

AKTIVASI SPONTAN SEL T LIMFOSIT MENCIT YANG MENGALAMI DEFISIENSI IL2R β

SPONTANEOUS ACTIVATION OF T CELL LYMPHOCYTES IN MICE LACKING INTERLEUKIN-2 RECEPTOR β

Agustina Tri Endharti
Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

Homologous recombination applied to alter specific endogenous gene, referred as gene targeting, provides the highest level of control over product mutation in cloned genes. In this experiment we showed that by using gene targeting a knock out mutation in IL-2R β gene could be generated. The findings of this study indicated that mice lacking the Interleukin-2 receptor β chain (IL2R $\beta^{-/-}$) had spontaneously activated T cells. In this study, we investigated abnormal expansion of activated T cells which showed high level of CD69. These findings suggest that the IL2R $\beta^{-/-}$ mice may serve as animal model for autoimmune diseases and that the accumulation of activated T cell in the future could be used in clinical setting to cure the diseases.

Keywords: T cells, (IL2R $\beta^{-/-}$), autoimmune

PENDAHULUAN

Dalam sistem imun Interleukin-2 (IL-2) mempunyai beberapa peranan, antara lain IL-2 diidentifikasi sebagai sitokin yang bertanggung jawab sebagai stimulus sel-sel limfosit untuk melakukan proliferasi (1), mengatur adanya sinyal-sinyal selama respon imun (2, 3) dan meningkatkan diferensiasi sel T dan B (4).

Sejauh ini, amplifikasi sel T setelah aktivasi sangat tergantung pada IL-2. Reseptor IL-2 tidak ditemukan pada sel resting, tetapi disintesa setelah beberapa jam setelah aktivasi (5). Reseptor IL-2 (IL-2R) merupakan paradigma bagi beberapa reseptor sitokin lain (6, 7). Reseptor ini terdiri atas rantai α (bereaksi dengan monoklonal CD25) yang mempunyai afinitas rendah, rantai β dengan afinitas sedang (bereaksi dengan monoklonal CD122) dan rantai γ dengan afinitas tinggi (bereaksi dengan monoklonal CD123) (8, 9). Di dalam limfosit T, IL-2R dengan rantai β dan γ akan terekspresi, sedangkan IL-2R dengan rantai α saja yang dapat meningkatkan aktivasi limfosit untuk (10). Interleukin-2 Reseptor Beta (IL-2R β) diketahui berikatan dengan IL-15 (11) yang dihasilkan oleh berbagai jenis sel dan jaringan yang umumnya mempunyai fungsi secara biologis dengan IL-2, antara lain: berbagai tipe sel hematopoetik: sel T, sel B, sel NK, sel monosit, sel epidermal dendritik, sel timosit dan granulosit (12, 13).

Berdasarkan fungsi tersebut di atas, maka IL-2R β mempunyai fungsi yang kompleks, tidak hanya sekedar sebagai reseptor yang diekspresikan oleh berbagai jenis sel

saja, tapi juga memiliki fungsi –fungsi lainnya yang belum banyak diidentifikasi.

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa regulasi dalam respon imun tergantung pada interaksi dalam sel T. Interaksi ini adalah sangat kompleks termasuk adanya mekanisme antigen spesifik dan non spesifik. Pasien yang menderita gangguan dalam perkembangan sel T sangat mudah terkena infeksi. Hal ini menunjukkan peranan sel T dalam respon imun pada semua antigen. Contoh lainnya adalah pasien yang tidak mempunyai produksi IL-2 dalam reseptornya. Pasien ini menderita imunodefisiensi yang parah (14).

Dalam penelitian ini menggunakan mencit sebagai model autoimun dengan cara membuat gene IL-2R β mengalami mutasi (*gene knock out*) dengan tehnik *gene targeting* (15, 16). Dalam penelitian ini ingin diketahui apakah sel T yang teraktivasi mengalami akumulasi yang dihasilkan oleh mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β .

