbereiche bezeichnen.

ermittelten Volumenpopulationen konnte durch Bestimmung der Zelldurchmesser in Giemsa-gefärbten Ausstrichen erreicht werden. In Fraktion 44 wurden alle Zellen mit geringem Radius als Normoblasten identifiziert, während in Fraktion 48 ein Viertel der Zellen zur Erythropoese zu rechnen waren und die Lymphozyten kleineren oder größeren Zelldurchmesser aufwiesen.

Es verbleiben mindestens 5 Lymphozytenpopulationen, die sich in physikalischen Parametern unterscheiden: $118 \mu\text{m}^3$ -große Lymphozyten mit hoher EB, kleine und mittelgroße Lymphozyten mit mittlerer EB wie sie peripheren B-Zellen entspricht, und zwei Lymphozytenpopulationen mit 92 und $120 \mu\text{m}^3$ Volumen und niederer EB. Diese letzteren Zellen, die die Hauptmenge der Knochenmarkslymphozyten ausmachen, konnten frei von nichtlymphoiden Zellen erhalten werden.

2 Biochemische und biologische Eigenschaften

2.1 DNS-Stoffwechsel

Nicht nur verschiedene Zellarten können sich in ihrem Volumen unterscheiden, sondern auch verschiedene Zellzyklusphasen ein und derselben Zellart. Bei einigen der beschriebenen Volumenpopulationen könnte es sich um Zellen in S- und G2-Phase handeln, bei kleineren Zellen um die zugehörige G0/G1-Phase. Um den Anteil von sich teilenden Zellen in dem näher untersuchten Bereich von 2,7 bis 3,6 mm/h abzuschätzen, wurden Knochenmarkszellen nach 1-g Sedimentation mit ^{14}C -Thymidin pulsmarkiert (Abb.8).

Für Zellen mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit bis zu 3,6 mm/h konnte kein nennenswerter DNS-Stoffwechsel gemessen werden. Dieser erhöhte sich

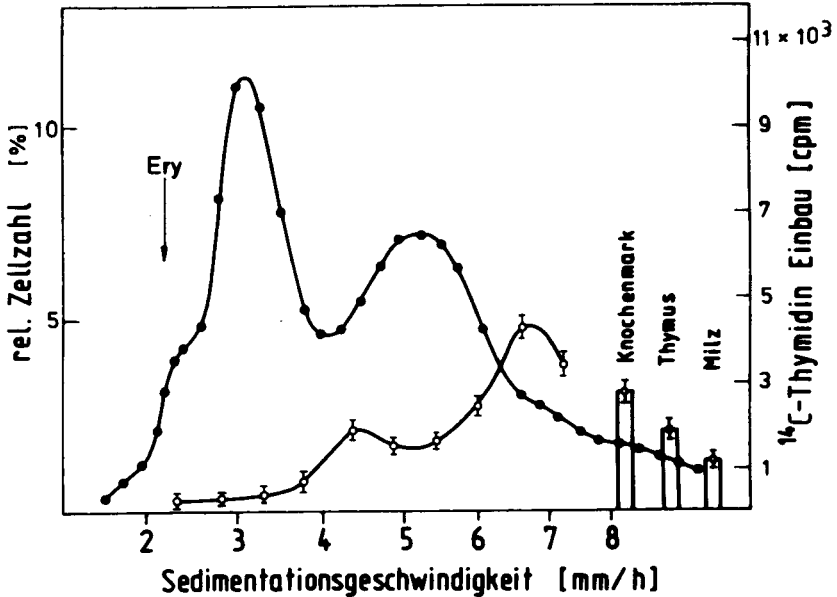


Abb.8 ¹⁴C-Thymidin Einbau von Knochenmarkszellen nach 1-g Sedimentation

5 X 10⁶ Zellen wurden mit 0,285 µCi ¹⁴C-Thymidin für 2 h bei 37°C inkubiert. Es sind Mittelwert und Streubreite aus je 5 Bestimmungen angegeben. Rechts unten sind die Werte für ungetrennte Zellen aufgetragen.

mit steigender Sedimentationsgeschwindigkeit und zeigt zwei Gipfel, bei etwa 4,3 und 6,8 mm/h. Die weiter untersuchten kleinen und mittelgroßen Lymphozyten stellen also Zellen in G₀ oder G₁-Phase dar. Entsprechend sind in diesem Bereich beobachtete Unterschiede in den Zellvolumina (siehe 1.1) auf unterschiedliche Zellarten und nicht unterschiedliche Zellzyklusphase zurückzuführen.

Für schneller sedimentierende Knochenmarkszellen wurde dagegen ein erheblicher DNS-Stoffwechsel und damit Teilungsaktivität nachgewiesen. Dementsprechend zeigten die Volumenkurven der großen Zellen auch

zunehmende Streuung und Schiefen (siehe 1.1).

2.2 Fc-Rezeptoren

Einige hämopoetische Zellen sind durch den Besitz von Fc-Rezeptoren charakterisierbar. Zu deren Nachweis wurde in einzelnen Fraktionen der Zellsedimentation die Zahl der Zellen bestimmt, die mit anti-SRBC Antiserum beladenen Schafserthrozyten Rosetten bilden.

Im Bereich der kleinen Lymphozyten war der prozentuale Anteil an Zellen mit Fc-Rezeptoren relativ gering: Bei mit 3 mm/h sedimentierenden Zellen betrug er etwa 5%. Er zeigte einen Gipfel mit 15% bei 3,7 mm/h und stieg im Bereich der Neutrophilen, bei denen sich bekanntermaßen Fc-Rezeptoren finden (31), bis auf 20% an.

Die große Menge der kleinen Lymphozyten des Knochenmarks besitzt demnach keine Fc-Rezeptoren.

2.3 Intrazelluläres Immunglobulin

Bei bestimmten Stufen der B-Zell-Differenzierung ist Immunglobulin im Cytoplasma vorhanden (71,72). Inwieweit kleine Knochenmarkslymphozyten derartige Vorläuferzellen darstellen wurde in Fraktionen der Zellsedimentation geprüft.

Zellen mit fluoreszenzgefärbtem Cytoplasma wurde im Bereich zwischen 4 und 6 mm/h in geringer Zahl gefunden. Bei höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten war die Auswertung durch Autofluoreszenz myeloischer Zellen erschwert. Die kleinen, langsam sedimentierenden Knochenmarkslymphozyten waren frei von intrazellulärem Immunglobulin.

2.4 Stammzellaktivität (CFU-S)

Eine wesentliche und charakteristische Funktion des Knochenmarks ist die Selbsterneuerung des gesamten hämopoetischen Systems. Die Stammzellen, die dafür verantwortlich sind, sind gering an der Zahl, morphologisch nur schwer zu identifizieren (24), aber im Milzkolonietest gut nachweisbar. Es erschien wichtig, eine Korrelation zu einer der aufgefundenen Lymphozytenpopulationen auszuschließen, und zum anderen, für spätere Transferversuche, die Verunreinigung von Lymphozytenpopulationen mit diesen pluripotenten Zellen abschätzen zu können.

Rattenknochenmark wurde durch 1-g Sedimentation und die kleinen Zellen weiter durch Elektrophorese getrennt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde Knochenmark erst elektrophoretisch und anschließend der L-Bereich noch in der Zellsedimentation aufgetrennt. Vereinigte Fraktionen aus diesen Trennungen und ungetrenntes Knochenmark wurden auf Stammzellaktivität untersucht. Dabei zeigt die Zahl der Milzkolonien eine lineare Abhängigkeit von der eingespritzten Zellzahl. Bis zu einer Anzahl von 50 Kolonien pro Milz war eine quantitative Auswertung gut möglich. Abb.9 zeigt die Zahl der Milzkolonien pro einer Million eingespritzter Zellen für verschiedene Bereiche aus den Knochenmarkstrennungen.

Es wurde deutlich, daß Stammzellen eher in Fraktionen höherer Sedimentationsgeschwindigkeit und höherer EB anzutreffen sind. Ihre Verteilung war jedenfalls eindeutig verschieden von der der meisten Knochenmarkslymphozyten, die klein sind und elektrophoretisch langsam wandern. Die Reihenfolge Zellelektrophorese - Zellsedimentation ergab für diese Fragestellung die besten Ergebnisse. Die angereicherten kleinen Knochenmarkslymphozyten niederer EB enthielten 20 mal weniger CFU-S als das Ausgangsmaterial.

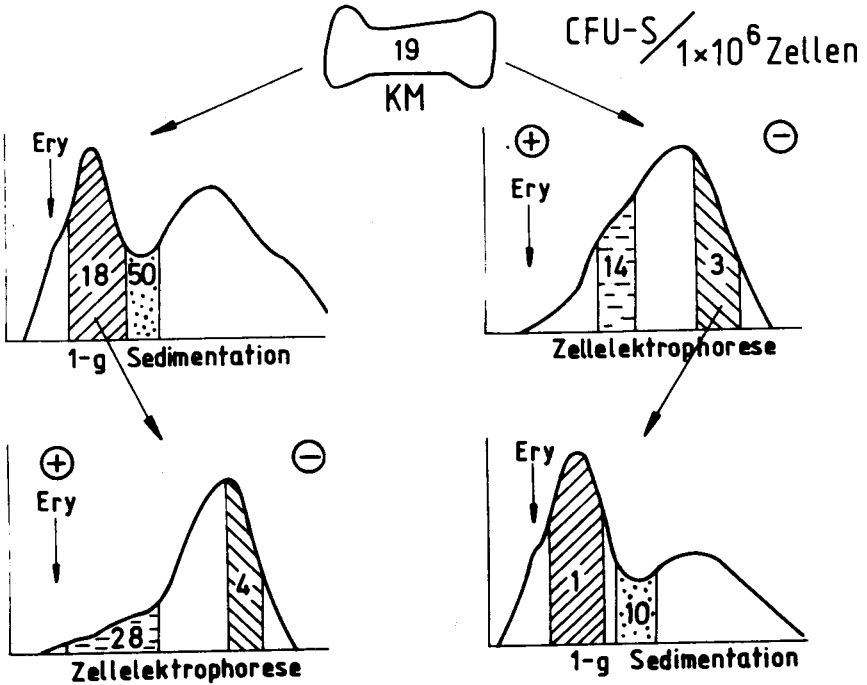


Abb. 9 Stammzellaktivität in verschiedenen Bereichen der Trennung von Knochenmarkszellen durch 1-g Sedimentation und Zellelektrophorese

Fractionen entsprechend einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 2,7 bis 3,7 mm/h wurden vereinigt und elektrophoretisch getrennt (links). Die Fractionen 51-53 aus der Knochenmarkelektrophorese wurden durch Zellsedimentation weiter getrennt (rechts). Die eingetragenen Zahlen geben die Milzkolonien pro 1×10^6 injizierter Zellen an. Jede Zahl stellt den Mittelwert dar, berechnet aus den Ergebnissen bei mindestens 3 verschiedenen Zellmengen mit je 3 Tieren.

Die Ergebnisse stimmen gut überein mit Versuchen, Stammzellen durch Zellentrennmethode anzureichern. Dabei war für CFU-S der Maus eine mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit von 4,2 mm/h (15,19,20) bestimmt worden, und eine hohe bis mittlere EB (21).

Bei dem verwendeten CFU-S Test wird für die Ratte ein Wirkungsfaktor f

von 0,007 angegeben (24), d.h. von 1000 Stammzellen können nur etwa 7 eine Woche nach i.v. Injektion als Milzkolonie nachgewiesen werden. Damit ergibt sich aus den hier gefundenen Ergebnissen ein Gehalt an Stammzellen von 0,3% für ungetrenntes Knochenmark und von 0,7% für CFU-S angereicherte Fraktionen.

3 Oberflächenantigene

3.1 Qualitativer Nachweis von antigenträgenden Zellen

3.1.1 Zellsedimentation

Lymphozyten können durch ihre Oberflächenantigene charakterisiert werden. Um die Knochenmarkslymphozyten zu klassifizieren wurde in den getrennten Fraktionen die Anzahl von Zellen bestimmt, die mit spezifischen Antiseren reagierten. Der Nachweis der Differenzierungsantigene erfolgte im Cytotoxizitätstest und in der Immunfluoreszenz; wobei durch die Cytolyse wenige und nur spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen werden, wogegen in der Immunfluoreszenz auch eine grobe quantitative Abschätzung der Antigenmenge möglich ist. Beide Testsysteme lieferten übereinstimmende Ergebnisse. Abb.10 zeigt die Menge von Zellen mit bestimmten Differenzierungsantigenen in den Fraktionen der Zellsedimentation.

Nur Lymphozyten zeigten eine Reaktion mit den Antiseren. Mehr als 80% der Zellen in den langsam sedimentierenden Fraktionen wiesen den Thy-1 Komplex auf. Die Ergebnisse waren identisch, ganz gleich welche Thy-1 Spezifität, Thy-1, Thy-1.1, R_SThy-1 oder RThy-1 (Hirn), untersucht wurde. Die Hälfte der kleinen Knochenmarkslymphozyten zeigten das RThyA Antigen.

Eine überraschend geringe Anzahl von B-Zellen wurde durch den Besitz von RBLA identifiziert, nämlich etwa 10% der Lymphozyten. Noch etwas geringer

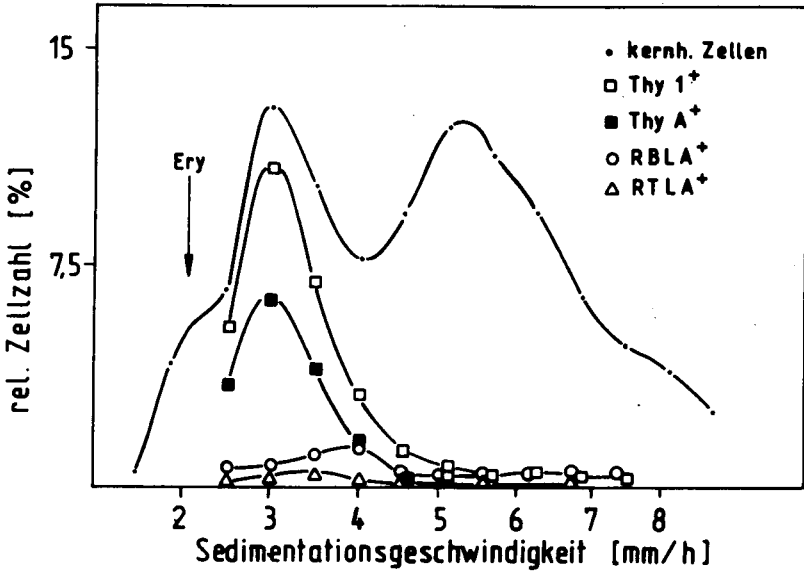


Abb.10 Verteilung von Knochenmarkszellen mit verschiedenen Oberflächenantigenen in der Zellsedimentation

Die Differenzierungsantigene wurden im Cytotoxizitätstest und in direkter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Für die C'-abhängige Cytolyse wurden IgG-Präparationen der Antiseren, für die Immunfluoreszenz FITC-markierte F(ab')₂-Präparationen eingesetzt. Die Auswertungen erfolgten mit Thymozyten und Lk-Zellen als Kontrolle im Parallelansatz.

war die Zahl der Zellen, die in direkter Immunfluoreszenz Oberflächen-Ig zeigten (in Abb.10 nicht dargestellt). Die durch diese beiden Oberflächenstrukturen charakterisierten B-Lymphozyten schienen in der 1-g Sedimentation etwas schneller zu sedimentieren als die Thy-1-positiven Zellen. Ihr prozentualer Anteil stimmte mit dem in ungetrenntem Knochenmark ermittelten überein und ist deshalb kein Artefakt durch selektiven Zellverlust oder Abschwimmen von Membranproteinen während der Trennung.

Einige Zellen, etwa 4% der Lymphozyten, konnten durch den Nachweis von RTLA und RHLA auf ihrer Oberfläche als T-Zellen erkannt werden.

3.1.2 Zellelektrophorese

Wie in 1.2 gezeigt, können Knochenmarkslymphozyten nach ihrer weitgehenden Trennung von nichtlymphoiden Zellen durch die 1-g Sedimentation in der Zellelektrophorese weiter aufgetrennt werden. Fraktionen zwischen 2,7 und 3,7 mm/h wurden vereinigt und der Zellelektrophorese unterworfen. Die Verteilung der antigenpositiven Zellen zeigt die Abb.11.

Zellen, die mit keinem der Antiseren reagierten waren im H- und M-Bereich der Elektrophorese bimodal verteilt. Sie müssen größtenteils als Normoblasten angesehen werden. Doch auch eine Anzahl lymphoider "Nullzellen" fand sich bei mittlerer EB.

Die RTLA- und RHLA-positiven Zellen konnten anhand dieser beiden T-Zell Marker und aufgrund der charakteristischen hohen EB als reife T-Lymphozyten identifiziert werden. Sie machten etwa die Hälfte der kernhaltigen Zellen im H-Bereich (Fraktion 44-47) aus und repräsentierten sämtliche dort vorhandenen Lymphozyten. Sie erwiesen sich als die Zellen mit $118 \mu\text{m}^3$ Volumen, da die anderen beiden Volumenpopulationen im H-Bereich als Normoblasten identifiziert worden waren.

