



Doctoral Thesis

## Clonal deletion of potentially autoreactive T-cells in mice

**Author(s):**

Schneider, Reto

**Publication Date:**

1991

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000592338> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No 9446

# CLONAL DELETION OF POTENTIALLY AUTOREACTIVE T-CELLS IN MICE

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH; ETHZ

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
Reto Schneider  
Dipl. Natw. ETH  
born May 10 - 1962  
citizen of Zürich and Tschlin

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H.M. Eppenberger, examiner  
Prof. Dr. H. Hengartner, coexaminer



1991

Separatdruck aus:

- Nature 336: 388 - 390, 1988
- J. Exp. Med. 169: 2149 - 2158, 1989
- Thymus 13: 35 - 43, 1989

## 1. SUMMARY

It is known that the thymus plays an important role in shaping the T-cell repertoire by positively and negatively selecting cells. However the mechanisms underlying self-tolerance are still debated. Our model system in which a particular T-cell receptor (TcR)  $\beta$  chain variable domain (V $\beta$ 6) correlates with reactivity to a minor antigen encoded within the Mls<sup>a</sup> locus provided useful help to investigate further the elimination of potentially autoreactive T-cells on a cellular level in vivo.

The goal of the presented work was:

- 1. To analyze the ontogeny of disappearance of self reactive T-cells.**
- 2. To answer the question whether the maturation state of the thymus itself or antigen (tolerogen) expression determines the time point of tolerance induction.**

Immunostaining of thymus cryosections and cytofluorometric analysis revealed that V $\beta$ 6 expressing cortical T-cells are present at high numbers in both Mls<sup>a</sup> and Mls<sup>b</sup> mice but do not enter the medullary region of Mls<sup>a</sup> animals. This direct demonstration that potentially self reactive V $\beta$ 6<sup>+</sup> T-cells are absent in the thymus medulla but present at normal levels in the cortex of Mls<sup>b</sup> mice is consistent with the possibility that elimination occurs at the cortico-medullary junction.

Further investigations of the postnatal ontogeny of disappearance of potentially autoreactive T-cells indicated that although absent among mature (CD4<sup>+</sup>, or CD8<sup>+</sup>) T-cells in adult Mls<sup>a</sup> mice, mature (TcR high expressing), V $\beta$ 6<sup>+</sup> T-cells are readily detectable during the early neonatal period in the thymus of Mls<sup>a</sup> mice. V $\beta$ 6<sup>+</sup> T-cells reach a maximum at day four rapidly disappearing thereafter. During their disappearance CD4<sup>+</sup>/V $\beta$ 6<sup>+</sup> thymocytes express transiently reduced levels of surface TcR which might be a physiological response to tolerogenic signals in vivo. In addition neonatal V $\beta$ 6<sup>+</sup> T-cells could be shown to be autoreactive against Mls<sup>a</sup>. This reactivity declined at about the same time when the stimulatory capacity of Mls<sup>a</sup> was established and could be first shown at day four.

Finally analysis of transgenic mice expressing a TcR with double specificity for LCMV/H-2 D<sup>b</sup> and for Mls-1<sup>a</sup> revealed that in mice congenitally infected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) T-cells bearing the transgenic TcR are deleted at birth, whereas in uninfected TcR transgenic Mls-1<sup>a</sup> animals deletion was

delayed. This finding did prove that the capacity of the thymus to induce tolerance by clonal deletion is already established at birth.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG

Seit langem weiss man, dass dem Thymus eine entscheidende Rolle als Ort der T-Zellreifung zukommt. Während ihrer Maturation im Thymus durchlaufen T-Zellen eine positive und eine negative Selektion, wobei ein T-Zellrepertoire entsteht, das eine Toleranz gegen "Selbst" besitzt. Die zellulären Vorgänge die zu dieser Selbst-Toleranz führen sind jedoch bis heute rätselhaft geblieben. In unserem Modellsystem korreliert die Expression einer definierten Domäne der variablen Region der  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors (V $\beta$ 6) mit der Reaktivität gegen ein Antigen, welches im Mls<sup>a</sup>-Lokus kodiert ist. Dies ermöglichte uns die klonale Deletion von autoreaktiven T-Zellen auf zellulärer Ebene in vivo zu studieren.