METODE

Hewan coba

Penelitian ini menggunakan mencit betina C57BL/6 umur 6-8 minggu sebanyak 30 ekor yang diperoleh dan dipelihara di *Laboratory of Animal Center* di Nagoya University. Hewan coba dipelihara dalam ruangan yang steril, bersih, kondisi lingkungan yang sesuai dengan kebutuhan mencit untuk hidup (suhu, kelembaban ventilasi dan penerangan yang cukup) serta dilakukan pengecekan dan pengontrolan terhadap kondisi hewan coba oleh staf dari *Laboratory of Animal Center* di Nagoya University secara rutin. Penggantian sekam dilakukan 2 hari sekali. Masing-masing kandang berisi 4 ekor mencit.

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIII, No. 1, April 2007
Korespondensi: Agustina TE; Lab. Parasitologi FK Unibraw
Malang; Jl. Veteran-Malang 651452; 0341-580993 ext. 124

Prosedur Penelitian

Gene Targeting dilakukan berdasarkan metode Joiner (2000) (16). Memanipulasi gen dengan tehnik *gene targeting* dengan cara menghilangkan gene yang memproduksi IL-2R β dan menggantinya dengan *neomycin (neo) resistance cassette gen* (15,16). Mutasi pada *germline* dari mencit dengan menggunakan rekombinasi dan *Embryonic Stem Cells* (ESC). Teknologi *embryonic Stem Cell* (ESC) merupakan teknologi pembiakan sel-sel embrio berupa sel-sel inner mass mulai dari tahap perkembangan blastosis sampai ke tahap berikutnya. Teknologi ini bukan untuk memperoleh embrio ataupun fetus utuh melainkan untuk mengkultur sel-sel *inner mass*, setelah diisolasi dan dibiakkan secara *in vitro*. Rekombinasi homologus dilakukan dengan memasukkan *endogenous gene* yang dikehendaki melalui tehnik *gene targeting*, sehingga mutasi dapat dihasilkan. Selanjutnya gene yang sudah dimodifikasi dimasukkan ke dalam sel mamalia melalui metode transfeksi. Sel yang sudah ditransfeksi diseleksi menggunakan *neomycin resistance* yang ditanamkan pada mencit. Hingga diperoleh keturunan mencit chimera yang sudah membawa gen IL-2R β . Selanjutnya mencit tersebut dikawinkan dengan mencit (C57BL/6) atau B6 sehingga diperoleh mencit dengan genotip IL-2R $\beta^{+/+}$, IL-2R $\beta^{+/-}$ atau IL-2R $\beta^{-/-}$.

Isolasi DNA untuk Typing berdasarkan metode Minami (1999) (14)

Untuk menentukan genotip IL-2R $\beta^{+/+}$, IL-2R $\beta^{+/-}$ atau IL-2R $\beta^{-/-}$ dari mencit, maka dilakukan isolasi DNA dari bagian ekor masing-masing mencit yang dipotong kurang lebih 1-2 cm. Dengan menambahkan DNA lysis buffer, potongan ekor tersebut diinkubasi pada 37°C, selama \pm 12-16 jam, di dalam shaker. Selanjutnya dilakukan purifikasi DNA dengan menambahkan phenol-chloroform, dilanjutkan dengan alkohol bertahap dari 96%- 70% Semua proses dilakukan melalui sentrifugasi 10.000 rpm, 5 menit, 4°C.

Poly Chain Reaction (PCR) DNA Typing berdasarkan metode Minami (1999) (14)

DNA (10 μ g) diamplifikasi dengan *Taq polimerase* dalam 50 μ l (Takara Biomedicals, Kyoto, Japan). Masing-masing 1 μ l dari sampel tersebut dilarutkan dalam reaksi PCR dengan kondisi: 94°C, 30 s; 60°C, 60 s; 72°C, 90 s; 30 cycles. PCR primer yang digunakan adalah sbb: F1 5': ATT CCT AGC TCA TGC AGC TTG GCA A; F1 3': CAA CAT CTG TGG ACT AGC TTC AAT GGT G; PC 5': GGA CAG CTG CCT ACG AAG AGA CCG C; PC 3': CTG AAG ACT TTG AGC AAC CCT GAG G; Neo 5': CAA GGT ACT TTA TGG GGC TTA GTC A; Neo 3': GGG TTA CCT AGC TAC GGC TTG GCT C.

Reverse Transcriptase Poly Chain Reaction (RT PCR) berdasarkan metode Schimpl (2000) (17).