RBLA charakterisierte B-Lymphozyten in den Fraktionen 49-52 in asymmetrischer Verteilung. Diese Position entspricht dem Bereich niederer EB in der Elektrophorese peripherer lymphatischer Organe (siehe Abb.19 und Abb.20), in dem B-Zellen wandern. Zellen mit Oberflächen-Ig (nicht gezeigt in Abb.11) hatten die gleiche Verteilung mit etwas geringerer Anzahl, besonders in den Fraktionen 49 und 50. Die Immunfluoreszenz zeigt ein breites Spektrum in der Oberflächendichte dieses B-Zell-markers. Schließlich

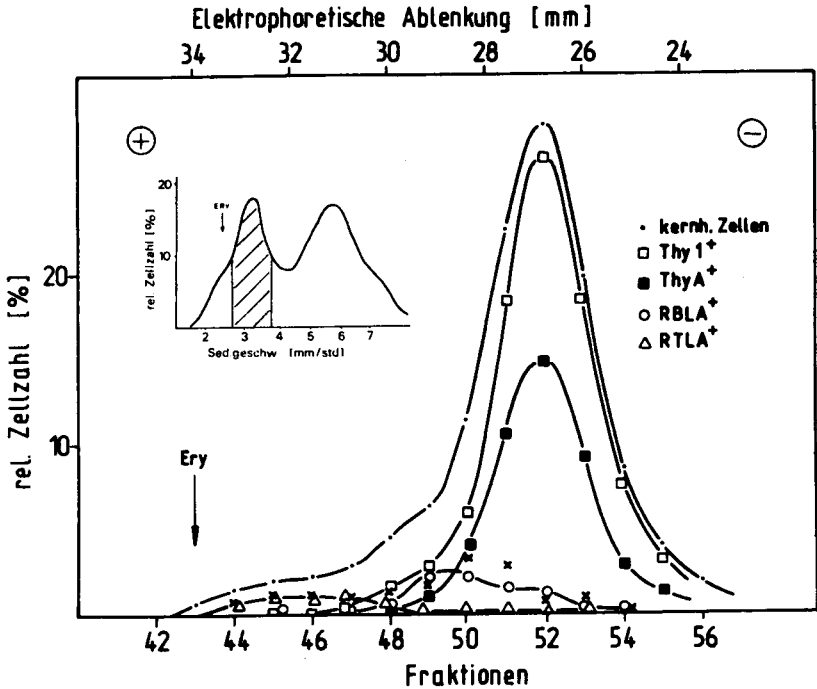


Abb.11 Verteilung von langsam sedimentierenden Knochenmarkszellen (2,7 bis 3,7 mm/h) mit verschiedenen Oberflächenantigenen in der Zellelektrophorese

Die Differenzierungsantigene wurden im Cytotoxizitätstest und in direkter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Auswertungen erfolgten mit Thymozyten und Lk-Zellen als Kontrolle im Parallelansatz. x bezeichnet die Zellen, die keines der aufgeführten Antigene aufwiesen.

schiene diese Zellen auch uneinheitliches Volumen zu besitzen ($141 \mu\text{m}^3$ und $100 \mu\text{m}^3$). Daraus kann geschlossen werden, daß RBLA im Knochenmark eine Reihe verschiedener Reifestadien der B-Zellen nachweist.

Die Mehrzahl der Knochenmarkslimphozyten hatte niedere EB, niederer

selbst als B-Zellen, und trug thymusspezifische Antigene. Sowohl die Zellen mit Thy-1-Komplex, mit seinen einzelnen Spezifitäten Thy-1, Thy-1.1 und R_S Thy-1, als auch die RThyA-positiven Zellen hatten ihren Gipfel bei Fraktion 52. Erstere machten etwa 85% der elektrophoretisch getrennten Knochenmarkslimphozyten aus, letztere etwa 40%. Daß die RThyA-positiven Limphozyten mit der $120 \mu\text{m}^3$ -Population übereinstimmen, ist wahrscheinlich, konnte jedoch nicht bewiesen werden. Allein aus den Prozentsätzen der beiden Differenzierungsantigene folgte, daß beide gleichzeitig auf einer Zelle angetroffen werden können.

3.1.3 FITC/TRITC Doppelmarkierungen

Inwieweit Limphozyten gleichzeitig den Thy-1-Komplex und B-Zell-spezifische Antigene tragen, konnte durch Doppelmarkierungsversuche entschieden werden. Dazu wurden Zellen aus drei Bereichen der Elektrophorese (Tab.2) mit zwei verschiedenen Antiseren inkubiert und nach gleichzeitiger FITC-Fluoreszenz und TRITC-Fluoreszenz auf ein und derselben Zelle gesucht.

Die Tabelle zeigt, daß 93% der Limphozyten im L-Bereich der Elektrophorese Thy-1-positiv waren. Alle ThyA-positiven Zellen trugen auch den Thy-1-Komplex. ThyA⁺/Thy-1⁺-Zellen zeigten zum Teil die eine Fluoreszenz in "cap"-Form und die andere in "ring"-Form (negatives Co-capping) als Ausdruck der Nicht-Identität der beiden Antigene.

B-Zellen mit RBLA oder Oberflächen-Ig fanden sich besonders im M-Bereich der Elektrophorese. Es konnten keine Zellen gefunden werden, die gleichzeitig B-Zell-spezifische und thymusspezifische Antigene trugen. Alle kleinen bis mittelgroßen Knochenmarkslimphozyten mit RBLA oder Oberflächen-Ig waren Thy-1-negativ. Auch den RTLA-positiven T-Limphozyten im H-Bereich der Elektrophorese fehlte das Thy-1 Antigen.

DIREKTE IMMUNFLUORESCENZ DOPPELMARKIERUNG FITC / TRITC	% MARKIERTE KNOCHENMARKSLYMPHOZYTEN NACH 1-G SEDIMENTATION UND ELEKTROPHORESE		
	KM- L	KM- M	KM- H
R _{THYA} ⁺ / THY-1 ⁻	> 0.1	> 0.1	> 0.1
R _{THYA} ⁺ / THY-1 ⁺	43	20	1
R _{THYA} ⁻ / THY-1 ⁺	50	15	1
sIg ⁺ / THY-1 ⁻	3	15	1
sIg ⁺ / THY-1 ⁺	> 0.1	> 0.1	> 0.1
R _{BLA} ⁺ / THY-1 ⁻	3	25	2
R _{BLA} ⁺ / THY-1 ⁺	> 0.1	> 0.1	> 0.1
R _{BLA} ⁻ / THY-1 ⁺	93	48	2
R _{BLA} ⁻ / THY-1 ⁻	4	27	97
(NORMOBLASTEN	3	20	40)
RT _{LA} ⁺ / THY-1 ⁻	> 0.1	2	54
RT _{LA} ⁺ / THY-1 ⁺	> 0.1	> 0.1	> 0.1

Tab.2 Anteil von Zellen, die gleichzeitig mit zwei verschiedenen Antisera reagierte, in vereinigten Fraktionen der Zellelektrophorese

KM-L = Fraktion 52-54, KM-M = Fr.49-50, KM-H = Fr.44-47 aus der Elektrophorese langsam sedimentierender Knochenmarkszellen (siehe Abb.11)

Der qualitative Nachweis Differenzierungsantigene-tragender Zellen durch Immunfluoreszenz und Cytotoxizitätstest zeigte, daß der Hauptteil der Knochenmarkslymphozyten sich durch das Fehlen von RTLA, RBLA und Oberflächen-Ig und durch den Besitz der thymusspezifischen Antigene Thy-1 und RThyA deutlich von peripheren B- und T-Lymphozyten unterscheidet.

3.2 Quantitativer Vergleich der Antigenmenge auf der Zelloberfläche

Unter dem Fluoreszenzmikroskop fiel bei der Färbung von kleinen Knochenmarkslymphozyten mit FITC-gekoppeltem anti-Thy-1 Antiserum auf, daß die Zellen, verglichen mit Thymozyten als Positivkontrolle, eine deutlich geringere Fluoreszenz aufwiesen. Diese quantitativen Unterschiede im Besitz des Differenzierungsantigens Thy-1 wurden in Absorptionsstudien und Durchfluß-Cytofluorometrie gemessen, wobei mit ersterer Methode die Bindungskapazität der untersuchten Zellprobe, mit letzterer die Fluoreszenzintensität von Einzelzellen bestimmt wird.

Die langsam sedimentierenden Knochenmarkszellen niederer EB wurden verglichen mit Milzlymphozyten und elektrophoretisch getrennten Thymozyten. Thymozyten zeigen in der Zellelektrophorese einen Gipfel bei niederer EB, der 80% der Zellen, insbesondere die kleinen, cortisonempfindlichen kortikalen enthält, und eine abfallende Schulter bis in den Bereich hoher EB, wo sich cortisonresistente, medulläre, proliferierende Thymozyten befinden (102,103).

3.2.1 Durchfluß-Cytofluorometrie

Die Messung im Cytofluorometer lieferte Fluoreszenzhistogramme, wie sie für Milzzellen und elektrophoretisch langsam wandernde Thymozyten und Knochenmarkslymphozyten in Abb.12 gezeigt sind. Während für Milzzellen

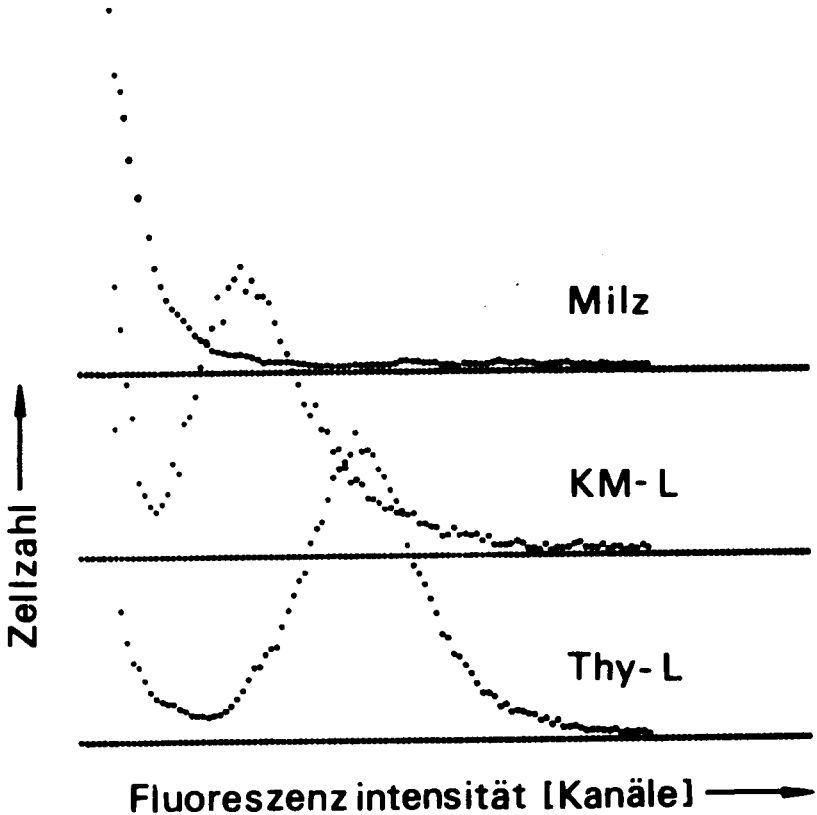


Abb.12 Fluoreszenzhistogramme verschiedener Zellen nach Reaktion mit FITC-anti-Thy-1 Antiserum

1×10^6 Zellen wurden mit $20 \mu\text{l}$ FITC-anti-Thy-1 (Hirn) F(ab')_2 (Ery, Leber, Lk absorbiert) für 30 min bei 40°C inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. KM-L = langsam sedimentierende Knochenmarkszellen (2,7 bis 3,7 mm/h) niederer EB (Fr.52-54 in Abb.11) Thy-L = Thymozyten niederer EB (Fr.52-54)

nur das exponentiell abfallende "Rauschen", bedingt durch Elektronik und unspezifische Fluoreszenz, gemessen werden konnte, waren die Fluoreszenzintensitäten der Thymus- und Knochenmarkszellen deutlich vom Untergrund abgehoben.

Folgende Faktoren schienen entscheidend für das Zustandekommen derart präziser Ergebnisse:

- a) die hohe Fluoreszenzausbeute durch die energiereiche Anregung mit Laserlicht
- b) die Anwendung direkter Immunfluoreszenz. Durch die indirekte Methode (sandwich) erhält man höhere, aber breiter gestreute Fluoreszenzintensitäten, die sich nur wenig von der vermehrten unspezifischen Fluoreszenz abheben, sodaß nur indirekt durch Subtraktion des Rauschens eine Intensitätsverteilung sichtbar gemacht werden kann.
- c) die Verwendung von $F(ab')_2$ -Fragmenten, die unspezifische Antikörperbildung vermeidet.
- d) die Messung an durch Zelltrennmethode hoch angereicherten Zellpopulationen. So konnte mit ungetrenntem Knochenmark keine diskrete Fluoreszenzverteilung aufgezeichnet werden.

Den Fluoreszenzkurven in Abb.12 konnten Normalverteilungen angepaßt werden. Für Thymozyten ergab sich ein Variationskoeffizient von 23%, für die Thy-1-positiven Knochenmarkslimphozyten einer von 29%. Wegen der Symmetrie der Verteilungskurven waren deren Mittelwerte leicht zu bestimmen.

Mit steigendem Verhältnis von Zellen zu Antiserum verschoben sich die Fluoreszenzhistogramme zu geringeren Intensitäten, bei gleichbleibenden Variationskoeffizienten V (Abb.13).

In Abb.14 sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten für die verschiedenen getesteten Zellen gegen die logarithmisch ansteigende Zellzahl im Ansatz aufgetragen. Es ergaben sich Kurven, die als Teilabschnitte von Sigmoidkurven interpretiert werden können.

Wenn man das Massenwirkungsgesetz auf die Antigen-Antikörper Reaktion anwendet, so ergibt sich im Modell für die Beziehung zwischen dem Quotienten

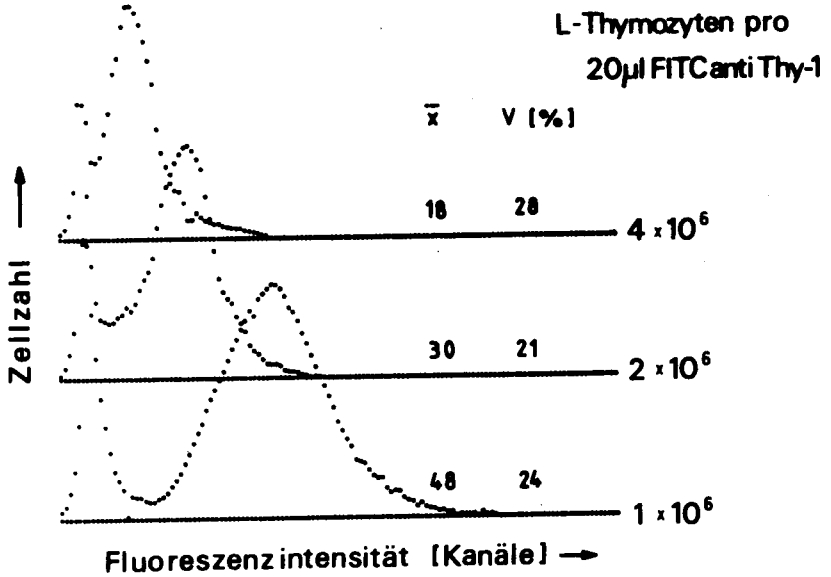


Abb.13 Fluoreszenzhistogramme von Thymozyten niederer EB nach Reaktion steigender Zellzahl mit konstanter Menge an FITC-anti-Thy-1 Antiserum

1,2 und 4×10^6 Zellen wurden mit 20 µl FITC-anti-Thy-1 (Hirn) F(ab')₂ für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Die Thymozyten stammten aus dem L-Bereich der Elektrophorese (Fr.52-54). Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Fluoreszenzverteilungen sind angegeben.

der freien Reaktionspartner und dem erhaltenen Komplex eine sigmoidale Sättigungskurve, wenn für die Abszisse ein logarithmischer Maßstab gewählt wird. Das Plateau ist dann bei konstanter Menge an Antikörpern ein Maß für die Zahl der Antigenmoleküle auf den Zellen, und die für Halbsättigung notwendige Zellzahl ein Maß für die Bindungskonstante.

Elektrophoretisch langsam wandernde, kortikale Thymozyten zeigten eine hoch liegende und steile Regressionskurve, entsprechend der hohen

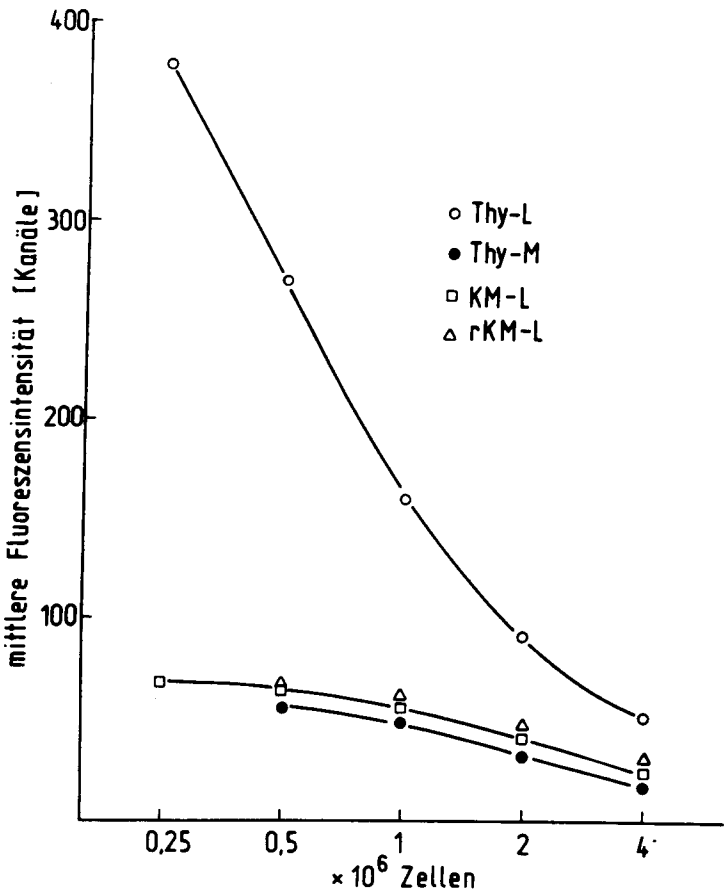


Abb.14 Abhängigkeit der mittleren Fluoreszenzintensität getrennter Zellen vom Verhältnis der Zellzahl zur eingesetzten Menge an FITC-koppeltem anti-Thy-1 Antiserum

KM-L = langsam sedimentierende Knochenmarkszellen (2,7 bis 3,7 mm/h) niederer EB (Fr.52-54 in Abb.11) rKM-L = getrennte Knochenmarkszellen aus thymektomierten, letal bestrahlten und FLC-rekonstituierten Tieren Thy-L = Thymozyten niederer EB (Fr.52-54) Thy-H = Thymozyten hoher EB (Fr.44-46) Die mittleren Fluoreszenzintensitäten wurden den gemessenen Histogrammen entnommen.

gemessenen Intensitäten. Bei höheren Zellzahlen flachte die Kurve ab und erschien so wie der untere Teil einer Sigmoidkurve. Für die Knochenmarkslymphozyten verlief die Kurve flacher und bei niedrigen Kanälen. Diese Kurve schien ein Plateau anzustreben und ergab das Bild einer Sättigungskurve im Bereich des Antikörperüberschusses. Versuche mit Ratten verschiedenen Alters (3 Tage bis 1 Jahr) lieferten identische Ergebnisse.