Die vorliegende Arbeit versucht hauptsächlich zwei Fragenkomplexe zu beantworten:

1. **Auf welche Weise und in welchem Zeitraum werden die autoreaktiven T Zellen in vivo beseitigt?**
2. **Bestimmt das Reifestadium des Thymus, oder die Expression des Antigens (Tolerogens) den Zeitpunkt der Toleranzinduktion?**

Immunhistochemie an Gefrierschnitten vom Thymus zusammen mit Durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben, dass corticale V $\beta$ 6 exprimierende T-Zellen sowohl in Mls<sup>a</sup>, wie in Mls<sup>b</sup> Mäusen, in grosser Zahl vorkommen. Dieselben Zellen fehlten hingegen in der Medulla von Mls<sup>a</sup> Mäusen beinahe vollständig. Die Abwesenheit von potentiell autoreaktiven Zellen in der Medulla und deren normale Präsenz im Cortex lässt darauf schliessen, dass ihre Elimination im Bereich der cortico-medullären Übergangszone stattfindet.

Weitere Untersuchungen über den postnatalen Verlauf der Toleranzinduktion zeigten, dass während des frühen nachgeburtlichen Lebens, reife (CD4<sup>+</sup>, oder CD8<sup>+</sup>), TcR hoch exprimierende, V $\beta$ 6<sup>+</sup>, potentiell autoreaktive T-Zellen leicht nachgewiesen werden können, obwohl in adulten Mls<sup>a</sup> Mäusen Zellen dieses Phänotypes vollständig fehlen. In neonatalen Mls<sup>a</sup> Mäusen erreicht die Zahl der medullären V $\beta$ 6<sup>+</sup> T-Zellen ein Maximum am Tag vier. Während die CD4<sup>+</sup>, V $\beta$ 6<sup>+</sup>

Zellen unmittelbar darauf verschwinden, exprimieren sie transient erniedrigte Mengen an T-Zellrezeptoren, wobei es sich unter Umständen um eine physiologische Antwort auf ein Toleranz-induzierendes Signal in vivo handeln könnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neonatale V $\beta$ 6<sup>+</sup> T-Zellen gegen Mls<sup>a</sup> reagieren. Diese Autoreaktivität beginnt jedoch am Tag vier nach der Geburt abzunehmen, während gleichzeitig erstmals die stimulatorische Eigenschaft von Mls<sup>a</sup> nachgewiesen werden kann.

Die Analyse von transgenen Mäusen, welche einen TcR mit einer doppelten Spezifität, sowohl für LCMV/H-2D<sup>b</sup>, als auch gleichzeitig für Mls<sup>a</sup> besitzen ergab, dass in Mäusen, die congenital mit lymphocytärem choriomeningitis Virus infiziert worden sind, die T-Zellen, welche den transgenen TcR exprimieren bereits bei Geburt deletiert sind. Im Gegensatz dazu findet man in nicht infizierten transgenen Mls<sup>a</sup> Mäusen eine verspätete Deletion. Daraus ergab sich, dass der Thymus bereits zum Zeitpunkt der Geburt fähig ist durch klonale Deletion von autoreaktiven T-Zellen Toleranz zu etablieren.

### **3. GENERAL INTRODUCTION**

Responses of the immune system to antigens (substances which induce a immune reaction) are either tolerance or immunity. Under normal conditions self antigens induce tolerance, whereas non-self antigens develop immunity and are thereby eliminated. To avoid fatal immunity responses to self antigens or a nonresponsiveness to foreign antigen the immune system has to discriminate between self and non-self permanently, but thereby the complicated immunoregulatory mechanisms underlying antibody formation, T-cell response, immunological tolerance and auto immunity are still poorly understood.

#### **3.1. HISTORICAL ASPECTS OF IMMUNOLOGICAL RESEARCH**

During the medieval people believed in magical or religious origin of disease. Disease (e.g. pestilence) resembled punishment by spirits, demons or gods for vice and sin, whereas natural immunity was the result of living cleanly and piously. Some names of common disease still represent the ancient comprehension of pathogenic mechanisms for disease: "Malaria" was due to bad air, "Influenza" was