RNA (10 μ g) diisolasi dari sel T limfosit menggunakan *reverse transkriptase* dalam 50 μ l volume menggunakan Strata Script RT PCR kit (Stratagene). Masing-masing 1 μ l

dari sampel tersebut dilarutkan dalam reaksi PCR dengan kondisi: 94°C, 30 s; 55°C, 60 s; 72°C, 60 s; 35 cycles. PCR primer yang digunakan adalah: 5' β -actin: TGG AAT CTT GTG GTA TCC ATG AAA T; 3' β -actin: TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G; 5' IL-2: TGA TGG ACC TAC AGG AGC TCC TGA G; 3' IL-2: GAG TCA AAT CCA GAA CAT GCC GCA G.

Pembedahan Mencit

Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dimatikan dulu dengan cara dianastesi menggunakan eter. Prosedur secara singkat adalah kapas dibasahi dengan eter, kemudian diletakkan dalam kaleng tertutup. Mencit yang akan dibunuh dimasukkan dalam kaleng yang sudah berisi kapas yang mengandung eter. Kaleng ditutup kurang lebih selama 1 menit. Setelah itu mencit siap dibedah.

Isolasi Sel T Limfosit dari Organ Limfa Mencit menurut Asano (1996) (18)

Limfa diisolasi dari mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β (IL-2R $\beta^{-/-}$), hal ini ditandai dengan adanya splenomegali. Limfa dicuci dengan medium RPMI untuk membersihkan eritrosit yang menempel. Limfa diletakkan pada cawan petri steril dengan menambahkan medium RPMI yang mengandung 10% FBS (medium tumbuh), lalu dihancurkan perlahan dengan menggunakan ujung bagian belakang dari spuit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi 1500 rpm, 5 menit, 4°C. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dibuang, kemudian lisis buffer ditambahkan pada pellet, selanjutnya proses sentrifugasi diulangi lagi. Tahap yang terakhir adalah pencucian sel dengan menambahkan medium tumbuh dilanjutkan dengan sentrifuse 1500 rpm, 5 menit, 4°C.

Analysis Menggunakan Flow Cytometry berdasarkan metode Schimpl (2000) (17)

Sel T limfosit 1×10^6 dilabel dengan monoklonal antibodi selama 20 menit pada suhu 4°C, kemudian sel ditambahkan ke dalam larutan PBS yang mengandung 1% FBS sebanyak 500 μ l., selanjutnya dianalisis dengan *flow cytometry* (FACS Calibur, Beckton Dickinson, San Jose, CA) dan menggunakan *CELL QUEST* software (Beckton Dickinson). Monoklonal antibodi yang digunakan adalah anti-mouse CD44 *pycoerythrin* (PE) *conjugated* (clone 145-2C11), anti-mouse CD69 *fluorescein isothiocyanate* (FITC). *Conjugated* (clone H1, 2F3), anti mouse anti CD3 *phycoerythrin* (PE) *conjugated*, (clone 53-2,1), anti mouse anti IL-2 R β *Biotin conjugated* (BD-Pharmingen, San Diego, CA). Total sel limfosit yang dianalisis adalah 10.000 sel pada masing-masing sampel.

HASIL PENELITIAN

Memasukkan neo-gene sebagai pengganti gene yang memproduksi IL-2R β

Mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β , dibuat dengan memanipulasi gen dengan tehnik *gene targeting*