Den gemessenen Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Zellen entsprechen Unterschiede in der Ausprägung des Thy-1-Antigens auf ihrer Oberfläche. Gemessen wird dabei letztlich die Menge an gebundenem Antikörper. Diese ist abhängig von der Zahl der eingesetzten Antikörper und der Zahl der mit den Zellen eingesetzten Antigenmoleküle. Letztere kann sich ändern mit der Antigendichte auf der Zelle, mit deren Oberfläche oder auch mit der Zahl an antigenpositiven Zellen in der untersuchten Zellprobe. Andererseits spielt auch die Bindungsstärke zwischen Antigen und Antikörper eine Rolle. Eine Zelle kann weniger Antikörper binden, und damit weniger Fluoreszenz zeigen, wenn das Antigen auf seiner Oberfläche sterisch schwerer zugänglich oder in Struktur oder Konfiguration verändert ist, oder aber, wenn es sich um ganz verschiedene Antigenmoleküle handelt, die nur Kreuzreaktion zeigen.

Die Knochenmarkslymphozyten und Thymozyten niederer EB, die hier verglichen wurden, haben ähnliches Volumen (92 bzw. $85 \mu\text{m}^3$) und keine auffallend unterschiedliche Oberflächenstruktur ($57,102-104$). Aufgrund der Anreicherung durch Zelltrennmethode wurden außerdem Zellproben gemessen, die über 90% Thy-1-positive Zellen enthielten. Deshalb spiegeln die Ergebnisse wirklich Unterschiede in der Antigendichte wider.

Für die Sättigungskurve der Knochenmarkszellen kann aus Abb.14 ein Plateauwert angenommen werden, kleiner als Kanal 80. Bei gleichem Ansatz ($0,25 \times 10^6$ Zellen) zeigt die Kurve der Thymozyten noch maximale Steigung

und einen Wert in Kanal 380. Das Sättigungsplateau liegt sicher darüber. Daraus folgt, daß Thymozyten niederer EB eine mindestens 5 mal höhere Thy-1 Antigendichte auf ihrer Oberfläche besitzen als die Thy-1-positiven Knochenmarkslimphozyten.

Die in Abb.14 dargestellten Ergebnisse machen wahrscheinlich, daß auch die Antikörperbindungsstärke, und damit die Antigenstruktur, zwischen Knochenmarkszellen und Thymozyten unterschiedlich ist. Die Halbsättigung der Knochenmarkslimphozyten mit anti-Thy-1 Antiserum wird etwa bei dem Ansatz mit 2 Millionen Zellen erreicht. Für die elektrophoretisch langsam wandernden Thymozyten liegt aber der Wendepunkt, und damit die höchste Steigung der Sigmoidkurve sicher bei weit niedrigerer Zellzahl. Die Bindungskonstanten wären demnach verschieden für die beiden Zellarten.

Thymozyten mit hoher EB zeigten bimodale Fluoreszenzhistogramme; ein Teil der Zellen zeigte die starke Fluoreszenz der Thy-L Zellen, der größere Teil band weniger Antikörper. Medulläre Thymozyten haben ein größeres Volumen und zeigen eine durch Ausstülpungen vergrößerte Zelloberfläche (102-104). Trotzdem lag die Fluoreszenzintensität noch unter der von Knochenmarkslimphozyten.

Die Ergebnisse im Cytofluorometer zeigten, daß aus einer einzelnen Messung nur eine geringe Aussage gemacht werden kann, daß aber auch durch Auswertung eines ganzen Bereiches verschiedener Reaktionsansätze eine Reihe von Schlüssen gezogen werden kann. Zwar war hier keine Angabe von Absolutwerten möglich, doch scheint die Ausmessung einer Sättigungskurve zusammen mit einer Eichung des Cytofluorometers der Weg dorthin zu sein. Selbst wenn man von dem Vergleich mit einem Modell ganz absieht, bleibt die eindrucksvolle Dokumentation erheblicher Unterschiede in der Aufnahme fluoreszierender anti-Thy-1 Antikörper zwischen Thymozyten und Knochenmarkslimphozyten.

3.2.2 Absorptionsstudien

Eine andere Möglichkeit den Antigenbesitz von Zellen zu quantifizieren ist es, deren Kapazität zu messen, aus einem Antiserum Aktivität zu absorbieren.

Abb.15 zeigt die Absorptionskurven verschiedener Zellen für das Thy-1

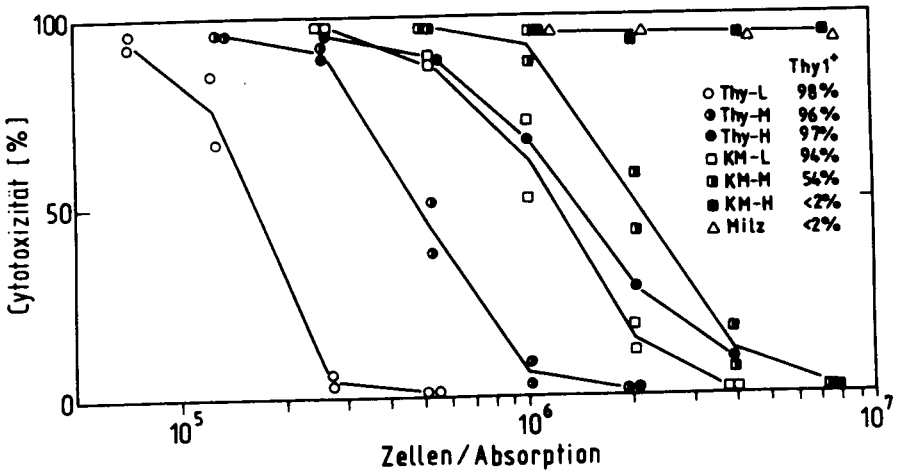


Abb.15 Cytotoxische Aktivität von anti-Thy-1 Immunglobulin gegen Thymozyten nach Absorption mit steigenden Mengen getrennter Zellen

40 µl anti-Thy-1 Antiserum (IgG) wurden mit dem Pellet der angegebenen Zellmenge für 30 min bei 4°C inkubiert und ein Aliquot gegen Thymozyten ausgetestet. Rechts ist der Anteil an Thy-1-positiven Zellen in den verschiedenen Zellproben angegeben, wie er in direkter Immunfluoreszenz ermittelt wurde.

Thy-L = Thymozyten niederer EB (Fr.52-54), Thy-M = mittlerer EB (Fr.48-50) und Thy-H = hoher EB (Fr.44-46)

KM-L = langsam sedimentierende Knochenmarkszellen (2,7 - 3,7 mm/h) niederer EB (Fr.52-54), KM-M = mittlerer EB (Fr.49-50) und KM-H = hoher EB (Fr.44-47)

Antigen. Versuche mit den anderen Thy-1-Spezifitäten Thy-1.1 und R_sThy-1 lieferten weitgehend identische Ergebnisse. Die Abnahme der Antiserum-

aktivität gegen Thymozyten nach Inkubation mit logarithmisch steigenden Zellmengen folgt Sigmoidkurven. Die Zellzahl, mit der die Cytotoxizität auf 50% gesenkt wird, ist ein Maß für die Bindungskapazität dieser Zellen.

Selbst hohe Mengen an Milzzellen oder Knochenmarkszellen aus dem H-Bereich der Elektrophorese konnten keine Aktivität aus dem Antiserum absorbieren. Mit nur $1,5 \times 10^6$ Thymozyten niederer EB konnte die Cytotoxizität auf 50% gesenkt werden. 7 mal mehr Thy-1-positive Knochenmarkslymphozyten waren notwendig um die gleiche Absorption zu erreichen. Dieses Ergebnis kann wegen des ähnlichen Volumens dieser Zellen und des sehr hohen Anteils Thy-1-positiver Zellen in den Proben als Ausdruck stark unterschiedlicher Antigendichte auf der Zelloberfläche gewertet werden. Aus der verschiedenen Neigung der Absorptionskurven in ihrem mittleren Anteil ist außerdem auf unterschiedliche Bindungsaffinität und daher unterschiedliche Antigenstruktur zu schließen (105).

Die relative Bindungskapazität von Thymozyten aus dem H-Bereich der Elektrophorese war 8 mal geringer als die der Thy-L Zellen. Die Lage der Absorptionskurve für Knochenmarkszellen mittlerer EB ergab sich aus ihrem Anteil an Thy-1-positiven Zellen: Da nur die Hälfte der Zellen in diesem elektrophoretischen Bereich das Thy-1 Antigen besitzen, waren auch doppelt so viele Zellen notwendig, um gleichviel Antikörper zu absorbieren wie Knochenmarkszellen aus dem L-Bereich. Auch bei dem M-Bereich der Thymozytentrennung kann als Grund für die Lage der Absorptionskurve zwischen Thy-L und Thy-H Zellen die Mischung, in diesem Fall von Zellen mit hohem und niedrigem Thy-1 Gehalt, angesehen werden. Weil auch der H-Bereich noch Thymozyten mit viel Thy-1 Antigen enthält, wie die Cytofluorometrie zeigte, läge die Absorptionskurve für reine medulläre Thymozyten wahrscheinlich noch weiter nach rechts verschoben. Der Unterschied zu den Knochenmarkslymphozyten wäre

dann noch deutlicher.

Diese Überlegungen machen klar, wie wesentlich die Anreicherung von Zellpopulationen durch Zelltrennmethode für derartige Fragestellungen ist.

In Abb.16 sind die Absorptionskurven für das RThyA-Antigen aufgezeichnet. Thymozyten verschiedener EB zeigten keinen Unterschied in ihrer Absorptionskapazität. Anders als beim Thy-1 Antigen schienen alle Thymozyten gleiche Mengen des Differenzierungsantigens RThyA zu besitzen. Viel mehr

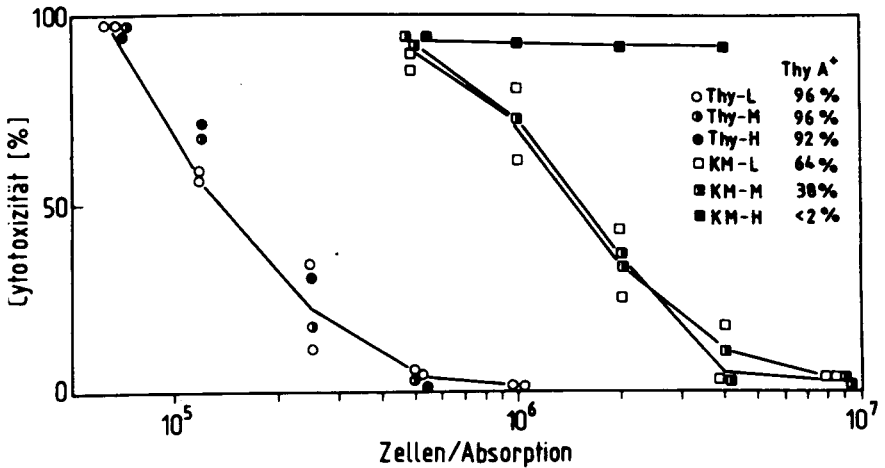


Abb.16 Cytotoxische Aktivität von anti-RThyA Immunglobulin gegen Thymozyten nach Absorption mit steigenden Mengen getrennter Zellen

40 µl anti-RThyA Antiserum (IgG) wurden mit dem Pellet der angegebenen Zellmenge für 30 min bei 40°C inkubiert und ein Aliquot gegen Thymozyten ausgetestet. Rechts ist der Anteil an RThyA-positiven Zellen in den verschiedenen Zellproben angegeben, wie er in direkter Immunfluoreszenz ermittelt wurde. Für Abkürzungen siehe Abb.15.

RThyA-positive Knochenmarkslymphozyten waren notwendig, um die Hälfte der Antiserumaktivität zu entfernen. Die Absorptionskapazität des Knochenmark L-Bereiches für anti-RThyA Immunglobulin war 12 mal geringer als die der Thymozyten. Berücksichtigt man, daß in dieser Zellprobe nur etwa 60% der Zellen RThyA-positiv waren, und bezieht man die Absorption nicht auf die Zahl der eingesetzten, sondern die der antigenträgenden Zellen, so ergibt sich für diese Knochenmarkslymphozyten eine 7 mal geringerer Oberflächendichte an RThyA als für Thymozyten.

Studien mit Antiseren gegen RBLA und RTLA zeigten, daß Zellen aus verschiedenen Bereichen der Knochenmarkstrennung Aktivität entsprechend ihres Anteiles an antigenpositiven Zellen absorbierten. Etwa waren für vergleichbare Absorption von RBLA 8 bis 10 mal mehr KM-M Zellen notwendig als elektrophoretisch angereicherte B-Zellen aus Milz. Und die Absorptionskapazität von Knochenmarkszellen aus dem H-Bereich mit etwa 40% RTLA-positiven Zellen war für RTLA 2 bis 3 mal geringer als die von Milz T-Lymphozyten. Hier spielte also nur die Anzahl von B- bzw. T-Zellen in der Zellprobe eine Rolle, und kein Unterschied zu peripheren Lymphozyten bezüglich der Antigendichte konnte festgestellt werden

Der quantitative Vergleich der Mengen an thymusspezifischen Antigenen auf der Zelloberfläche durch Cytofluorometrie und Absorptionsstudien zeigte, daß die Thy-1 und RThyA-positiven Knochenmarkslymphozyten sich in der Dichte dieser Differenzierungsantigene deutlich von Thymozyten unterscheiden.

4 Thymusabhängigkeit von Knochenmarkslymphozyten

Das überraschende Vorkommen von thymusspezifischen Antigenen auf Lympho-

zyten des Knochenmarks wirft die Frage nach der Beziehung dieser Zellen und dieser Antigene zum Thymus auf. Inwiefern ist der Thymus notwendig für das Auftreten von Zellen mit Thy-1 und RThyA im Knochenmark? Um diese Frage zu beantworten, wurde das Knochenmark thymektomierter, letal bestrahlter und FLC-rekonstituierter Ratten untersucht. Die Zellen konnten mit den einzelnen, nun durch physikalische Parameter und Differenzierungsantigene charakterisierten Lymphozytenpopulationen aus normalem Knochenmark verglichen werden, und so ihre Thymusabhängigkeit studiert werden.

4.1 Trennprofile, Zellvolumen und Morphologie rekonstituierten Knochenmarks

In der 1-g Sedimentation zeigte Knochenmark thymektomierter und letal bestrahlter Ratten einen Monat nach Rekonstitution mit FLC nur eine geringfügige Veränderung gegenüber normalen Tieren. Die Mulde zwischen Lymphozyten- und Granulozytengipfel erschien leicht verbreitert und zeigte eine Anhebung, vielleicht als Ausdruck einer gesteigerten Erythropoese. Der Hauptteil an Knochenmarkslymphozyten sedimentierte unverändert mit 3,1 mm/h (kleines Bild in Abb.17).

Zellen zwischen 2,7 und 4,0 mm/h, wurden weiter elektrophoretisch getrennt (Abb.17). Im H-Bereich der Elektrophorese konnten keine Lymphozyten gefunden werden. Dies entspricht dem Fehlen reifer T-Zellen in thymuslosen Tieren und beweist die Vollständigkeit der Thymektomie. Nichtlymphoide Zellen, nämlich Normoblasten und einzelne Granulozyten, zeigten eine asymmetrische, breite Verteilung vom M- bis in den H-Bereich. Gegenüber normalem Knochenmark (Abb.11) waren sie vermehrt; nicht zuletzt deshalb, weil Zellen bis 4,0 mm/h getrennt wurden, um einen möglichst großen Teil aller Lymphozyten zu erfassen.

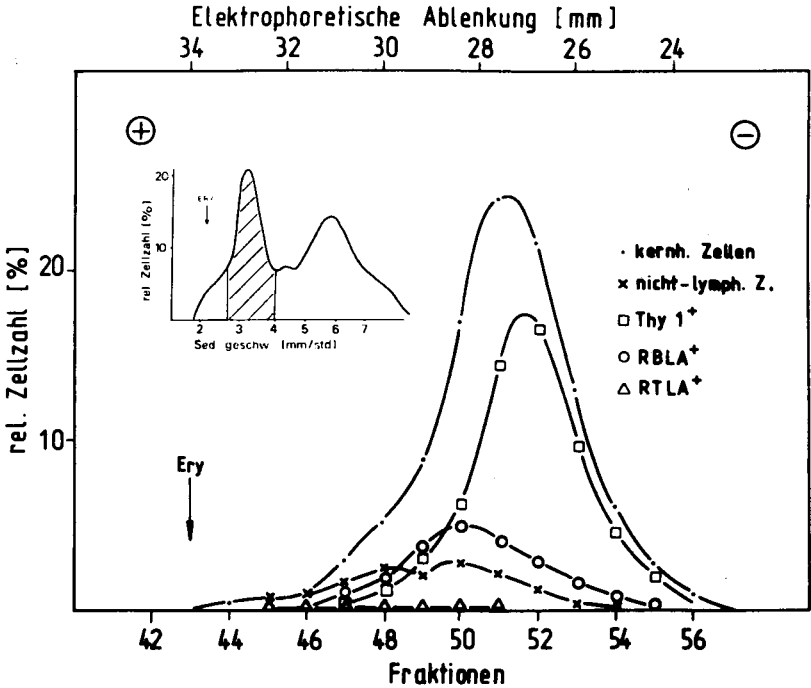


Abb.17 Verteilung langsam sedimentierender Knochenmarkszellen (2,7 bis 4,0 mm/h) aus thymektomierten, letal bestrahlten und FLC-rekonstituierten Ratten mit verschiedenen Oberflächenantigenen in der Zellelektrophorese

Die Differenzierungsantigene wurden in Cytotoxizitätstest und direkter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Auswertung erfolgten mit Thymus und Lk-Zellen als Kontrolle im Parallelansatz.

