

Ontogeny of thymocytes and anti-viral cytotoxic-cell responses studied in T-cell receptor transgenic mice

Doctoral Thesis

Author(s):

Brändle, Daniel

Publication date:

1993

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000934312>

Rights / license:

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

Diss. ETH No 10334

**ONTOGENY OF THYMOCYTES AND ANTI-VIRAL CYTOTOXIC T-CELL
RESPONSES STUDIED IN T-CELL RECEPTOR TRANSGENIC MICE**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Daniel Brändle
Dipl. Natw. ETH
born March 10, 1964
citizen of Mosnang (SG)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Hengartner, examiner
PD Dr. H. Pircher, coexaminer
PD Dr. C. Müller, coexaminer

1993

Reprints from: -Eur. J. Immunol. (1991), 21: 2195-2202
-Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), 89: 9529-9533
-Eur. J. Immunol. (1994), 24: 145-151

1. SUMMARY

T lymphocytes recognize antigenic peptides bound to self-MHC molecules by virtue of their $\alpha\beta$ T-cell receptor (TCR). In order to define the regions on the TCR α and β chains that directly contact a viral peptide in a lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-specific cytotoxic T cell response, mice expressing either a transgenic TCR α or a TCR β chain were immunized with LCMV. Virus-reactive T cell populations were analyzed for their epitope fine specificity and their endogenous TCR gene usage patterns. The TCR transgenes were derived from the LCMV-glycoprotein (GP) aa 32-42-specific, H-2D^b restricted T cell clone P14. The results reveal that the presence of the transgenic TCR α or β chain directed the immune response towards the original P14 T cell epitope. Furthermore, the endogenous TCR chains expressed by the GP aa 32-42-specific TCR α and β chain "semi-transgenic" T-cell population used the same V β and V α variable gene segments, respectively, as the P14 clone and exhibited a highly conserved VJ α junctional region whereas the endogenous V gene usage in uninfected single-chain transgenic animals was heterogeneous (Chapter I).

To define the molecular mechanism that prevents a particular T cell to express more than one type of TCR on the cell surface (allelic exclusion), transgenic mice bearing both functionally rearranged P14 TCR α and β chain genes were examined in different haplotypes. TCR transgenic mice carrying MHC class I molecules (H-2^b) that positively selected the transgenic TCR expressed both P14 α and β chains on most (>80%) of their T cells and revealed a strong inhibition of endogenous TCR α -chain gene rearrangements. In contrast, transgenic mice bearing non-selective MHC class I molecules (H-2^d) exhibited a high frequency of endogenous TCR α -chain gene rearrangements and preferentially expressed the transgenic TCR β chain together with endogenous α chains. These results coincide with the down-regulation of the recombination activating gene (RAG)-1 expression in cortical thymocytes from TCR transgenic mice in a positively selecting haplotype when compared to the high RAG-1 expression in cortical thymocytes from non-selecting animals. Thus, allelic exclusion of TCR α chains depends on the successful interaction of the $\alpha\beta$ TCR with self-MHC molecules during positive selection (Chapter II).

To address the question whether down-regulation of RAG-1 activity requires sustained engagement of the TCR by selecting MHC molecules, the TCR-MHC interaction of thymocytes with thymic stromal cells was blocked with antibodies *in vivo* or by mechanically disrupting the thymic microenvironment *in vitro*. Immature thymocytes treated by these means showed a rapid up-regulation of RAG-1 expression supporting the view that TCR-MHC interactions over a prolonged period of time are required to shut off RAG-1 expression. Finally, expression of the positive selection marker CD69 was found to inversely correlate with RAG-1 activity (Chapter III).

2. ZUSAMMENFASSUNG

T-Lymphozyten (T-Zellen) erkennen antigene Peptide in Verbindung mit MHC-Molekülen mittels ihres $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptors (TCR). Um Regionen auf der α - und β -Kette des TCRs zu identifizieren, die während einer Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV)-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Immunantwort direkt mit viralen antigenen Peptiden in Kontakt kommen, wurden LCMV-spezifische T-Zellpopulationen auf ihre Epitop-Erkennung und ihre Rezeptor-Sequenzen untersucht. Die dabei verwendeten T-Zellen wurden von transgenen Mäusen isoliert, die entweder die Rezeptor α - oder die β -Kette einer LCMV-spezifischen T-Zelle (P14) exprimierten. Die Resultate zeigen, dass die Anwesenheit der transgenen α - oder β -Kette die Immunantwort in Richtung des originalen P14 T-Zellepitops verschob. Des Weiteren verwendeten die LCMV-spezifischen "halb-transgenen" T-Zellen Rezeptor-Sequenzen wie sie schon bei der ursprünglichen P14 T-Zelle gefunden wurden. Diese Untersuchung zeigt, dass sowohl die α - als auch die β -Kette zur Spezifität des Rezeptors beitragen (Kapitel I).

Um den molekularen Mechanismus zu identifizieren, der verhindert, dass eine bestimmte T-Zelle mehr als einen funktionalen Rezeptortyp auf der Zelloberfläche ausdrückt (allelische Exklusion), wurden transgene Mäuse, die beide rearrangierten P14 Rezeptor α - und β -Kettengene tragen, in verschiedenen MHC-Haplotypen untersucht. Rezeptor-transgene Mäuse, die MHC Klasse I-Moleküle (H-2^b) tragen, welche den transgenen Rezeptor positiv selektionieren können, exprimierten sowohl die P14 α - als auch die β -Kette auf den meisten T-Zellen (>80%) und zeigten eine starke Unterdrückung der endogenen α -Kettengenrearrangierungen. Dagegen exprimierten transgene Mäuse in einem nicht-selektionierenden Haplotyp (H-2^d) die transgene Rezeptor β -Kette zusammen mit endogenen α -Ketten und rearrangierten endogene α -Ketten mit einer hohen Frequenz. Diese Resultate stehen in Einklang mit der Erniedrigung der Rekombinase-Aktivität (RAG-1 Expression) in kortikalen Thymozyten von transgenen Mäusen in einem positiv selektionierenden Haplotyp im Vergleich zur hohen RAG-1 Expression in kortikalen Thymozyten von nicht-selektionierenden Tieren. Daraus lässt sich schliessen, dass die allelische Exklusion der Rezeptor α -Ketten von der erfolgreichen Wechselwirkung des $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptors mit selbst-MHC-Molekülen abhängt (Kapitel II).

Um die Frage zu beantworten, ob die Erniedrigung der RAG-1 Aktivität eine kontinuierliche Bindung des T-Zell-Rezeptors mit selektionierenden MHC-Molekülen braucht, wurde die Rezeptor-MHC-Wechselwirkung von Thymozyten mit thymischen Stroma-Zellen mittels Antikörpern *in vivo* oder durch mechanische Zerstörung des Thymus-Gewebes *in vitro* blockiert. So behandelte unreife Thymozyten zeigten einen raschen Anstieg der RAG-1 Expression, was darauf hinweist, dass Rezeptor-MHC-Interaktionen über eine längere Zeitspanne nötig sind, um die RAG-1 Expression abzuschalten. Des Weiteren konnte die inverse Korrelation von CD69, einem Marker für positive Selektion, und der RAG-1 Expression demonstriert werden (Kapitel III).