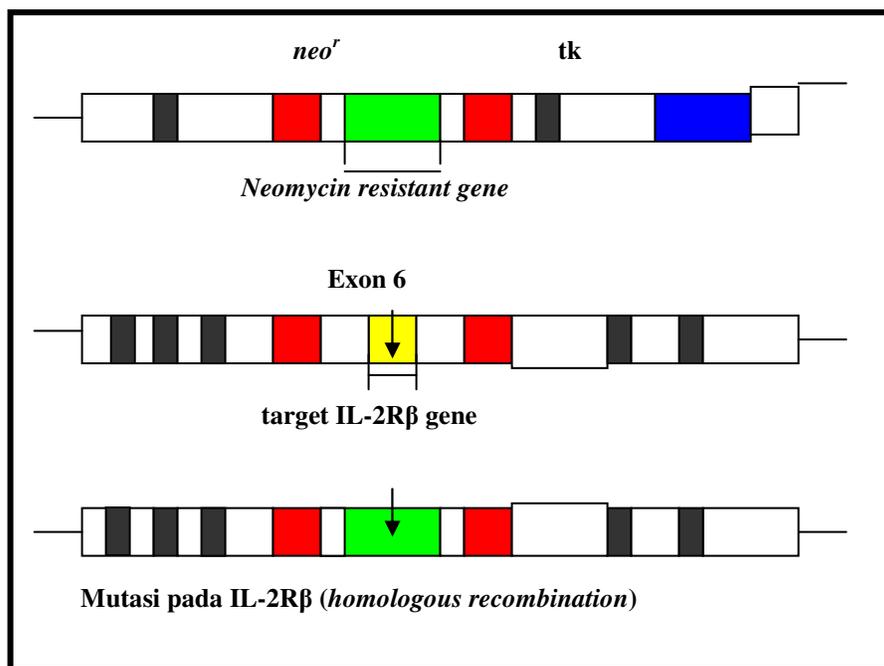
dengan cara menghilangkan gene yang memproduksi IL-2R β dan menggantinya dengan *neomycin (neo) resistance cassette gen* (Gambar 1) pada exon 6.

Abnormalitas pada mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β (IL-2R β ^{-/-}) pada umur 5 minggu menunjukkan ukuran tubuh yang lebih kecil dibandingkan dengan mencit normal, selain itu tubuhnya tidak aktif bergerak dan memiliki bulu yang lebih halus dan jarang (Gambar 2).

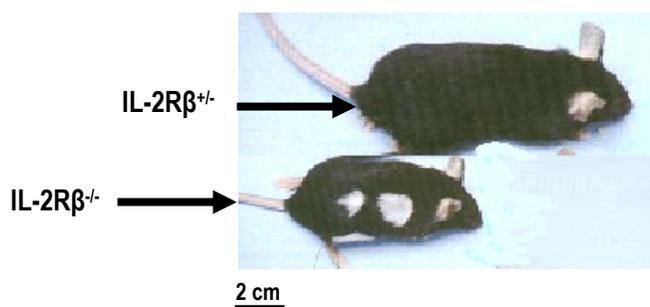
Pada umur 5 minggu organ limfa pada mencit IL-2R β ^{-/-} mengalami splenomegali (Gambar 3), hal ini menunjukkan adanya sel-sel T limfosit yang mengalami proliferasi.

Ekspresi gene typing untuk menentukan genotip (homozigote atau heterozigote pada mencit.

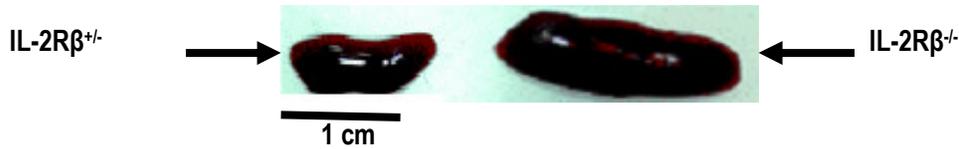
Untuk menentukan genotip dari mencit apakah termasuk dalam homologous recombinant, yang mempunyai genotip homozigote (-/-) yang berarti mengalami defisiensi IL-2R β atau mempunyai genotip heterozigote (+/-) yang berarti normal, maka dari hasil PCR DNA typing (Gambar. 4) menunjukkan bahwa pada mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β tidak terdapat pita yang terdeteksi pada 900 bp Hal ini berbeda dengan mencit normal (mempunyai gen IL-2R β). Sehingga dapat dikatakan bahwa mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β , akan kehilangan gen IL-2R β ., yang ditandai dengan tidak terdapatnya gen yang terekspresi pada 900 bp (Gambar 4).