Der Hauptteil an langsam sedimentierenden Knochenmarkszellen wanderte unverändert mit sehr niedriger EB.

Beim Vergleich der Volumenhistogramme des L-Bereiches (Abb.18) zeigte sich, daß die dominierende Lymphozytenpopulation im Knochenmark normaler

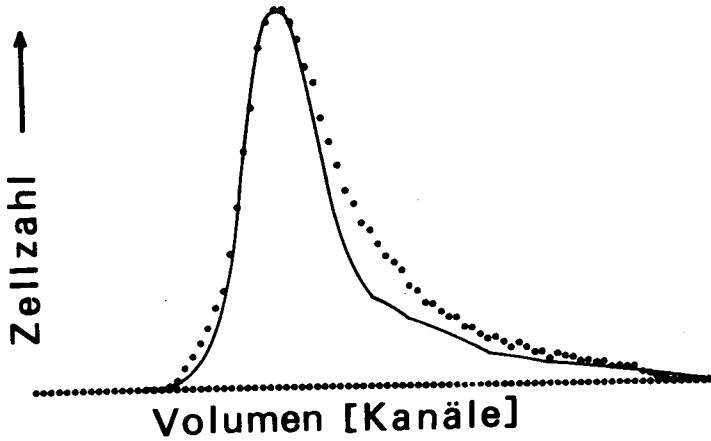


Abb.18 Volumenhistogramme der Fraktion 52 aus der Elektrophorese langsam sedimentierender Knochenmarkszellen (2,7 - 3,7 bzw. 2,7 - 4,7 mm/h) von normalen (-) und thymektomierten-letal bestrahlten-FLC-rekonstituierten (···) Tieren

und thymusloser Ratten nicht nur in Sedimentationsgeschwindigkeit und EB, sondern auch im Volumen übereinstimmte. Die rekonstituierten Tiere erhielten in diesem Bereich der Trennung jedoch offensichtlich einen höheren Anteil an größeren Zellen.

4.2 Oberflächenantigene

Um das Vorkommen der verschiedenen charakterisierten Knochenmarkslymphozyten in thymektomierten, letal bestrahlten und FLC-rekonstituierten Ratten zu untersuchen, wurden die Fraktionen der Elektrophorese auf Oberflächenantigene getestet.

Die Mehrzahl der Knochenmarkslymphozyten, die langsam sedimentiert, erwies sich als Thy-1-positiv (Abb.17). B-Lymphozyten, erkannt an dem

Besitz von RBLA, zeigten wieder mittlere EB und waren gegenüber normalen Tieren vermehrt. Keine Zellen mit dem T-Zell-Antigenen RTLA oder RHLA konnten gefunden werden.

An Zellen aus dem M- und H-Bereich, sowie aus dem Ausgangsmaterial für die Zellelektrophorese wurden Doppelmarkierungen vorgenommen. In der Immunfluoreszenz wurde so ein gleichzeitiges Auftreten verschiedener Oberflächenantigene auf den Zellen untersucht (Tab.3).

Bei diesen Versuchen war es wichtig, zu klären, ob die in den thymuslosen und bestrahlten Tieren gebildeten Lymphozyten wirklich aus den injizierten fetalen Leberzellen (FLC) hervorgegangen waren. Wie Tabelle 3 zeigt, hatten über 90% der Zellen das Histokompatibilitätsantigen H-1ⁿ, das sie als Abkömmlinge der FLC ausweisen. Über die Hälfte der langsam sedimentierenden Knochenmarkszellen trug gleichzeitig das Thy-1 Antigen. Diese Lymphozyten hatten sich also aus Stammzellen entwickelt, ohne den Einfluß eines Thymus.

RBLA- und Oberflächen-Ig-tragende Zellen waren gegenüber normalen Ratten in ihrem Anteil erhöht, zumindest im M-Bereich der Elektrophorese. Auch in den rekonstituierten Tieren trugen kleine Knochenmarkslymphozyten entweder B-Zell-spezifische Antigene oder den Thy-1-Komplex, nicht beide Differenzierungsantigene gleichzeitig. Außerdem unterschieden sich die RBLA-positiven von den Thy-1-positiven Lymphozyten noch in der EB (siehe auch Abb.17). Wieder etwa die Hälfte der Thy-1-positiven Knochenmarkslymphozyten zeigte auch das andere Thymusantigen: RThyA. Zwei verschiedene "thymusspezifische" Antigene wurden also auf Zellen nachgewiesen, die nie unter dem Einfluß eines Thymus gestanden hatten.

Nicht nur durch den Besitz des Thy-1 Antigens sind die meisten der kleinen Knochenmarkslymphozyten charakterisiert, sondern auch durch die Menge

DIREKTE IMMUNFLUORESCENZ	% MARKIERTE LYMPHOZYTEN IM REKONSTITUIERTEN KNOCHENMARK		
	DOPPELMARKIERUNG FITC / TRITC	NACH 1-G SED.	NACH 1-G SED. UND ELEKTROPH.
		rKM-Ly	rKM-L
H-1 ^{N+} / THY-1 ⁺	55	74	35
H-1 ^{N+} / THY-1 ⁻	40	21	60
H-1 ^{N-} / THY-1 ⁺	>0.1	>0.1	>0.1
sIg ⁺ / THY-1 ⁻	17	12	27
sIg ⁺ / THY-1 ⁺	>0.1	>0.1	>0.1
RBLA ⁺ / THY-1 ⁻	20	12	34
RBLA ⁺ / THY-1 ⁺	>0.1	>0.1	>0.1
RBLA ⁻ / THY-1 ⁺	57	75	33
RBLA ⁻ / THY-1 ⁻	23	13	33
(NORMOBLASTEN	15	5	20)
RTL ^{A+} / THY-1 ⁺	>0.1	>0.1	>0.1
RTHYA ⁺ / THY-1 ⁺	26	33	19

Tab.3 Doppelmarkierung von langsam sedimentierenden Knochenmarkszellen
(2,7 - 4,0 mm/h) aus thymektomierten, letal bestrahlten und FLC-
rekonstituierten Ratten vor und nach Zellelektrophorese

rKM-Ly = langsam sedimentierende Knochenmarkszellen (2,7 - 4,0 mm/h)
 rKM-L = Fr.52-54, rKM-M = Fr.49-50 aus der Elektrophorese von KM-Ly
 (siehe Abb.17)

dieses Differenzierungsantigens. In der Durchfluß-Cytofluorometrie mit FITC-markiertem anti-Thy-1 F(ab')₂ zeigten Knochenmarkszellen aus den rekonstituierten Ratten weitgehend identische Fluoreszenzintensitäten mit den bei normalen Tieren gemessenen (Abb.14). Die geringfügige Verschiebung zu höheren Kanälen kann durch den kleineren Prozentsatz an Thy-1-positiven Zellen in der untersuchten Zellprobe, und damit einer Verschiebung auf der Abszisse, erklärt werden.

Die dominierende Lymphozytenpopulation des Knochenmarks konnte anhand ihrer charakteristischen physikalischen Größen und aufgrund des Besitzes und der Oberflächendichte an thymusspezifischem Antigen eindeutig im Knochenmark thymektomierter, letal bestrahlter und FLC-rekonstituierter Ratten identifiziert werden. Für diese Knochenmarkslymphozyten ist damit ihre Thymusunabhängigkeit bewiesen.

5 Zellen mit Thy-1 Antigen in anderen lymphatischen Organen und ihre Thymusunabhängigkeit

Schließlich interessierte die Frage, inwieweit auch die peripheren lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten Lymphozyten mit thymusspezifischem Antigen enthalten. Es wurden Milz- und Lymphknotenzellen elektrophoretisch getrennt und in den einzelnen Fraktionen verschiedene Differenzierungsantigene in direkter Immunfluoreszenz nachgewiesen.

5.1 Milz

Die Abb.19 zeigt im oberen Abschnitt die typische Verteilung von Milzzellen in der Zellelektrophorese. Die Bimodalität des Trennprofils kommt durch die Anreicherung der RTLA-positiven T-Zellen im H-Bereich, und dem deutlich davon abgesetzten Gipfel der RBLA-positiven B-Zellen im L-Bereich zustande.

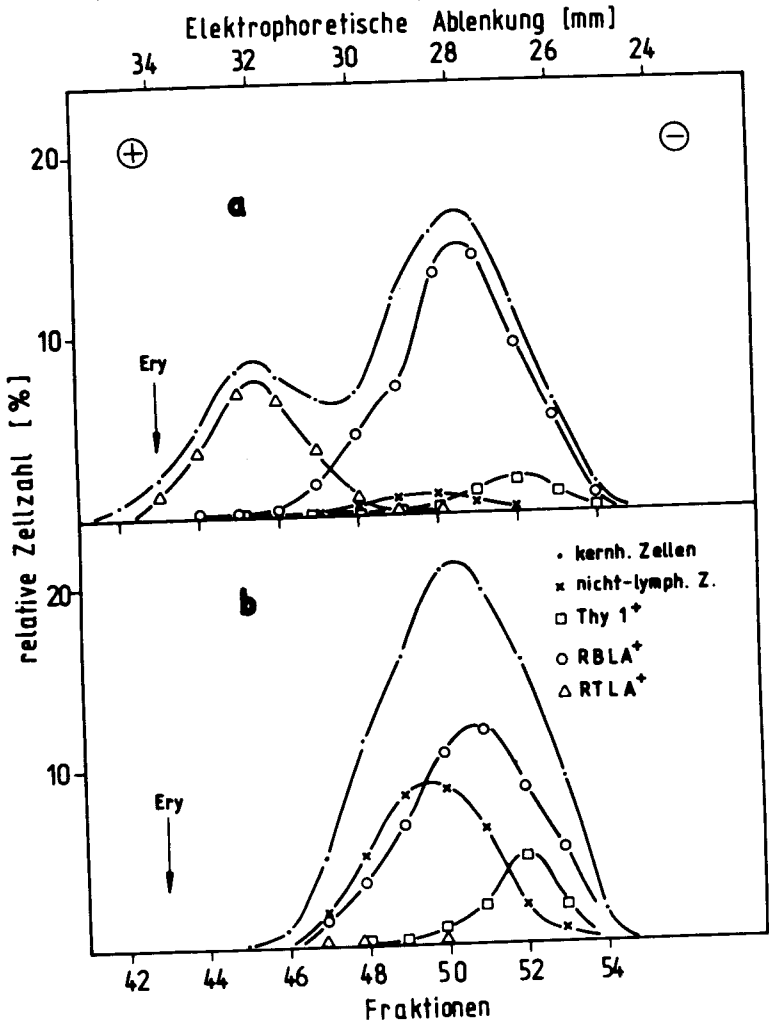


Abb.19 Verteilung von Milzzellen aus a) normalen und b) thymektomierten, letal bestrahlten und FLC-rekonstituierten Ratten mit verschiedener Morphologie und Oberflächenantigenen in der Zellelektrophorese

Die Differenzierungsantigene wurden in direkter Fluoreszenz nachgewiesen, mit Thymozyten als Kontrolle. Die Morphologie wurde in Giemsa-gefärbten Ausstrichen beurteilt.

Zellen mit Oberflächen-Immunglobulin (nicht gezeigt in Abb.19) wiesen gleiche Verteilung wie die durch RBLA charakterisierten Lymphozyten auf, doch waren sie in Fraktionen höherer EB weniger zahlreich als diese. Nichtlymphoide Zellen, überwiegend Granzulozyten, zeigten ebenso wie lymphoide "Nullzellen" mittlere EB.

In den am geringsten in der Elektrophorese abgelenkten Fraktionen fanden sich einige Zellen, die den Thy-1 Komplex auf ihrer Oberfläche trugen. Sie waren auch dann nachweisbar, wenn Milzzellen mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit zwischen 2,7 und 3,7 mm/h auf die Elektrophorese aufgetragen wurden, waren daher von geringer Zellgröße.

Ungefähr 5% der Milzzellen stimmten also im Besitz von Thy-1 Antigen, in der sehr niederen EB und in der etwa gleichen Zellgröße mit den Thy-1-positiven Knochenmarkslymphozyten überein. Durch ihr Vorkommen auch in der Milz von thymuslosen, FLC-chimären Ratten erwiesen sie sich ebenfalls als thymusunabhängig (Abb.19b). Sie waren in diesen Tieren vermehrt, ebenso wie die nichtlymphoiden Zellen. Eindrucksvoll dokumentierte sich das völlige Fehlen reifer T-Zellen in den thymektomierten, letal bestrahlten und FLC-rekonstituierten Tieren: Der H-Bereich des Milztrennprofils fehlte; RTLA-positive Zellen konnten nicht gefunden werden.

5.2 Lymphknoten

Die elektrophoretische Trennkurve von Lymphknotenzellen aus normalen Ratten war bimodal, entsprechend der Zusammensetzung im wesentlichen aus T- und B-Lymphozyten (Abb.20a). Während im L-Bereich der Elektrophorese die Mehrzahl der RBLA-positiven B-Zellen auch Oberflächen-Ig besaßen (nicht gezeigt in Abb.20a), wurden im M-Bereich der Elektrophorese, wo die B-Zell-Verteilung eine deutliche Schulter aufwies, vermehrt Zellen ange-

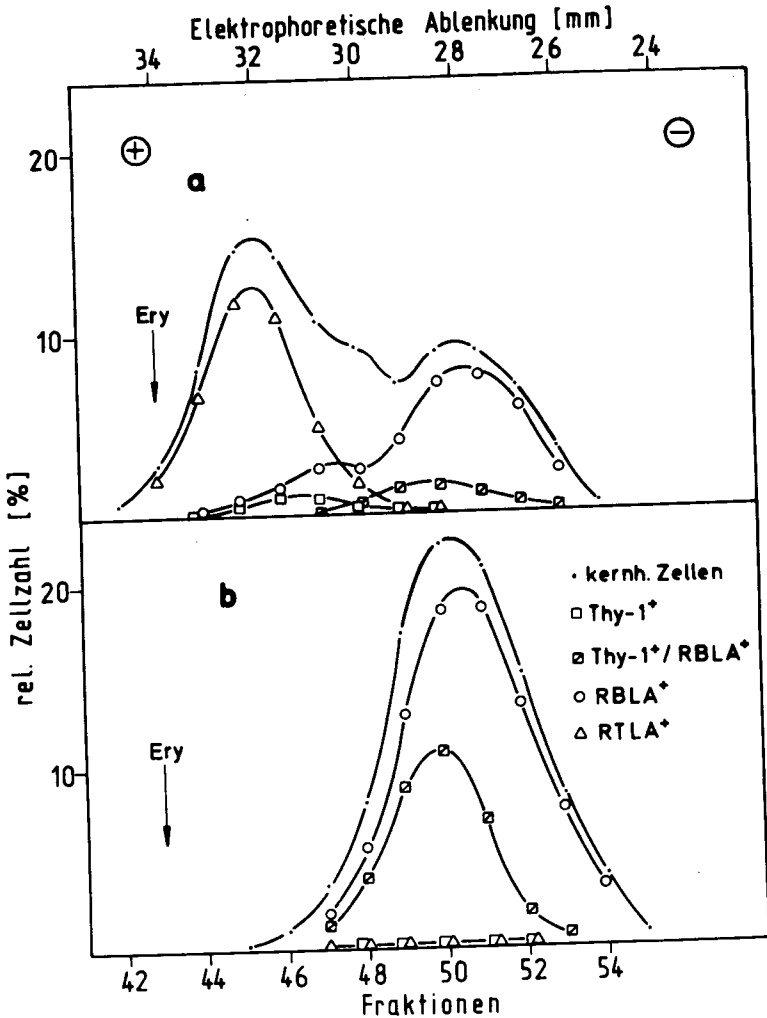


Abb.20 Verteilung von Lymphozytenzellen aus a) normalen und b) thymektomierten, letal bestrahlten und FLC-rekonstituierten mit verschiedenen Oberflächenantigenen in der Zellelektrophorese

Die Differenzierungsantigene wurden in direkter Immunfluoreszenz, in b) auch im Cytotoxizitätstest nachgewiesen. Doppelmarkierung wurde mit TRITC-anti-Thy-1 Immunglobulin-F(ab')₂ und FITC-anti-RBLA Immunglobulin-F(ab')₂ durchgeführt.

troffen, auf denen zwar RBLA, aber kein Ig nachweisbar war.

Es wurden auch im Lymphknoten Thy-1-positive Zellen beobachtet. Einige, mit dem Erscheinungsbild kleiner Lymphozyten, wanderten im elektrischen Feld mit hoher EB, aber etwas langsamer als reife T-Zellen. Sie machten ungefähr 3% der Lymphknotenzellen aus. Andere Zellen, die ebenfalls Reaktion mit fluoreszenzmarkierten anti-Thy-1 Antikörpern zeigten, waren deutlich größer und wurden morphologisch als Lymphozyten klassifiziert. Doppelmarkierungsversuche brachten das erstaunliche Ergebnis, daß diese Zellen sowohl TRITC-gekoppelte anti-Thy-1 Antikörper als auch FITC-gekoppelte anti-RBLA Antikörper banden. Die meisten von ihnen besaßen zusätzlich noch Oberflächen-Ig. Sie repräsentierten in normalen Ratten etwa 6% der Lymphknotenzellen und hatten niedere bis mittlere EB.

Für Objektivierung dieser beobachteten Größenunterschiede wurden Lk-Zellen durch 1-g Sedimentation getrennt (Abb.21). Es ergab sich ein Trennprofil mit einem Gipfel bei 3,5 mm/h und einer niederen, abfallenden Schulter zu größeren Zellen hin. Im Bereich zwischen 3,0 und 4,0 mm/h befanden sich einige Lymphozyten mit Thy-1 Antigen, die nicht gleichzeitig Oberflächen-Ig besaßen, und die nach elektrophoretischer Trennung dieses Bereiches bei hoher EB wiedergefunden wurden. Ein großer Teil der Zellen mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit über 4,0 mm/h trug ebenfalls das Thy-1 Antigen, aber gleichzeitig auch Oberflächen-Ig. In der Zellelektrophorese zeigten diese schnell sedimentierenden Lk-Zellen niedere EB.

Um die Thymusabhängigkeit dieser zwei verschiedenen Thy-1-tragenden Zellpopulationen im Lymphknoten zu klären, wurden auch thymektomierte und letal bestrahlte Ratten einen Monat nach FLC-Rekonstitution untersucht. Die Lymphknoten dieser Tiere waren verkleinert und ließen in der Zellelektrophorese, ebenso wie Knochenmark und Milz, den totalen Ausfall

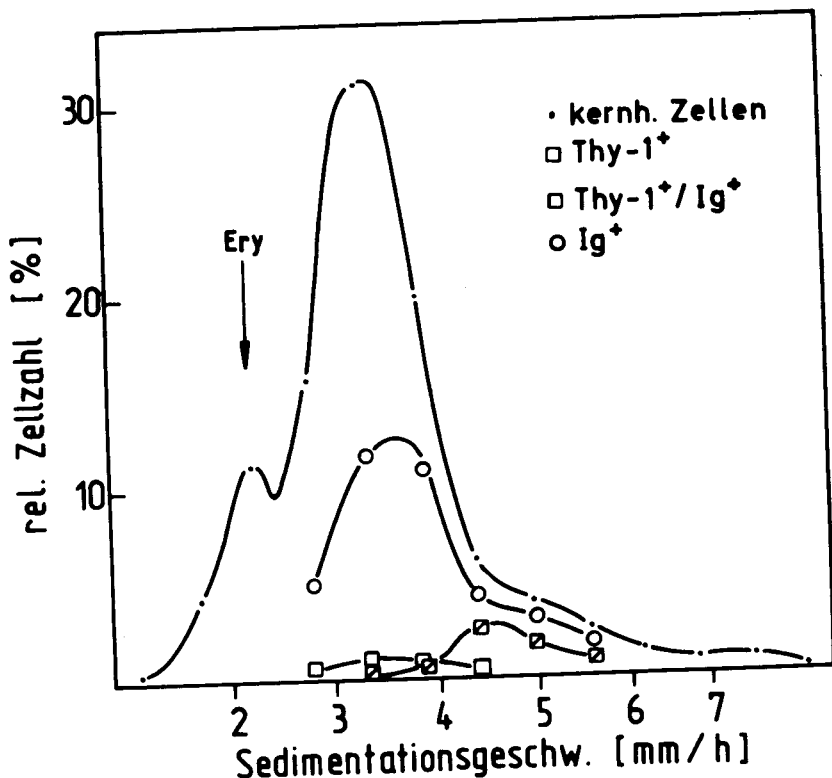


Abb.21 Verteilung von Lymphknotenzellen mit verschiedenen Oberflächenantigenen in der 1-g Sedimentation

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit TRITC-anti-Thy-1 Immunglobulin-F(ab')₂ und FITC-anti-Ratten-Ig Antiserum-F(ab')₂ doppelmarkiert.

der T-Lymphozyten deutlich erkennen (Abb.20b): Der Gipfel bei hoher EB fehlte ganz, und es wurden keine Zellen mit RTLA gefunden. Nichtlymphoide Zellen traten ebenso wie bei normalen Ratten im Lymphknoten nicht in Erscheinung.

Fast alle Zellen trugen das B-Zell-spezifische Antigen RBLA, und die

meisten von ihnen Oberflächen-Ig. Von den beiden Thy-1-positiven Lymphozytenpopulationen konnte die mit geringer Zellgröße, hoher EB und fehlenden B-Zell-Antigenen nicht in den thymuslosen, FLC-chimären Ratten gefunden werden und erwies sich daher als thymusabhängig.

Die großen Zellen mit RBLA und Thy-1 auf ihrer Oberfläche stellten einen Monat nach Rekonstitution ein Drittel der Lk-Zellen dar. Zu einem späteren Zeitpunkt war ihr Anteil geringer. Wegen ihrer Anhäufung in den Lymphknoten der rekonstituierten Tiere konnten die Differenzierungsantigene Thy-1 und RBLA auf ihnen auch im Cytotoxizitätstest nachgewiesen werden. Ihre Verteilung in der Zellelektrophorese schien gegenüber den anderen, kleinen B-Lymphozyten leicht zu höherer EB verschoben. Fast alle dieser Zellen hatten auch Oberflächen-Ig (nicht gezeigt in Abb.20b). Dabei war die Fluoreszenz mit dem FITC-markiertem anti-Ratten-Ig Antiserum deutlich schwächer als auf den zahlreichen kleinen B-Zellen. Beim Nachweis, daß die Lk-Zellen in den thymektomierten und letal bestrahlten Ratten auch wirklich von den injizierten Stammzellen aus fetaler Leber hervorgegangen waren, schien es, daß diese großen Thy-1⁺/RBLA⁺-Zellen beträchtlich mehr anti-H-1ⁿ Alloantiserum banden als die übrigen Lymphozyten.

Auch in Milz und Lymphknoten der Ratte wurden also Lymphozyten mit thymusspezifischem Antigen gefunden. Eine geringe Anzahl von kleineren Milzzellen zeigt das Thy-1-Antigen, sehr niedere EB und eine Thymusunabhängigkeit, und stimmte so weitgehend mit der im Knochenmark dominierenden Lymphozytenpopulation überein. Im Lymphknoten fanden sich einige wenige Zellen geringer Größe, die das Thy-1 Antigen trugen. Sie erwiesen sich durch ihre hohe EB und ihre Thymusabhängigkeit als zur T-Zell-Reihe gehörig. Andere Lk-Zellen zeigten neben dem Thy-1 Antigen zusätzlich auch RBLA und Oberflächen-Ig und müssen deshalb zu den B-Zellen gerechnet werden. Sie waren deutlich größer, hatten mittlere

bis niedere EB und waren thymusunabhängig. Den Thy-1-positiven Knochenmarkslymphozyten ähnliche Zelle wurden im Lymphknoten nicht gefunden.

Die Rekonstitution thymektomierter und letal bestrahlter Ratten bewirkte in Milz und Lymphknoten eine ausgeprägte Veränderung des Anteils der einzelnen Zellelemente, es traten aber keine nicht schon in den normalen Organen nachgewiesenen Zellen auf.

D DISKUSSION

1 Lymphozytenpopulationen im Knochenmark der Ratte

30-40% der Zellen des Knochenmarks sind Lymphozyten. Sie liegen neben einer ganzen Reihe anderer Blutzellen verschiedenen Differenzierungsstadiums vor und sind selbst heterogen in Bezug auf Funktion, Reifungsstufe und Aktivitätsgrad. Die Untersuchung der Knochenmarkslymphozyten wird erheblich erschwert durch die lückenhafte Kenntnis ihrer Funktion und durch die komplexe Zellzusammensetzung des Knochenmarks. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Kombination zweier Zelltrennmethoden eine weitgehende Anreicherung einzelner Lymphozytenpopulationen erreicht, die durch ihre physikalischen Parameter und Differenzierungsantigene charakterisiert werden konnten.

In der 1-g Sedimentation wurden kleine bis mittelgroße Lymphozyten, die die Hauptmenge (80-90%) aller Lymphozyten des Knochenmarks ausmachen, zu 90% rein von nichtlymphoiden Zellen erhalten. Diese trennten sich in der präparativen Zellelektrophorese weiter auf. Populationen großer lymphoider Zellen mit Sedimentationsgeschwindigkeiten über 3,6 mm/h wurden nicht weiter untersucht. Die physikalischen Trennmethoden ergaben zusammen mit elektronischer Partikelvolumenbestimmung Meßzahlen, mit denen verschiedene Zellpopulationen sehr genau beschrieben werden konnten. Sind doch physikalische Parameter ebenso charakteristische Eigenschaften einer Zelle wie Morphologie, Organlokalisation oder andere Merkmale (106,107). Auf den getrennten Zellen wurden mit hochspezifischen Antiseren Oberflächenantigene nachgewiesen und deren Menge mit der auf anderen Zellen verglichen.

Mindestens sechs verschiedene Lymphozytenpopulationen konnten so im

Knochenmark identifiziert werden, die mengenmäßig in Erscheinung treten (Tab.4).

Einige Zellen (Population 6) konnten durch den Nachweis der T-Zell-spezifischen Oberflächenantigene RTLA und RHLA und aufgrund ihrer hohen EB, sowie ihrer Thymusabhängigkeit, eindeutig als reife T-Lymphozyten klassifiziert werden. Der Literatur zufolge sind sie langlebig, gelangen durch Rezirkulation aus der Peripherie in das Knochenmark und sind dort unter anderem für die GvH (graft-versus-host)-Reaktion bei Knochenmarkstransplantationen verantwortlich (25-28). Versuche, durch Abtrennung der unerwünschten T-Zellen vom stammzellhaltigen Knochenmark mittels Dichtezentrifugation (108), 1-g Sedimentation (109,110) oder

	ZELL- VOLUMEN	SEDIMENT. GESCHWIND.	ELEKTROPH. BEWEGLICHK.	Thy-1	RThyA	RBLA slg	RTLA RHLA	THYMUS- ABHÄNGIGK	% ALLER KM LYMPH.	
1	92 μm^3	3,1 mm/h	NIEDRIG	+	-	-	-	-	70%	Thy-1 ⁺
2	120 μm^3	3,2 mm/h	NIEDRIG	+	+	-	-	-		
3	100 μm^3	3,2 mm/h	NIED/MITTEL	-	-	+	-	-	10%	B
4	141 μm^3	3,7 mm/h	NIED/MITTEL	-	-	+	-	-	2%	NULL
5	121 μm^3	3,5 mm/h	MITTEL	-	-	-	-	-	4%	T
6	118 μm^3	3,4 mm/h	HOCH	-	-	-	+	+		
	v=10%	v=20%								

Tab.4 Populationen kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten im Knochenmark unterscheidbar durch physikalische Größen und Differenzierungsantigene

Zellelektrophorese (21) diese Abstoßung des Empfängers durch das Transplantat zu vermeiden waren insbesondere für die humane Knochenmarkstransplantation bisher nur wenig erfolgreich. Die hier erstmals beschriebene Kombination von Zellsedimentation und Zellelektrophorese zur Trennung von Knochenmark könnte größeren Erfolg versprechen.

Die durch RBLA charakterisierten B-Lymphozyten (Populationen 3 und 4) wiesen große Heterogenität auf. Sie enthielten zwei Volumenpopulationen, zeigten in der Zellelektrophorese eine asymmetrische Verteilung im Bereich niederer bis mittlerer EB und unterschieden sich in Volumen, Menge und Anordnung von Oberflächen-Ig. Sie stellen wohl verschiedene Reifungsstufen von B-Lymphozyten dar (10,11). Vor allem diejenigen RBLA-positiven Zellen, bei denen kein Immunglobulin auf der Oberfläche nachweisbar war und die etwas höhere EB zeigten können in Analogie zur Maus (11,53,111) als unreife B-Zell Vorläufer angesehen werden.

Der Hauptteil der Knochenmarkslymphozyten aber trug weder T- noch B-Zellspezifische Antigene und kann daher als "Nullzellen" bezeichnet werden (10-12). Auf den meisten dieser Zellen war jedoch der Thy-1 Antigenkomplex nachweisbar. Die wenigen Nullzellen denen auch dieses Differenzierungsantigen fehlte (Population 5) zeigten mittlere EB und wurden auch in thymuslosen Ratten beobachtet.

Die meisten "Nullzellen", etwa 70% der Knochenmarkslymphozyten waren durch geringe Größe, niedere EB und durch den Besitz des Thy-1 Antigens charakterisiert (Population 1 und 2). Sie werden im folgenden als eine Population behandelt, obgleich 1/8 dieser Zellen ein etwas höheres Volumen und etwa die Hälfte zusätzlich das vom Thy-1 Komplex unabhängige thymuspezifische Antigen RThyA aufweist. Bei einem Anteil von Lymphozyten am Knochenmark von 30-40% stellen die Thy-1-positiven Zellen als dominierende

Lymphozytenpopulation in diesem Organ eine beachtliche Zellmasse dar. Sie bildeten den Hauptgegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

2 Die dominierende, Thy-1-positive Lymphozytenpopulation des Knochenmarks

Thymusantigen-tragende Zellen im Rattenknochenmark wurden zuerst von Zeiller und Dolan nach elektrophoretischer Trennung (34) und später von Williams (35), Hunt et al. (112) und Ritter et al. (113) an ungetrenntem Knochenmark beschrieben. Da viele Messungen, wie die Bestimmung von Antigenmengen durch Absorptionsstudien und Cytofluorometrie oder die Volumenanalyse, nur an hochangereicherten Zellpopulationen sinnvoll durchführbar sind, wurde in der vorliegenden Arbeit eine zweidimensionale Zellseparation angewendet. Dadurch wurde eine Isolierung und genauere Charakterisierung dieser Lymphozyten möglich.

Daß es sich bei dem Nachweis von Thy-1 auf diesen Knochenmarkslymphozyten nicht nur um eine Kreuzreaktion mit dem Thy-1 Antigen handelte, ergab sich aus der Verwendung von Antiseren mit Spezifität gegen verschiedene antigene Determinanten des Thy-1 Moleküls (85,86). Artspezifische, nicht-artspezifische und rassenspezifische Antigen determinanten des Thy-1 Komplexes waren gleichermaßen auf den Knochenmarkslymphozyten vorhanden.

Im Gegensatz zur Maus tragen in der Ratte reife T-Zellen das Thy-1 Antigen nicht (84,86,114). Daher wirft das Vorkommen des Thy-1 Antigens auf Lymphozyten außerhalb des Thymus die Frage auf, inwiefern der Thymus für dieses "thymusspezifische" Antigen eine Rolle spielt. Die Thymusabhängigkeit der beobachteten Zellen konnte an thymektomierten, letal bestrahlten und rekonstituierten Tieren untersucht werden. Durch die Verwendung fetaler Leberzellen für die Rekonstitution wurde sichergestellt,

daß nur Zellen in die bestrahlten Ratten injiziert wurden, die nie Kontakt mit einem Thymus gehabt hatten. Entsprechend wurden in den FLC-chimären Ratten keine reifen T-Zellen in Knochenmark, Milz und Lymphknoten beobachtet, im Gegensatz zu dem allgemein üblichen Chimärismus mit Knochenmark (39,115,116).

Der Nachweis von Histokompatibilitätsantigenen der injizierten Stammzellen auf den untersuchten Lymphozyten zeigte den Erfolg eines echten Chimärismus. Alle der hier untersuchten Zellen stammten von den fetalen Leberzellen ab und waren ohne Beteiligung eines Thymus entstanden. Diese Kontrolle war von Wichtigkeit, da bestrahlungsresistente Wirtszellen teilweise und zumindest vorübergehend T-Zell-Funktion wiederherstellen können (39,117). Die kleinen, Thy-1⁺ Knochenmarkslymphozyten waren auch in den rekonstituierten Tieren vorhanden und erwiesen sich so als thymusunabhängig. Ihre Identität mit den im normalen Knochenmark beobachteten Zellen erstreckte sich auf alle gemessenen physikalischen Parameter und auf Besitz und Menge an Differenzierungsantigenen.

Durch das Fehlen der T- oder B-Zell-spezifischen Antigene RTLA, RHLA und RBLA, sowie von Oberflächen-Ig, und durch die geringere EB unterscheiden sich diese Lymphozyten deutlich von reifen T- oder B-Zellen. Durch das Fehlen von RTLA und in der Menge an RThyA und Thy-1 Antigen sind sie weiterhin verschieden von allen T-Reifungsstadien des Thymus. Kortikale Thymozyten haben ähnliches Volumen und gleiche EB, zeigten aber eine 7 mal höhere Absorptionskapazität für RThyA- und Thy-1-spezifische Antikörper. Nicht nur die Thy-1 Antigenmenge sondern auch die Antikörperbindungskonstante schien für die Knochenmarkslymphozyten eine andere zu sein, wie die Cytofluorometrie ergab.

3 Thy-1-positive Lymphozyten in Milz und Lymphknoten

Nach der Charakterisierung dieser Knochenmarkslymphozyten wurde die Frage untersucht, inwieweit auch in anderen lymphatischen Organen der Ratte Zellen mit Thy-1 Antigen vorkommen. Dabei wurden in Milz und Lymphknoten ebenfalls Lymphozyten mit diesem Antigen gefunden, doch nur in geringer Zahl (Tab.5).

Nur die in der Milz gefundenen Thy-1-positiven Zellen stimmten auch in Größe, EB und ihrer Thymusabhängigkeit mit der Knochenmarkszellpopulation überein. Im Lymphknoten dagegen fanden sich zwei andere Lymphozytenpopulationen mit diesem Antigen: kleine, elektrophoretisch schneller wandernde Zellen können aufgrund der Thymusabhängigkeit der T-Zellreihe zugeordnet

GEWEBE	% ALLER LYMPHOZYTEN	ZELLGRÖSSE	SEDIMENT. GESCHW.	ELEKTROPH. BEWEGL.	RBLA sig	THYMUS-ABHÄNG.
KNOCHENMARK	70%	KLEIN	3.1 mm/h	NIEDRIG	-	-
MILZ	5%	KLEIN	2.7-3.6 mm/h	NIEDRIG	-	-
LYMPHKNOTEN	3%	KLEIN	2.7-3.6 mm/h	MITTEL/HOCH	-	+
"	6%	GROSS	4.0-5.5 mm/h	NIEDR/MITTEL	+	-

Tab.5 Thy-1-positive Lymphozytenpopulationen außerhalb des Thymus

werden; große lymphoide Zellen mit höherer Sedimentationsgeschwindigkeit und mittlerer EB zeigten neben Thy-1 auch RBLA und Oberflächen-Ig und sind daher zu den B-Zellen zu zählen.