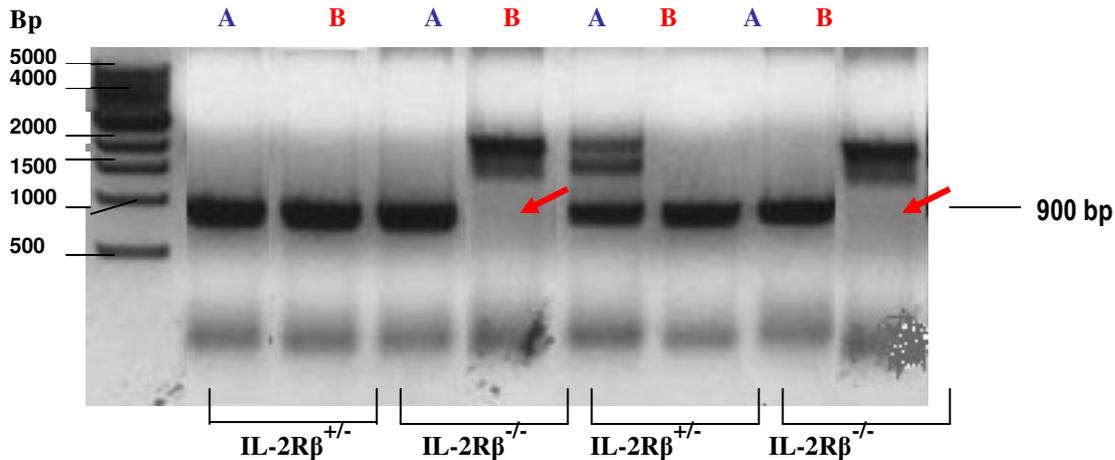
Gambar 1. Bagian Potongan Skema *homologous recombination* dari Daerah Spesifik Rekombinasi pada IL-2R β Gen (atas), Lokus Target IL-2R β gen (tengah), dan Hasil Mutasi pada IL-2R β (bawah).



Gambar 2. Mencit Defisiensi IL-2R β yang Berumur 5 Minggu Menunjukkan Ukuran Tubuh yang Abnormal (10-15 gram) Jika Dibandingkan dengan Mencit Normal (20-35 gram), Selain Itu Juga Tubuhnya Tidak Aktif Bergerak dan Bulunya Lebih Halus dan Jarang.



Gambar 3. Organ Limfa Mencit yang Berumur 5 Minggu Menunjukkan Bahwa pada Mencit IL-2Rβ^{-/-} Mengalami Splenomegali Jika Dibandingkan dengan Mencit Normal.



Gambar 4. Hasil Analisis PCR DNA Typing yang Diisolasi dari Ekor Mencit IL-2Rβ^{+/+}, IL-2Rβ^{+/-} dan IL-2Rβ^{-/-} dengan Menggunakan Primer F1, PC dan Neo.

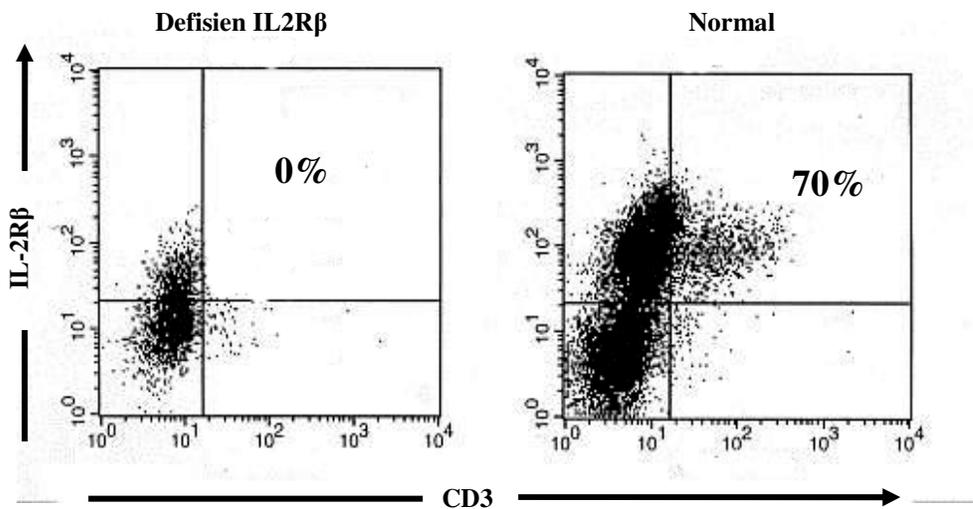
Keterangan:

A : (F1 dan PC) Primer

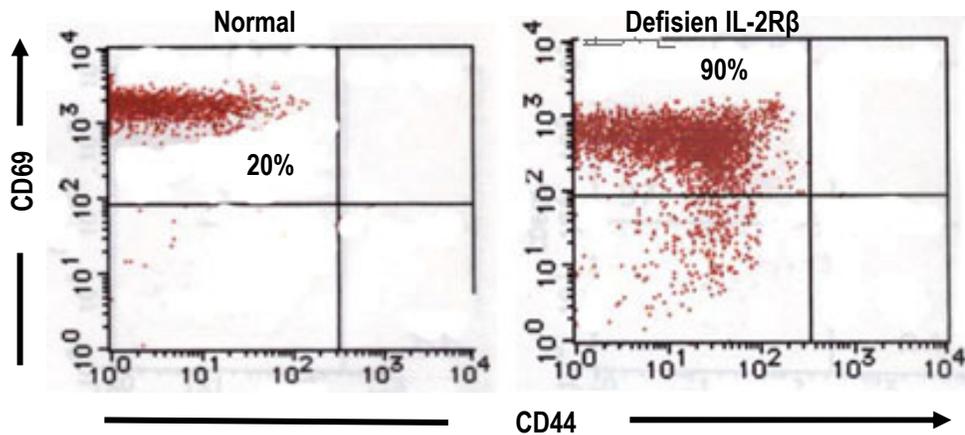
F1 5': ATT CCT AGC TCA TGC AGC TTG GCA A;
 F1 3': CAA CAT CTG TGG ACT AGC TTC AAT GGT G
 PC 5': GGA CAG CTG CCT ACG AAG AGA CCG C;
 PC 3': CTG AAG ACT TTG AGC AAC CCT GAG G;

B : (PC dan Neo) Primer

PC 5': GGA CAG CTG CCT ACG AAG AGA CCG C;
 PC 3': CTG AAG ACT TTG AGC AAC CCT GAG G;
 Neo 5': CAA GGT ACT TTA TGG GGC TTA GTC A;
 Neo 3': GGG TTA CCT AGC TAC GGC TTG GCT C.



Gambar 5. Ekspresi Sel T limfosit yang Disolasi dari Jaringan Limfa Mencit Normal atau yang Mengalami Defisiensi IL-2Rβ Dilabel dengan Menggunakan *Monoclonal Antibody* terhadap IL-2Rβ (Conjugated terhadap *Phycoerythrin* (PE) dan terhadap CD3 Conjugated terhadap *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC).



Gambar 6. Karakteristik dari Ekspresi CD69⁺ sel-sel T yang Disolasi dari Jaringan Limfa Mencit yang Mengalami Defisiensi IL-2R β yang Dilabel Menggunakan Monoclonal Antibody terhadap CD69 (Conjugated terhadap phycoerythrin (PE) dan CD44 (Conjugated terhadap Fluorescein Isothiocyanate (FITC). Jumlah Sel T yang Mengalami Aktifasi Dinyatakan Dalam Persen.

Ekspresi Sel T Limfosit yang Diisolasi dari Jaringan Limfa Mencit yang Mengalami Defisiensi pada IL-2R β .

Sel T limfosit yang diisolasi dari jaringan limfa mencit mengalami defisiensi IL-2R β dibandingkan dengan mencit normal yang dilabel menggunakan *monoclonal anti-bodi anti mouse anti CD3 conjugated* terhadap *phycoerythrin (PE)*, *anti mouse anti IL-2 R β conjugated* terhadap *Biotin*. Hasil karakteristik sel T limfosit (Gambar 5) menunjukkan mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β , sel-sel limfositnya tidak menunjukkan ekspresi pada IL-2R β (0%), sedangkan kontrol mencit (normal mencit) sel-sel limfositnya dapat mengekspresikan IL-2R β (70%).

Mencit yang Mengalami Defisiensi IL-2R β Mengandung Sel-Sel T yang Teraktifasi dan mengalami akumulasi.

Dari hasil analisis menggunakan *flow cytometry* (Gambar 6) membuktikan bahwa sel-sel T yang terdapat dalam mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β hampir semua selnya mengalami aktivasi (90%) yang ditunjukkan dengan jumlah sel T yang dilabel dengan monoklonal anti CD69 (marker dari sel T yang teraktifasi), sedangkan pada kontrol hanya 20%.