Das Thy-1 Antigen ist demnach in der Ratte keinesfalls spezifisch für Zellen der T-Zellreihe.

4 Einordnung der dominierenden Lymphozytenpopulation des Knochenmarks

Eine Klassifizierung der dominierenden Lymphozytenpopulation des Rattenknochenmarks in die T- oder B-Zellreihe mittels verfügbarer Differenzierungsantigene, wie RTLA, RHLA, RBLA Thy-1 und RThyA, erwies sich so als nicht möglich. Wie sind diese Zellen dann einzuordnen?

Es könnte sich bei ihnen um unreife Vorstufen von T- oder B-Zellen handeln. Im folgendem sollen deshalb die hier besprochenen Zellen den aus der Literatur verfügbaren Ergebnissen über Lymphozytendifferenzierungsstufen im Knochenmark gegenübergestellt werden.

4.1 Vergleich mit Stammzellen

Die unreifsten Stufen der Lymphopoese sind die Stammzellen, die durch ihre Fähigkeit charakterisiert sind, Ursprung für eine Reihe verschiedener Blutzellarten zu sein und sich laufend selbst nachzubilden. Wirklich tragen die Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte im Gegensatz zur Maus Thy-1 Antigen (23,18). Doch in den Fraktionen der Zellsedimentation und Zellelektrophorese, in denen die kleinen, Thy-1-positiven Knochenmarklymphozyten angereichert waren, lagen milzkoloniebildende Zellen (CFU-S) jeweils verdünnter vor als im Ausgangsmaterial, d.h. Stammzellen besitzen höhere Sedimentationsgeschwindigkeit und EB, wie es auch für

die Maus beschrieben worden ist (19-21).

Ferner werden im Unterschied zu den Stammzellen die kleinen Knochenmarkslymphozyten aus großen Zellen (transitional cells) nachgebildet und nicht aus sich selbst (12,13), und sie schienen aufgrund des äußerst geringen DNS-Stoffwechsels in den entsprechenden Fraktionen eher eine nicht-proliferierende Zellpopulation darzustellen. Schließlich liegt die geschätzte Anzahl von Stammzellen bei unter 1% des Knochenmarks (2,22-24). Bei der dominierenden Lymphozytenpopulation des Knochenmarks kann es sich demnach nicht um Stammzellen handeln.

4.2 Vergleich mit B-Vorläuferzellen

Einige Autoren sehen diese Knochenmarkslymphozyten als Vorstufen der B-Zellen an. In der Maus wurde gefunden, daß die B-Zell-Entwicklung über "Nullzellen" abläuft, wie es ja auch hier besprochenen Zellen darstellen, in denen erst intrazelluläres Ig und später gleichzeitig Oberflächen-Ig gefunden wird, bis schließlich Immunglobulin nur mehr auf der Zelloberfläche nachweisbar ist (71,72). Kürzlich wurde beschrieben, daß ein großer Teil der Thy-1-positiven Zellen des Rattenknochenmarks zusätzlich auch Oberflächen-Ig trage und es sich daher bei diesen Zellen um Zwischenstufen in der B-Zell-Reifung handeln müsse (112,113). Die Autoren schlugen folgendes Schema der B-Zell-Differenzierung vor: $\text{Thy-1}^+ \text{Ig}^- \rightarrow \text{Thy-1}^+ \text{Ig}^+ \rightarrow \text{Thy-1}^- \text{Ig}^+$. Nach Anreicherung Thy-1-positiver Zellen mittels Fluoreszenzaktiviertem -Zellsorter und Injektion in bestrahlte Tiere wurden einen Monat später B-Zellen beobachtet, die Merkmale der Spenderzellen trugen (112).

Doch dieser Versuchsansatz kann nicht als Test für B-Vorläuferzellen angesehen werden, da auch pluripotente Stammzellen, die bekanntermaßen

Thy-1-positiv sind, nach dieser Zeit zur Bildung reifer B-Zellen geführt haben können. Einen Großteil (45%) der Thy-1⁺ Ig⁺-Zellen beschrieben die Autoren als "große" Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte an getrennten Knochenmarkszellen das gleichzeitige Auftreten von Thy-1 Antigen und Oberflächen-Ig auf den mangelmäßig überwiegenden, kleinen Lymphozyten ausgeschlossen werden. Es bleibt offen, inwieweit im Knochenmark auch große Lymphozyten mit Thy-1 und Immunglobulin sowie RBLA auf der Oberfläche vorkommen, wie sie in Lymphknoten identifiziert wurden, da Zellen mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit größer als 4 mm/h wegen des Überwiegens nichtlymphoider Zellen hier nicht weiter untersucht wurden. Die hier beschriebenen kleinen, langsam sedimentierenden Knochenmarkslymphozyten sind jedenfalls nicht mit den von den zitierten Autoren beobachteten und als Prä-B-Zellen interpretierten Thy-1⁺ Ig⁺-Zellen in Einklang zu bringen.

Neben der unterschiedlichen Zellgröße dürften auch methodische Gründe für die Diskrepanz der Beobachtungen verantwortlich sein. So war das hier verwendete Antiserum gegen Ratten-Ig ausgiebig mit Thymozyten absorbiert, weil anti-Ig Antiseren mit Thymozyten kreuzreagieren können (119,120). Es wurde eine F(ab')₂-Präparation der Antikörper eingesetzt und in direkter Immunfluoreszenz ausgetestet, wobei auch die von den anderen Autoren (112,113) beschriebene Fluoreszenz nichtlymphoider Zellen nicht beobachtet wurde. Ebenso scheint die Absorption des anti-Thy-1 Antiserums mit Lymphknotenzellen von wesentlicher Bedeutung für dessen Spezifität zu sein.

Auch folgende Befunde sprechen gegen die Einordnung der kleinen, Thy-1-positiven Knochenmarkslymphozyten als B-Zell-Vorläufer. Es konnten in ihnen kein intrazelluläres Immunglobulin nachgewiesen werden, das in

unreifen B-Zellen beobachtet wird (71,72). Ferner fehlte ihnen das B-Zell-spezifische Antigen RBLA. Dieses Antigen, wie auch das analoge MBLA in der Maus (10,52,111), kennzeichnet nicht nur reife, sondern auch unreife B-Lymphozyten, was sich schon in dem Vorkommen RBLA-positiver aber Ig-negativer Zellen im Bereich mittlerer EB der Elektrophorese von Milz, Lymphknoten und Knochenmark widerspiegelt.

Die Analyse der B-Zell-Differenzierung in der Maus mit physikalischen Trennmethode hat gezeigt, daß reife B-Lymphozyten aus Zellen mittlerer bis hoher EB entstehen, wobei die Abnahme der EB ein spätes Ereignis in der Reifung ist und dem Auftreten von Oberflächen-Ig nachfolgt, nicht vorausgeht (52-54,111). In der 1-g Sedimentation wandern B-Zell-Vorstufen, die in bestrahlten Mäusen eine humorale Immunantwort wiederherstellen, mit 5-7 mm/h (15,18). Die mengermäßig überwiegenden, Thy-1-tragenden Lymphozyten des Rattenknochenmarks dagegen waren klein und langsam sedimentierend (3,1 mm/h) und zeigten noch geringere EB als reife B-Zellen. Der Anteil von B-Vorläuferzellen im Knochenmark wird schließlich auf höchstens 1% geschätzt (10,18).

Nach all diesen Befunden ist eine Einordnung der dominierenden Lymphozytenpopulation im Rattenknochenmark als B-Zellen gleich welcher Reifungsstufe bisher nicht gerechtfertigt.

4.3 Vergleich mit T-Vorläuferzellen

So ist eine Zugehörigkeit zur T-Zell-Differenzierung in Betracht zu ziehen. Dabei müssen Reifungsstufen vor und nach Thymuspassage unterschieden werden (9,121). Eine Rolle als post-thymisch T-Vorläuferzelle scheidet durch den Nachweis dieser Zellen in thymektomierten, letal bestrahlten und rekonstituierten Ratten von vornherein aus. Es bleibt die Möglichkeit

der prä-thymischen T-Zell-Differenzierungsstufe. Derartige Thymozyten-Vorläufer sind auf verschiedene Weise im Knochenmark nachgewiesen worden.

Zum einen führt die Injektion von Knochenmarkszellen in bestrahlten Mäusen nach einer Latenz von 7-10 Tagen zur Repopularisierung des Thymus (8,122-125). Die Prothymozyten, die diese Fähigkeit besitzen, wurden als mittelgroße bis große Lymphozyten bestimmt (124). Weniger als 0,1% der injizierten Zellen sind allerdings im Thymus wiederzufinden und 100 Zellen scheinen auszureichen, um den gesamten Thymus wiederherzustellen (123). Im ungeschädigten Thymus ist der Eintritt von Zellen aus dem Knochenmark noch geringer (122,125).

Ein anderer in vivo-Test für T-Vorläuferzellen ist den Nachweis von T-Zell-Funktionen in letal bestrahlten Mäusen nach Knochenmarkstransplantation. In einem solchen System wurde für Prothymozyten eine Sedimentationsgeschwindigkeit von 5-8 mm/h ermittelt, die sie damit deutlich von Stammzellen und kleinen Lymphozyten unterscheidet (121).

Während auf Lymphozyten von angeborenermaßen thymuslosen, "nackten" Mäusen (nude mice) in direkter Immunfluoreszenz oder Cytotoxizitätstest kein Thy-1 Antigen nachweisbar ist, zeigen in indirekter Immunfluoreszenz eine Anzahl von Knochenmarks- und Milzzellen dieser Tiere geringe Mengen an Thy-1 (126-128). Diese Lymphozyten sind klein, haben niedere EB und sie verschwinden nach Thymustransplantation. Ähnliche Zellen wurden auch in thymektomierten, letal bestrahlten und Knochenmark-rekonstituierten Mäusen gefunden, nicht aber in unbehandelten Tieren (128,129). Aus den Merkmalen dieser Zellen und der nachweisbaren Besiedelung eines Thymustransplantates mit Wirtszellen in den "nackten" Mäusen schlossen die Autoren, daß es sich bei den schwach Thy-1-positiven Zellen um Prothymozyten handeln müsse (126-128). Die hier beschriebenen Knochenmarkslymphozyten, im Unterschied dazu, besitzen gut nachweisbares Thy-1 Antigen und sind in großer Menge in normalen Ratten vorhanden und in rekonstituierten Tieren eher vermindert.

Neuerdings ist es gelungen, die Umwandlung von Prothymozyten in Thymozyten in vitro zu induzieren. In dem Prothymozyten-Test von Komuro und Boyse (5,6) kann dabei das Auftreten von Thy-1 und 5 weiteren T-Zell-Antigenen auf Antigen-negativen Zellen aus "nackten" Mäusen oder fetaler Leber und Knochenmark normaler Mäuse innerhalb von zwei Stunden beobachtet werden. Neben Thymusextrakten sind alle Induktoren von cAMP erfolgreich, wie auch mitogene Stimulierung (6,130-132). Bis zu 10% der Knochenmarkszellen sind induzierbar. Von anderer Seite ist eingewendet worden, daß es sich bei dieser Induktion eher um eine Neuverteilung schon vorhandener Antigene als um echte Differenzierung handelt (132, 133). Weiter wurde der Verdacht geäußert, es könne sich in diesen in vitro-Versuchen eigentlich um post-thymische T-Vorläuferzellen handeln, selbst in den "nackten" Mäusen (121,134). Es ist vorerst unbekannt, ob die Thy-1-tragenden, kleinen Knochenmarkslymphozyten der Ratte oder ein Teil von ihnen durch Thymopoietin und andere Substanzen induzierbar sind, sich in Richtung Thymozyten oder T-Zellen zu verändern. Die hier beschriebene hohe Anreicherung dieser Zellen und ihre Trennung von reifen T-Zellen ist ein guter Ausgangspunkt für derartige Untersuchungen. Vorversuche zeigten bisher keine Reaktion dieser Zellen.

Ein auch für die Ratte untersuchtes Merkmal von T-Vorläuferzellen ist das Enzym Terminal-Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT, EC 2.7.7.31) (135-138). Es wird nur im Thymus und in geringem Maße im Knochenmark angetroffen und könnte eine Rolle bei der Entstehung der Mannigfaltigkeit der Immunspezifitäten (somatic mutation) spielen. In der Maus zeigt sich eine Regulation der enzymtragenden Knochenmarkszellen durch den Thymus indem die TdT-Aktivität in "nackten" Mäusen stetig abnimmt (138). Im Rattenknochenmark enthalten 1-2% der Zellen TdT, sie besitzen alle das Thy-1 Antigen und sind zum größten Teil "große" Lymphozyten (137).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den kleinen, Thy-1-tragenden Lymphozyten des Rattenknochenmarks um Vorstufen von T-Zellen handelt, doch sprechen die angeführten Untersuchungen über Prothymozyten eher dagegen als dafür. Besonders in der Zellgröße und der Menge der Zellen bestehen Gegensätze. Während Prothymozyten vorwiegend als große Zellen beschrieben werden und wenige Prozent der Knochenmarkszellen darstellen sind die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Thy-1-positiven Zellen ausgesprochen klein und machen über die Hälfte der Knochenmarkslimphozyten oder etwa 25% des Knochenmarks aus.

4.4 "Killer"-Zellen und terminale Zellentwicklung

Nach dem Vergleich dieser Zellen mit T- und B-Lymphozyten und ihren Differenzierungsstufen sollen sie nun noch den Nullzellen gegenübergestellt werden, die nicht nur als unreife Lymphozyten anzusehen sind, sondern bei denen in neuerer Zeit auch Funktionen entdeckt wurden. So sind außerhalb von T-Zellen auch "Killer"-Aktivitäten von Nullzellen beschrieben worden. Eine Antikörper-abhängige-zellvermittelte-Cytotoxizität (ADCC) wird von Zellen ausgeführt, die leicht nachweisbare Fc-Rezeptoren besitzen, über die sie Antikörper binden und so ihre Spezifität erlangen (139). Den hier diskutierten Knochenmarkslimphozyten fehlten dagegen Fc-Rezeptoren.

Eine natürliche-zellvermittelte Cytotoxizität (NK-Aktivität) von breiter gestreuter Spezifität gegen eine Vielzahl von Tumorzelllinien ist an Nullzellen gebunden, bei denen nur mit verfeinerten Methoden Fc-Rezeptoren nachgewiesen werden können und die in der Milz, aber nicht im Knochenmark angetroffen werden (140,141).

Die kleinen, Thy-1-positiven Knochenmarkslimphozyten stellen zwar Null-

zellen, aber keine "Killer"-Zellen dar. Daß es sich bei ihnen um Vorläufer dieser NK-Zellen handelt ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Schließlich bleibt noch die Möglichkeit, daß die große Menge dieser Zellen gar keine weitere Reifung mehr erfährt, sondern im Knochenmark zugrundegeht. Die Beobachtung zahlreicher phagozytierter Zellkerne im Knochenmark weist in diese Richtung (142). Eine ähnliche Möglichkeit wird für die kortikale Thymozyten diskutiert (122) und im Zusammenhang mit der Eliminierung "verbotener" Lymphozytenklone gesehen.

Überhaupt drängt sich ein Vergleich dieser Knochenmarkslymphozyten mit kortikalen Thymozyten auf: Eine große Anzahl sehr kleiner, eher einheitlicher Zellen mit niedriger EB wird laufend und rasch nachgebildet, ist selbst nicht-proliferierend und besitzt keine ersichtliche Funktion.

Nach der Betrachtung der dominierenden Lymphozytenpopulation des Rattenknochenmarks im Lichte der Untersuchungen über Lymphozytendifferenzierungen muß jede Interpretation dieser Zellen als unreife Vorstufen von T-, B- oder Nullzellen bisher als ungerechtfertigt und vorschnell erachtet werden.

5 Nutzen der zweidimensionalen Zelltrennung

Die hier beschriebene zweidimensionale Trennung von Rattenknochenmark nach Zellvolumen und -ladungsdichte erlaubte eine weitgehende Isolierung kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten und deren Charakterisierung durch physikalische Parameter und Differenzierungsantigene. Sie eröffnet die weitere Erforschung dieser noch ziemlich unbekanntem Zellen, insbesondere der dominierenden Lymphozytenpopulation.

Schon ein Teil der hier durchgeführten Messungen wäre nur ungenau oder

gar nicht an ungetrenntem Knochenmark möglich. Einigermaßen reine Zellpopulationen sind Voraussetzung für zahlreiche biologische und biochemische Untersuchungen. In Vorversuchen zeigten die isolierten kleinen, Thy-1-tragenden Knochenmarkslymphozyten ein charakteristisches Muster der Plasmamembranproteine, das sie deutlich von anderen Lymphozyten unterscheidet (Dr.W.Jilg, MPI für Biochemie, persönliche Mitteilung). Weiterhin können supprimierte Eigenschaften, wie z. B. die mitogene Stimulierbarkeit von Knochenmarkslymphozyten durch Lektine, nach Separation der verschiedenen Zellen erfaßbar werden (57).

Eine erfolgreiche Zelltrennung kann viel dazu beitragen, eine Zuordnung bekannter Funktionen zu bestimmten Zellen zu erreichen. Zum anderen zeigte sich, wie gerade Zellen unbekannter Funktion durch die Anwendung von Zelltrennmethoden erfaßbar werden.

Mit den hoch angereicherten und eingehend charakterisierten kleinen, Thy-1-positiven Knochenmarkslymphozyten sollte es möglich sein, auch der Aufklärung ihrer Funktion näherzukommen. Nach ihrer Isolierung können sie gezielt in vitro oder in vivo eingesetzt werden und anhand der definierten Merkmale ihr Verbleib und ihre etwaige Veränderung verfolgt werden. Ebenso erscheint die Herstellung von spezifisch gegen diese Zellen gerichteten Antikörper nun aussichtsreich, hängt doch die Qualität eines Antiserums wesentlich ab von der Reinheit der Zellen für Immunisierung und Absorption.

Gerade die Geschichte der Biochemie ist eng verbunden mit dem Versuch, die Bestandteile des untersuchten Systems zu separieren und anschließend zu charakterisieren. Auch die ersten Schritte der Lymphopoese und die Komplexität des Knochenmarks sollten durch die Anwendung diesen Prinzips auf Zellen aufgeklärt werden können, wie die vorliegende Arbeit zeigt.

E ZUSAMMENFASSUNG

Für eine nähere Untersuchung der Lymphozyten des Knochenmarks wurden Rattenknochenmarkszellen durch eine Kombination von 1-g Sedimentation und Zellelektrophorese zweidimensional getrennt und durch physikalische Parameter und Differenzierungsantigene charakterisiert.

Mittels Zellsedimentation konnten langsam sedimentierende, kleine bis mittelgroße Lymphozyten weitgehend rein von nichtlymphoiden Zellen erhalten werden. Sie stellen über 80% der Knochenmarkslymphozyten dar, zeigten äußerst niederen DNS-Stoffwechsel, enthielten Stammzellaktivität nur in geringem Ausmaß, besaßen kein intrazelluläres Immunglobulin und nur sehr wenige der Zellen hatten Fc-Rezeptoren. Diese Lymphozyten konnten durch Zellelektrophorese weiter aufgetrennt werden.

Nach elektronisch gemessenem Zellvolumen und durch Immunfluoreszenz und Cytotoxizitätstest bestimmtem Besitz von Oberflächenantigenen ließen sich mindestens 5 Lymphozytenpopulationen unterscheiden. Einige Zellen erwiesen sich aufgrund ihrer hohen elektrophoretischen Beweglichkeit (EB) und der Reaktion mit T-Zell-spezifischen Antiseren als reife T-Lymphozyten. B-Zellen, wahrscheinlich verschiedener Reifungsstufe, mit unterschiedlichem Volumen und Gehalt an Oberflächen-Ig wurden im Bereich mittlerer EB anhand eines B-Zell-spezifischen Antiserums identifiziert. Die weitaus größte Menge der Knochenmarkslymphozyten aber zeigte geringe Größe, niedere EB und den Thy-1 Antigenkomplex. Ein Teil von ihnen besaß noch ein weiteres thymusspezifisches Antigen, RThyA, und etwas größeres Volumen.

Die Thymusabhängigkeit dieser Zellen wurde in thymektomierten, letal bestrahlten und mit fetaler Leber rekonstituierten Ratten untersucht, wobei

die beobachteten Zellen ihre Herkunft von den Spender-Stammzellen an ihren Histokompatibilitätsantigenen erkennen ließen. T-Zellen fehlten diesen Tieren völlig; die kleinen, Thy-1-positiven Knochenmarkslymphozyten dagegen erwiesen sich als thymusunabhängig. Ähnliche Zellen wurden in geringer Zahl in der Milz gefunden, nicht jedoch in Lymphknoten, wo zwei andere, mengenmäßig kleine Lymphozytenpopulationen Thy-1 trugen.

Doppelmarkierungsversuche zeigten, daß die dominierenden Lymphozytenpopulation des Rattenknochenmarks zwar Thy-1 Antigen, aber nicht T- oder B-Zell-spezifische Antigene trägt. Thymozyten können 7 mal mehr anti-Thy-1 Antikörper binden als diese Zellen und mit anderer Affinität, wie sich in Absorptionsstudien und Durchfluß-Cytofluorometrie ergab. Auch die Quantität an RThyA war auf den Knochenmarkslymphozyten wesentlich geringer als auf Thymozyten. So unterscheiden sich diese Zellen deutlich von reifen T- und B-Zellen oder Thymozyten.

Der Vergleich mit der Literatur ergab, daß diese kleinen, Thy-1-positiven Knochenmarkslymphozyten aufgrund ihrer Anzahl, physikalischen Parameter und Differenzierungsantigene ebensowenig mit Stammzellen oder den bisher beschriebenen T- und B-Vorläuferzellen identisch sind. Deswegen erscheinen Versuche, diese Zellen in die T- oder B-Zellreihe einzuordnen bisher als ungerechtfertigt und ihre Rolle muß weiterhin als ungeklärt angesehen werden. Die hier erzielte hohe Anreicherung dieser Zellen und ihre eingehende Charakterisierung eröffnen neue Möglichkeiten ihrer Erforschung.

F LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Greaves,M.F., Owen,J.J.T. and Raff,M.C.
"T- and B-lymphocytes"
Amsterdam Excerpta Medica, Am. Elsevier Publ. Co., New York (1973)
- 2 Metcalf,D. and Moore,M.A.S.
"Haemopoietic cells"
North Holland Publ. Co., Amsterdam (1969)
- 3 Wu,A.M., Till,J.E., Siminovitch,L. and McCulloch,E.A.
Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system
J.exp.Med. 127, 455-461 (1968)
- 4 Abramson,S., Miller,R.G. and Phillips,R.A.
The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems
J.exp.Med. 143, 1567-1579 (1977)
- 5 Komuro,K. and Boyse,E.A.
Induction of T lymphocytes from precursor cells in vitro by a product of the thymus
J.exp.Med. 138, 479-482 (1973)
- 6 Scheid,M.P., Hoffmann,M.K., Komuro,K., Hämmerling,V., Abbott,J., Boyse,E.A., Cohen,G.H., Hooper,J.A., Schulot,R.S. and Goldstein,A.L.
Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and by non-thymic agents
J.exp.Med. 138, 1027-1032 (1973)
- 7 Komuro,K., Goldstein,G. and Boyse,E.A.
Thymus-repopulating capacity of cells that can be induced to differentiate to T cells in vitro
J.Immunol. 115, 195-198 (1975)
- 8 Ford,C.E. and Mickletham,H.S.
The thymus and lymph nodes in radiation chimaeras
Lancet 1, 359-362 (1963)
- 9 Stutman,O.
Humoral thymic factors influencing postthymic cells
Ann.N.Y.Acad.Sci. 249, 89-105 (1975)
- 10 Osmond,D.G. and Nossal,G.J.V.
Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow: II. Kinetics of maturation and renewal of antiglobulin-binding cells studied by double labelling
Cell.Immunol. 13, 132-145 (1974)
- 11 Ryser,J.E. and Vassalli,P.
Mouse bone marrow lymphocytes and their differentiation
J.Immunol. 113, 719-728 (1974)

- 12 Rosse,C.
Small lymphocyte and transitional cell populations of the bone marrow: Their role in the mediation of immune and hemopoietic progenitor cell functions
Int.Rev.Cyt. 45, 155-290 (1976)
- 13 Abdou,N.L., Alavi,J.B. and Abdou,N.I.
Human bone marrow lymphocytes: B and T cell precursors and subpopulations
Blood 47, 423-430 (1976)
- 14 Shortman,K.
Separation methods for lymphocyte populations
in "Contemp.Topics in Molec.Immunol." (G.L.Ada,ed.), Plenum Press,
Vol. 3 p.161-204 (1974)
- 15 Miller,R.G., Gorczynski,R.M., Lafleur,L., McDonald,H.R. and Phillips,R.A.
Cell separation analysis of B and T lymphocyte differentiation
Transplant.Rev. 25, 59-97 (1975)
- 16 Zeiller,K., Holzberg,E., Pascher,G. and Hannig,K.
Free flow electrophoretic separation of T and B lymphocytes:
Evidence for various subpopulations of B cells
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 105-110 (1972)
- 17 Amato,D., Cowan,D.H. and McCulloch,E.A.
Separation of immunocompetent cells from human and mouse hemopoietic
cell suspensions by velocity sedimentation
Blood 39, 472-480 (1972)
- 18 Lafleur,L., Miller,R.G. and Phillips,R.A.
Restriction of specificity in the precursors of bone marrow-associated
lymphocytes
J.exp.Med. 137, 954-966 (1973)
- 19 Worton,R.G., McCulloch,E.A. and Till,J.E.
Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their
capacity for selfrenewal
J.exp.Med. 130, 91-103 (1969)
- 20 Metcalf,D. and McDonald,H.R.
Heterogeneity of in vitro colony- and cluster-forming cells in the
mouse marrow: Segregation by velocity sedimentation
J.Cell.Physiol. 85, 643-654 (1974)
- 21 Zeiller,K., Schubert,J.C.F., Walther,F. and Hannig,K.
Free flow electrophoretic separation of bone marrow cells: Electro-
phoretic distribution analysis of in vitro colony forming cells in
mouse bone marrow
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 95-104 (1972)
- 22 Ramsell,T.G. and Yoffey,J.M.
The bone marrow of the adult male rat
Acta.Anat. 47, 55-65 (1961)

- 23 Goldschneider, I.
Heterologous antiserum to rat lymphohemopoietic precursor cells
J. Immunol. 118, 2040-2045 (1977)
- 24 van Bekkum, D.W., van den Engh, G.J., Wagemaker, G., Bol, S.J.L. and Visser, J.W.M.
Structural identity of the pluripotential hemopoietic stem cell
Blood Cells 5, 143-159 (1979)
- 25 Waksman, B.H., Raff, M.C. and East, J.
T and B lymphocytes in New Zealand Black mice: an analysis of the theta, TL and MBLA markers
Clin. Exp. Immunol. 11, 1-12 (1971)
- 26 Balch, C.M. and Feldman, J.D.
Thymus-dependent (T) lymphocytes in the rat
J. Immunol. 112, 79-86 (1974)
- 27 Claman, H.N.
Bone marrow T cells: II. Thymic dependency
Cell. Immunol. 13, 484-488 (1974)
- 28 Röpke, C., Hougen, H.P. and Everett, N.B.
Long-lived T and B Lymphocytes in the bone marrow and thoracic duct lymph of the mouse
Cell. Immunol. 15, 82-93 (1975)
- 29 Stocker, J.M., Osmond, D.G. and Nossal, G.J.V.
Differentiation of lymphocytes in the mouse bone marrow:
III. The adoptive response of bone marrow cells to a thymus cell-independent antigen
Immunology 27, 795-806 (1974)
- 30 Benner, R., Meima, F. and van der Meulen, M.
Antibody formation in mouse bone marrow:
II. Evidence for a memory-dependent phenomenon
Cell. Immunol. 13, 95-106 (1974)
- 31 Howard, J.C. and Scott, D.W.
The role of recirculating lymphocytes in the immunological competence of rat bone marrow cells
Cell. Immunol. 3, 421-429 (1972)
- 32 Everett, N.B. and Chaffrey, R.W.
Radioautographic studies of bone marrow small lymphocytes in "The Lymphocyte in Immunology and Haemopoiesis" (J.M. Yoffey, ed), Edward Arnold, London, p.108-120 (1967)
- 33 Basten, A., Miller, J.F.A.P., Warner, N.L. and Pye, J.
Specific inactivation of thymus-derived (T) and non-thymus-derived (B) lymphocytes by ¹²⁵I-labelled antigen
Nature New Biol. 231, 104-106 (1971)

- 34 Zeiller, K. and Dolan, L.
Thymus specific antigen on electrophoretically separated rat lymphocytes: Tracing of the differentiation pathway of bone marrow-derived thymocytes by use of a surface marker
Eur. J. Immunol. 2, 439-444 (1972)
- 35 Williams, A.F.
Many cells in rat bone marrow have cell-surface Thy-1 antigen
Eur. J. Immunol. 6, 526-528 (1976)
- 36 Miller, J.F.A.P. and Mitchell, G.F.
Thymus and antigen reactive cells
Transplant. Rev. 1, 3-42 (1969)
- 37 Howard, J.C.
The life-span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from the rat thoracic duct
J. exp. Med. 135, 185-199 (1972)
- 38 Anderson, R.E. and Warner, N.L.
Ionizing radiation and the immune response
Adv. Immunol. 24, 215-335 (1976)
- 39 Balch, C.M. and Feldman, J.D.
Origin and development of rat thymus-dependent (T) lymphocytes
J. Immunol. 112, 87-95 (1974)
- 40 Goldschneider, I. and Barton, R.W.
Development and differentiation of lymphocytes in "The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development" (G. Poste and G.L. Nicolson, eds.), Elsevier, North-Holland Biomedical press p. 599-696 (1976)
- 41 Haas, R.J., Bohne, F. and Fliedner, T.M.
Cytokinetic analysis of slowly proliferating bone marrow cells during recovery from radiation injury
Cell Tissue Kinet. 4, 31-39 (1971)
- 42 Shortman, K., Fidler, J.M., Schlegel, R.A., Nossal, G.J.V., Howard, M., Lipp, J. and von Boehmer, H.
Subpopulations of B lymphocytes: Physical separation of functionally distinct stages of B-cell differentiation in "Contemp. Topics in Immunobiol." Vol. 5, p. 1-45 (1976)
- 43 Shortman, K., von Boehmer, H., Lipp, J. and Hopper, K.
Subpopulations of T lymphocytes: Physical separation, functional specialisation and differentiation pathways of subsets of thymocytes and thymus-dependent peripheral lymphocytes
Transplant. Rev. 25, 163-210 (1975)
- 44 Peterson, E.A. and Evans, W.H.
Separation of bone marrow cells by sedimentation at unit gravity
Nature 214, 824-825 (1967)

- 45 Osmond, D.G., Miller, R.G. and von Boehmer, H.
Characterization of immunoglobulin-bearing and other small lymphocytes in mouse bone marrow by sedimentation and electrophoresis
J. Immunol. 114, 1230-1236 (1975)
- 46 McDonald, H.R. and Miller, R.G.
Synchronization of mouse L-cells by a velocity sedimentation technique
Biophys. J. 10, 834-842 (1970)
- 47 Williams, N. and Moore, M.
Sedimentation velocity characterization of the cell cycle of granulocytic progenitor cells in monkey hemopoietic tissue
J. Cell. Physiol. 82, 81-92 (1973)
- 48 Zeiller, K., Hannig, K. and Pascher, G.
Free-flow electrophoretic separation of lymphocytes: Separation of graft versus host reactive lymphocytes of rat spleen
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1168-1170 (1971)
- 49 Zeiller, K., Liebich, H.G. and Hannig, K.
Free-flow electrophoretic separation of lymphocytes: Two thoracic duct lymphocyte subpopulations studied after prolonged cannulation and immunization
Eur. J. Immunol. 1, 315-322 (1971)
- 50 Häyry, P., Andersson, L.C., Gahnberg, C. Roberts, P., Ranki, A. and Nordling, S.
Fractionation of immunocompetent cells by free-flow cell electrophoresis
Israel. J. Med. Sci. 11, 1299-1318 (1975)
- 51 von Boehmer, H., Shortman, K. and Nossal, G.J.V.
The separation of different cell classes from lymphoid organs: X. Preparative electrophoretic separation of lymphocyte subpopulations from mouse spleen and thoracic duct lymph
J. Cell. Physiol. 83, 231-242 (1974)
- 52 Zeiller, K., Pascher, G. and Hannig, K.
B lymphocyte subpopulations in the mouse spleen: A study of the differentiation pathway using free flow electrophoretically separated subpopulations of direct PFC progenitor cells
Immunology 31, 863-880 (1976)
- 53 Zeiller, K., Pascher, G., Wagner, G., Leibich, H.G., Holzberg, E. and Hannig, K.
Distinct subpopulations of thymus-dependent lymphocytes: Tracing of the differentiation pathway of T cells by use of preparatively electrophoretically separated mouse lymphocytes
Immunology 26, 995-1012 (1974)
- 54 Schlegel, R.A., von Boehmer, H. and Shortman, K.
Antigen-initiated B-lymphocyte differentiation: Electrophoretic separation of different subpopulations of AFC progenitors for unprimed IgM and memory IgG responses to the NIP determinant
Cell. Immunol. 16, 203-217 (1975)

- 55 Miller,R.G. and Phillips,R.A.
Separation of cells by velocity sedimentation
J.Cell.Physiol. 73, 191-201 (1969)
- 56 Miller,R.G.
Separation of cells by velocity sedimentation
in "Techniques in Biophysics and Cell Biology" (Pain,R., Smith,B.
eds.), Wiley, London, Vol.1 p.87-112 (1973)
- 57 Hansen,E.
Separation und Charakterisierung von Knochenmarkslymphozyten der
Ratte
Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians Uni-
versität, München (1975)
- 58 Zeiller,K., Hansen,E., Leihener,D., Pascher,G. and Wirth,H.
Analysis of velocity sedimentation techniques in cell separation:
Influence of apparative and sample properties on separation power,
resolution and sensitivity
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 1309-1319 (1976)
- 59 Hannig,K.
Separation of cells and particles by continuous free-flow electro-
phoresis
in "Techniques of biochemical and biophysical morphology" (Glick,D.
and Rosenbaum,R.M., eds.) Wiley-Interscience, New York, Vol.1
p. 192-232 (1972)
- 60 Hannig,K. and Zeiller,K.
Zur Auftrennung und Charakterisierung immunkompetenter Zellen mit
Hilfe der trägerfreien Ablenkungselektrophorese
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 350, 467-472 (1969)
- 61 Hannig,K.
Free-flow electrophoresis: A technique for continuous preparative
and analytical separation
in "Methods in Microbiology" (Norris,J.R. and Ribbons,D.W. eds.),
Acad.Press, London, Vol.5, Chap.8 p.513-548 (1971)
- 62 Zeiller,K., Schindler,R.K. and Liebich,H.G.
The T lymphocyte surface in development: A study of the electroki-
netic, antigenetic and ultrastructural properties of T lymphocytes
in mouse thymus and lymph nodes
Israel.J.Med.Sci. 11, 1242-1266 (1975)
- 63 Zeiller,K., Löser,R., Pascher,G. and Hannig,K.
Free-flow electrophoresis: II. Analysis of the method with respect
to preparative cell separation
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 1225-1244 (1975)
- 64 Hannig,K., Wirth,H., Schindler,R.K. and Spiegel,K.
Free-flow electrophoresis: III. An analytical version for a rapid
quantitative determination of electrophoretic parameters
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 358, 753-763 (1977)