DISKUSI

Mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β (IL-2R β ^{-/-}) menunjukkan tidak terdapatnya ekspresi gen IL-2R β (Gambar 1). Hal ini membuktikan bahwa melalui tehnik penghilangan target gen (*gene targeting*) dapat dihasilkan *knockout mice* (mencit yang kekurangan salah satu gene yang spesifik). Mencit yang tidak dapat mengekspresikan gen IL-2R β merupakan salah satu model autoimun pada hewan. Hal ini didukung oleh Van Pajis (1997) bahwa

terjadinya mutasi atau adanya kehilangan fungsi pada gen IL-2, IL2 α atau IL-2R β biasanya berhubungan dengan perkembangan autoimunitas (17).

Hasil penelitian ini menunjukkan bagaimana autoimunitas dapat ditimbulkan akibat mutasi genetik. Pada penderita yang menunjukkan sel T-nya tidak memproduksi IL-2R β pada reseptor-nya, menunjukkan imunodefisiensi (18, 19). Pada penelitian ini yang menggunakan mencit yang mengalami mutasi (Gambar 4) yang telah dibuat di dalam gen IL-2nya (Gambar 1), sehingga dapat menimbulkan transkripsi pada beberapa gen sitokin dengan adanya gen IL-2. Hal ini dapat menerangkan mengapa aktivasi sel T lebih besar terjadi pada mencit yang gen IL-2R β -nya dihilangkan (defisiensi IL-2R β). Mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β dapat meningkatkan respon imun adaptifnya melalui IL-2 *independent pathway*, dengan keterlibatan IL-15 yang merupakan ligand dari IL-2R β (20, 21).

Mencit yang homozygote (IL-2R β ^{-/-}) mengalami gangguan fungsi pada sel T nya, yang nantinya berdampak pada gangguan myeloid (22, 23). Fenotip yang kompleks dari mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β ditandai dengan berbagai gangguan perkembangan atau keadaan yang abnormal pada sel T yang mengalami aktivasi, termasuk hematopoetik *sel lineage* dan sel T yang mengalami aktivasi secara spontan (Gambar 6). Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan terjadinya autoimunitas secara spontan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa IL-2R β , mempunyai peranan sebagai mediator signal dalam mengaktifasi sel T untuk proses proliferasi. Hal yang serupa dijumpai pada mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β , sel Tnya mengalami aktivasi secara spontan yang ditandai

dengan meningkatnya prosentase CD69 (Gambar. 6). Dari hasil penelitian ini menerangkan bahwa sel-sel yang mengalami aktivasi dapat memberikan kesempatan pada gen-gen untuk berekspresi secara optimal. Ekspresi gen yang tidak terkendali mengakibatkan akumulasi produk gen seperti protein, enzim, kemokin maupun sitokin, yang sebenarnya tidak diperlukan oleh tubuh. Oleh sebab itu, mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β biasanya mati pada usia 5-6 minggu (19).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sel-sel T yang terdapat dalam mencit yang mengalami defisiensi IL-2R β hampir semua selnya

mengalami aktivasi. Immunodefisiensi menggambarkan peranan utama dari respon imun adaptif dan sel T. Penelitian ini sebagai dasar dalam pembuatan hewan model autoimun, untuk itu masih perlu diteliti lebih lanjut pengaruhnya terhadap sel-sel lainnya dan efek yang ditimbulkannya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Izumi Nakashima dan Haruhiko Suzuki, MD.,Ph.D dari Department of Immunology, Nagoya University, Japan atas diskusi dan saran selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Paul WE and Selder RA. *Lymphocyte responses and cytokine*. Cell 1998; 78: 241-244.
2. Theze J, Alzari PM and Bertogilo J. *IL-2 and it's Receptor Recent Advance and New Immunological Functions*. Immunol Today 1996; 17: 481-486.
3. Willerford PM, Chem J, Ferry JA, Davidson L and Alt FW. *IL-2 Receptor A Chain Regulates the Size and Content of the Peripheral Lymphoid Compartment*. Immunity 1995; 3: 521-523.
4. Boise LH and Thomson CB. *Hierarchical Control of Lymphocytes Survival*. Science 1998; 275: 67-68.
5. Bamford RN and Asao H. *Interleukin (IL) 2 Receptor Beta Chain is Shared by IL-2 and Cytokine that Stimulated T Cell Proliferation*. USA: Proc Natl Acad Sci; 1998; 92: 4542-4545.
6. Salustro F, Lenig D, Forster R, Lipp M and Lanzavecchia A. *Two Subsets of Memory T Lymphocyte with Distinct Homing Potential and Effector Functions*. Nature 1999; 401: 708-712.
7. Taniguchi T and Minami Y. *The IL-2/IL-2 Receptor System: a Current Overview*. Cell 1994; 73: 5-8.
8. Theze J, Alzari PM and Bertoglio J. *Interleukin-2 and its Receptor: Recent Advances and New Immunological Function*. Immunol Today 2000; 10: 90-96.
9. Nelson BH and Willerford DM. *Biology of the Interleukin-2 Receptor*. Adv. Immunol 1997; 70: 1-8.
10. Waldman TA, Dubois S and Tagaya Y. *Roles of Interleukin-2 in the Life and Death of Lymphocytes*. Immunity 2001; 14: 105-110.
11. Rafaali Y, Van Parjis L, London CA and Tschopp J. *Biochemical Mechanisms of IL-2 Regulated Fas Mediated T cell Apoptosis*. Immunity 1998; 8: 616-623
12. Grabstein KH, Eisenman K, Shanebeck C, Rauch S, Srinivasan V, Fung C, Beers J, Richardson MA and Schoenborn M. *Cloning of a T Cells Growth Factor that Interacts with the β Chain of the Interleukin-2 Receptor*. Science 1994; 264-265.
13. Ascherman DP, Migone TS, Friedmann MC and Leonard WJ. *Interleukin-2 (IL-2) Mediated Induction of the IL-2 Receptor α Chain Gene*. J. Biol. Chem 1997; 272: 8704-8709.
14. Minami Y, Kono T, Miyazaki T and Taniguchi T. *The IL-2 Receptor Complex: its Structure, Function and Target Genes*. Annu. Rev. Immunol 1999; 11: 254-268.
15. Minami Y, Kono T, Miyazaki T and Taniguchi T. *The IL-2 Receptor Complex: its Structure, Function and Target Genes*. Annu. Rev. Immunol 1996; 11: 245-268.
16. Joiner AL. *Gene Targeting*. Oxford University Press 2000; 133-166.
17. Van Parjis L, Biuckians A, Ibraghimov A, Alt FW and Willerford D. *Functional Responses in IL-2 Receptor Alpha Deficient Lymphocytes Expressing a Transgenic Antigen Receptor*. Immunol 1997; 158: 3738-3745.
18. Castigli E, Pahwa R, Good RA, Geha RS and Chatila TA. *Molecular Basis of Multiple Lymphokine Deficiency in Patient with Severe Combined Immunodeficiency*. USA: Proc. Natl. Acad. Sci 1993; 90: 4728-4732.
19. Disanto JP, Keever CA, Small TN, Nicolas GR, O'Reilly RJ, and Flomenberg N. *Absence of Interleukin-2 Production in a with Severe Combined Immuno-Deficiency Disease Syndrome with T Cells*. J. Exp. Med. 1990; 171:1697-1704.
20. Waldman TA. *The IL-2/IL-2 Receptor System: a Target for Rational Immune Intervention*. Immunol. Today 2000; 14: 264-270.

21. Schimpl A, Hunig A, Elbe I, Berberich S, Kramer H, Merz AC, Feller B, Sadlack H, Schoele and Horak I. *Development and Function of Immune System in Mice with Targeted Disruption of the IL-2 Gene. Transgenic and Targeted Mutagenesis in Immunology*. London: Academic Press. 2000; 191-201.
22. Asano M, Toda M, Sakaguchi N and Sakaguchi S. *Autoimmune Disease as a Consequence of Developmental Abnormality of a T Cell Subpopulation*. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 387-396.
23. Sadlack BR, Kuhn H, Rajewsky, W, Muler J and Horak I. *Development and Proliferation of Lymphocyte In Mice Deficient for IL-2*. *Eur. J. Immunol.* 24: 281-284.