- 65 Hannig,K., Wirth,H., Meyer,B.H. and Zeiller,K.
Free-flow electrophoresis: I. Theoretical and experimental investigations of the influence of mechanical and electrokinetic variables on the efficiency of the method
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 1209-1223 (1975)
- 66 Thom,R. and Kachel,V.
Fortschritte für die elektronische Größenbestimmung von Blutkörperchen
Blut 21, 48-50 (1970)
- 67 Kachel,V.
Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument "Metricell"
J.Histochem.Cytochem. 24, 211-230 (1976)
- 68 Valet,G., Hofmann,H. and Ruhenstroth-Bauer,G.
The computer analysis of volume distribution curves: Demonstration of two erythrocyte populations of different size in the young guinea pig and analysis of the mechanism of immune lysis of cells by antibody and complement
J.Histochem.Cytochem. 24, 231-246 (1976)
- 69 Doljanski,F., Benn-Sasson,S., Reich,M. and Grover,N.B.
Dynamic behavior of chick blood lymphocytes
J.Cell.Physiol. 84, 215-224 (1974)
- 70 Seiler,F.R., Sedlacek,H.H., Kanzy,E.J. and Lang,W.
Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweismethoden zur Differenzierung funktionell verschiedener Lymphozyten: Spontanrosetten, Komplementrezeptor-Rosetten und Immunglobulinrezeptoren
Behring Inst.Mittl. 52, 26-72 (1972)
- 71 Raff,M.C., Megson,M., Owen,J.J.T. and Cooper,M.D.
Early production of intracellular IgM by B-lymphocyte precursors in mouse
Nature,259, 224-226 (1976)
- 72 Askonas,B.A., Roelants,G.E., Mayor-Withey,K.S. and Welstead,J.L.
Dual pathway of B lymphocyte differentiation in vitro
Eur.J.Immunol. 6, 250-256 (1976)
- 73 Till,J.E. and McCulloch E.A.
A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells
Radiat.Res. 14, 213-222 (1961)
- 74 Boyse,E.A. and Old,L.J.
Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics
Ann.Rev.Genet. 3, 269 290 (1969)
- 75 Raff,M.C.
Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence
Immunology 19, 637-650 (1970)

- 76 Waksman, B.H.
Study of functional lymphocyte populations with heterologous antisera
Transplant.Rev. 6, 30-51 (1971)
- 77 Boyse, E.A. and Old, L.J.
The immunogenetics of differentiation in the mouse
in "Harvey Lectures" 71, 23-53 (1975-1976)
- 78 Zeiller, K. and Pascher, G.
Differentiation antigens in rat lymphocyte subpopulations recognized by rabbit antisera against electrophoretically separated cells
Eur.J.Immunol. 8, 469-477 (1978)
- 79 Goldschneider, I. and McGregor, D.D.
Anatomical distribution of T and B lymphocytes in the rat: Development of lymphocyte-specific antisera
J.exp.Med. 138, 1443-1465 (1973)
- 80 Howard, J.C. and Scott, D.W.
The identification of sera distinguishing marrow-derived and thymus-derived lymphocytes in the rat thoracic duct
Immunology 27, 903-922 (1974)
- 81 Fabre, J.W. and Williams, A.F.
Quantitative serological analysis of rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterisation of the major antigen recognized
Transplantation 23, 349-359 (1977)
- 82 Goldschneider, I.
Antigenic relationship between medullary thymocytes and a sub-population of peripheral T cells in the rat: description of a masked antigen
Cell Immunol. 16, 269-284 (1975)
- 83 Reif, A.E. and Allen, J.M.V.
The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues
J.exp.Med. 120, 413-433 (1964)
- 84 Douglas, T.C.
Occurrence of a theta-like antigen in rats
J.exp.Med. 136, 1054-1062 (1972)
- 85 Acton, R.T., Morris, R.J. and Williams, A.F.
Estimation of the amount and tissue distribution of rat Thy-1.1 antigen
Eur.J.Immunol. 4, 598-602 (1972)
- 86 Thiele, H.G., Stark, R. and Keeser, D.
Antigenic correlations between brain and thymus: I. Common antigenic structures in rat and mouse brain tissue and thymocytes
Eur.J.Immunol. 2, 424-429 (1972)

- 87 Thiele,H.G. and Stark,R.
Common antibody-induces redistribution on thymocytes of strain-, species- and non-species-specific antigenic determinants shared by brain and thymocytes of mice
Immunology 27, 807-813 (1974)
- 88 Arndt,R., Stark,R., Klein,P., Müller,A. and Thiele,H.G.
Solubilization and molecular characterization of membrane-bound antigens shared by thymocytes and brain
Eur.J.Immunol. 6, 333-340 (1976)
- 89 Williams,A.F., Barclay,A.N., Letarte-Muirhead,M. and Morris,R.J.
Rat-Thy-1 antigens from thymus and brain: Their tissue distribution, purification and chemical composition
in "Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology"
Vol.41 p.51-61 (1977)
- 90 Trowbridge,L.S., Weissman,I. and Bevan,M.J.
Mouse T-cell surface glycoprotein recognized by heterologous anti-thymocyte sera and its relationship to Thy-1 antigen
Nature 256, 652-654 (1975)
- 91 Stanworth,D.R.
A rapid method of preparing pure serum gamma-globulin
Nature 188, 156-157 (1960)
- 92 Voet,L., Hannig,K. and Zeiller,K.
Cytofluorometric analysis of R-Thy-1 antigens in various rat lymphocytes with different electrophoretic mobility and organ distribution
J.Histochem.Cytochem. 27. 426-431 (1979)
- 93 Boyse,E.A., Old,L.J. and Stockert,E.
An approach to the mapping of antigens on the cell surface
Proc.Natl.Acad.Sci. 60, 886-893 (1968)
- 94 Gooding,L.R. and Eddin,M.
Cell surface antigens of a mouse testicular teratoma: Identification of an antigen physically associated with H-2 antigens on tumor cells
J.exp.Med. 140, 61-78 (1974)
- 95 Günther,E. and Stark,O.
The major histocompatibility system of the rat (Ag-B or H-1 system) in "The Major Histocompatibility System in Man and Animals"
(D.Götze,ed.) Springer, Berlin, chap.6 p.207-253 (1977)
- 96 Nisonoff,A., Markus,G. and Wissler,F.C.
Separation of univalent fragments of rabbit antibody by reduction of a single, labile disulphide bond
Nature 189, 293-295 (1961)
- 97 Nairn,R.C.
Appendix in "Fluorescent Protein Tracing; (Nairn,R.C.,ed.) Churchill, London, p.369-377 (1976)

- 98 Herzenberg, L.A., Sweet, R.G. and Herzenberg, L.A.
Fluorescence-activated cell sorting
Sci. Am. 234, 108-117 (1976)
- 99 Colley, D.G., Malakian, A. and Waksman, B.H.
Cellular differentiation in the thymus: II. Thymus-specific
antigens in rat thymus and peripheral lymphoid cells
J. Immunol. 104, 585-592 (1970)
- 100 Leif, R.C., Smith, S.B., Warters, R.L., Dunlap, L.A. and Leif, S.B.
Bouyant density separation of cells: I. The bouyant density
distribution of guinea pig bone marrow cells
H. Histochem. Cytochem. 23, 378-389 (1975)
- 101 Lay, W.H. and Nussenzweig, V.
Receptors for complement on leukocytes
J. exp. Med. 128, 991-1007 (1968)
- 102 Leihener, D.
Untersuchung zur Proliferation und Differenzierung getrennter
Thymus-Lymphozyten mit Hilfe phasenspezifischer Zellzyklus-Marker
Dissertation im Fachbereich Biologie der Eberhard-Karl-Universität,
Tübingen (1978)
- 103 Shortman, K. and Jackson, H.
The differentiation of T lymphocytes: I. Proliferation kinetics
and interrelationship of subpopulations of mouse thymus cells
Cell. Immunol. 12, 230-246 (1974)
- 104 Fathman, C.G., Small, M., Herzenberg, L.A. and Weissman, J.L.
Thymus cell maturation: II. Differentiation of three "mature"
subclasses in vivo
Cell. Immunol. 15, 109-128 (1975)
- 105 Thiele, H.G., Stark, R., Keeser, D. and Zimpel, H.
Antigenic correlations between brain and thymus: II. Further evi-
dence for the organ specificity of the thymus-brain system in mice
Z. Immun. Forsch. 146, 346-359 (1974)
- 106 Moon, R., Phillips, R.A. and Miller, R.G.
Sedimentation and volume analysis of human bone marrow
Ser. Haematol. 5, 163-178 (1972)
- 107 MacKnight, A.D.C. and Leaf, A.
Regulation of cellular volume
Physiol. Rev. 57, 510-573 (1977)
- 108 van Bekkum, D.W.
Use and abuse of hemopoietic cell grafts in immune deficiency
diseases
Transplant. Rev. 9, 3-53 (1972)

- 109 Abu-Zahra,H., Amato,D., Aye,M.T., Bergsagel,D.E., Cowan,D.H., Clarysee,A.M., Fornasier,V.L., Hasseback,R. and Iscove,N.N. Bone marrow transplantation in patients with acute leukemia *Ser.Haematol.* 5, 189-204 (1972)
- 110 Phillips,R.A. and Miller,R.G. Physical separation of hemopoietic stem cells from cells causing graft-versus-host disease. I. Sedimentation properties of cells causing graft-versus-host disease *J.Immunol.* 105, 1168-1174 (1970)
- 111 Shortman,K. The separation of lymphoid cells on the basis of physical parameters: Separation of B- and T-cell subsets and characterization of B-cell differentiation stages in "Methods of cell separation" Vol.I. (Catsimopoulos,N.,ed.) Plenum Publ. Corp. p.229-249 (1977)
- 112 Hunt,S.V., Mason,D.W. and Williams,A.F. In rat bone marrow Thy-1 antigen is present on cells with membrane immunoglobulin and on precursors of peripheral B-lymphocytes *Eur.J.Immunol.* 7, 817-823 (1977)
- 113 Ritter,M.A., Gordon,L.K. and Goldschneider,I. Distribution and identity of Thy-1 bearing cells during ontogeny in rat hemopoietic and lymphoid tissues *J.Immunol.* 121, 2463-2471 (1978)
- 114 Douglas,T.C. A rat analog of the mouse theta antigen *Transplant.Proc.* 5, 79-82 (1973)
- 115 Roy,R., McNicoll,J. and Daguillard,F. Immunological activities of rat lymphocytes: I. Mitogenic responses and surface markers of lymphocytes from normal, thymectomized and B rats *Int.Archs.Allergy appl. Immunol.* 52, 32-41 (1976)
- 116 Gillette,R.W. Studies of the T-lymphocytes resident in the spleens of thymectomized, irradiated bone marrow-reconstituted (TXB) mice *Cell.Immunol.* 27, 200-213 (1976)
- 117 Kadish,J.L. and Basch,R.S. Thymic regeneration after lethal irradiation: Evidence for a intra-thymic radioresistant T cell precursor *J.Immunol.* 114, 452-458 (1975)
- 118 Thierfelder,S. Haemopoietic stem cells of rats but not of mice express Thy-1.1 alloantigen *Nature*, 269, 691-693 (1977)

- 119 Santana, V., Wedderburn, N. and Turk, I.L.
Demonstration of immunoglobulin on the surface of thymus lymphocytes
Immunol. 27, 65-73 (1974)
- 120 Santana, V., Wedderburn, N., Abney, E.R. and Parkhouse, R.M.
Identification of a high molecular weight protein on the surface of
murine thymus and thymus-dependent cells
Eur.J.Immunol. 6, 217-222 (1976)
- 121 Gorczynski, R.M. and MacRae, S.
Differentiation of functionally active mouse T lymphocytes from
functionally inactive bone marrow precursors: I. Kinetics of recovery
of T-cell function in lethally irradiated, bone marrow reconstituted,
thymectomized and non-thymectomized mice
Immunol. 33, 697-712 (1977)
- 122 Cantor, H. and Weissman, I.
Development and function of subpopulations of thymus and
T-lymphocytes
Prog.Allergy 20, 1-64 (1976)
- 123 Kadish, J.L. and Basch, R.S.
Hematopoietic thymocyte precursors: I. Assay and kinetics of the
appearance of progeny
J.exp.Med. 143, 1082-1079 (1976)
- 124 Basch, R.S. and Kadish, J.L.
Hematopoietic thymocyte precursors: II. Properties of the precursors
J.exp.Med. 145, 405-419 (1977)
- 125 Brahim, F. and Osmond, D.G.
Migration of bone marrow lymphocytes demonstrated by selective
bone marrow labeling with thymidine-³H
Anat.Rec. 168, 139-160
- 126 Loor, F. and Roelants, G.E.
High frequency of T lineage lymphocytes in nude mouse spleen
Nature 251, 229-230 (1974)
- 127 Roelants, G.E., Loor, F., von Boehmer, H., Sprent, J., Hägg, L.-B.,
Mayor, K.S. and Rydén, A.
Five types of lymphocytes ($Ig^- \theta^-$, $Ig^- \theta^{+weak}$, $Ig^- \theta^{+strong}$, $Ig^+ \theta^-$
and $Ig^+ \theta^+$) characterized by double immunofluorescence and
electrophoretic mobility: Organ distribution in normal and nude mice
Eur.J.Immunol. 5, 127-131 (1975)
- 128 Roelants, G.E., Mayor, K.S., Hägg, L.-B. and Loor, F.
Immature T lineage lymphocytes in athymic mice: Presence of TL,
lifespan and homeostatic regulation
Eur.J.Immunol. 6, 75-81 (1976)
- 129 Röpke, C.
Theta-bearing cells in the bone marrow of thymus-deprived mice
Scand.J.Immunol. 6, 227-234 (1977)

- 130 Cohen, J.J. and Patterson, C.K.
Induction of Θ -positive lymphocytes and lymphoblasts in mouse bone marrow by mitogens
J. Immunol. 114, 374-376 (1975)
- 131 Press, O.W., Rosse, C. and Clagett, J.
Phytohemagglutinin-induced differentiation and blastogenesis of precursor T cells from mouse bone marrow
J. exp. Med. 146, 735-746 (1977)
- 132 Bach, J.-F. and Carnaud, C.
Thymic factors
Prog. Allergy 21, 342-408 (1976)
- 133 Loor, F. and Roelants, G.E.
Immunofluorescence studies of a possible prethymic T-cell differentiation in congenitally athymic (nude) mice
Ann. N.Y. Acad. Sci. 254, 226-241 (1975)
- 134 Holub, M., Rossman, P., Tlaskalova, H. and Vidmarova, H.
Thymic rudiment of the athymic nude mouse
Nature 256, 491-493 (1975)
- 135 Bollum, F.J.
Terminal deoxynucleotidyl transferase: Biological studies
Advances in Enzymology 47, 347-374 (1978)
- 136 Silverstone, A.E., Rosenberg, N. and Baltimore, D.
Correlating terminal deoxynucleotidyl transferase and cell-surface markers in the pathway of lymphocyte ontogeny
in "Differentiation of normal and neoplastic haemopoietic cells"
(Clarkson, B., Marks, P.A., Till, J.E., eds.), Cold Spring Harbor
Conferences on Cell Proliferation Vol.5 p. 433-453 (1978)
- 137 Gregoire, K., Goldschneider, I., Barton, R.W. and Bollum, F.J.
Intracellular distribution of terminal deoxynucleotidyl transferase in rat bone marrow and thymus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3993-3996 (1977)
- 138 Kung, P.C., Silverstone, A.E., McChaffrey, R.A. and Baltimore, D.
Murine terminal deoxynucleotidyl transferase: Cellular distribution and response to cortisone
J. exp. Med. 141, 855-865 (1975)
- 139 Perlman, P. and Holm, G.
Cytotoxic effects of lymphoid cells in vitro
Adv. Immunol. 11, 117-193 (1969)
- 140 Herbermann, R.B. and Holden, H.T.
Natural cell-mediated immunity
Adv. Cancer Res. 27, 305-377 (1978)

- 141 Shellam,G.R.
Gross-virus-induced lymphoma in the rat: V. Natural cytotoxic cells
are non T-cells
Int.J.Cancer 19, 225-235 (1977)
- 142 Osmond,D.G. and Everett,N.B.
Nucleophagocytosis in bone marrow
Nature 196, 488-489 (1962)

LEBENS LAUF

- Angaben zur Person: Name Ernil Ernst Nikolaus Hansen
geboren am 17.08.1948 in München
Eltern Ernst Hansen, Oberlehrer a. D.
Margarethe Hansen, geb. Bunk
verheiratet seit 14.04.1977 , 1 Kind
- Schulbildung: 1954-1958 Besuch der Volksschule an der Gebelestraße,
München
1958-1968 Besuch des math.-nat.wiss. Luitpold-
Gymnasium, München
1968 Abitur
seit 1968 Studium der Biologie und Chemie an der
Ludwig-Maximilian-Universität, München
1970 Diplom-Vorprüfung in Biologie
1971-1972 1 Jahr Auslandsstudium an der Kansas State
University, USA mit einer Arbeit im Labor
von Prof. L.S.Rodkey über "Evolutionary
Studies of Rabbit Allotypes"
seit 1972 Fortführung des Studiums an der L.-M.-U.,
München
1973-1975 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für
Biochemie, Martinsried in der Arbeitsgruppe
von Priv.-Doz.Dr. K.Zeiller Abtl. Prof.Dr.
K.Hannig über die Trennung von Knochenmarks-
lymphozyten, insbesondere mit einer appara-
tiven Modifikation der 1-g Sedimentation
1976 Diplom-Hauptprüfung in Biologie
Staatsexamen für das höhere Lehramt in
Biologie und Chemie
1976-1979 Durchführung der vorliegenden Dissertation
am MPI für Biochemie, Martinsried in der
Arbeitsgruppe von Priv.-Doz.Dr. K.Zeiller,
Abtl. Prof.Dr. K.Hannig
seit 1976 Studium der Humanmedizin an der L.-M.-U.,
München mit Physikum 1977 und 1. Staats-
examen 1978

