

CLONAGE, SEQUENCAGE ET EXPRESSION DE L'ARNm CD3 γ/δ CHEZ *PLEURODELES WALTL* MICHAH. (AMPHIBIEN URODELE)

CLONING, SEQUENCING AND EXPRESSION OF THE CD3 γ/δ mRNA IN *PLEURODELES WALTL* MICHAH. (URODELE AMPHIBIAN)

Armelle ROPARS

Laboratoire de biologie expérimentale et immunologie, Université Henri
Poincaré- Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

RESUME

Le complexe CD3 est un composant essentiel du récepteur de la cellule T (TCR) impliqué dans sa maturation et dans son activation. Ce TCR a été identifié chez les vertébrés cartilagineux et osseux et les différentes études où les ADNc codant les chaînes du complexe CD3 ont été clonées et séquencées ont montré que ce complexe est constitué de plusieurs chaînes, toutes phosphorylables et capables de transduire des signaux.

Ici, par une approche combinant RACE-PCR et oligonucléotides dégénérés, l'ADNc de l'une des chaînes du complexe CD3, CD3 γ/δ chez *Pleurodeles waltl*, a été cloné et séquencé. Cet ADNc est très homologue aux ADNc CD3 γ/δ de *Xenopus laevis* et du poulet.

Les techniques de PCR semi-quantitative et de Northern-blot ont montré que le thymus présentait la plus forte expression en ARNm CD3 γ/δ suivi par la rate et le sang puis les intestins, ce qui confirme ainsi les spécificités tissulaire et lymphoïde de cet ARNm.

Concernant l'ontogenèse des cellules T, la technique de RT-PCR semi-quantitative sur des stades embryonnaires et larvaires de *Pleurodeles waltl* a permis de montrer que l'expression de CD3 γ/δ démarre très tôt, dès le stade neurula (stade 15, 69 h après la ponte), augmente jusqu'au stade 33 (9 jours après la ponte), et reste stable au moins jusqu'au stade 42 (26-27 jours après la ponte). Comme l'ébauche thymique apparaît aux jours 6-7, la question de la formation et de la maturation de ces premières cellules T hors du thymus se pose.

Mots-clés: *Pleurodeles waltl*, urodèle, lymphocyte T, complexe CD3

ABSTRACT

Note présentée à la séance du 15 mai 2003, acceptée le 6 juin 2003

CD3 complex is an essential component of the T-cell receptor (TCR) implicated in its maturation and activation. This TCR has been identified both in cartilaginous and bony vertebrates and, in different studies where the cDNA of the CD3 chains were cloned and sequenced, it appeared that CD3 complex is composed of several chains, all susceptible to phosphorylation and able to transduce signals.

Here, by an approach combining RACE-PCR and degenerated oligonucleotides, the cDNA of a CD3 chain, CD3 g/d in *Pleurodeles waltl*, has been cloned and sequenced. This cDNA is very homologous to the CD3 g/d cDNAs of *Xenopus laevis* and chicken.

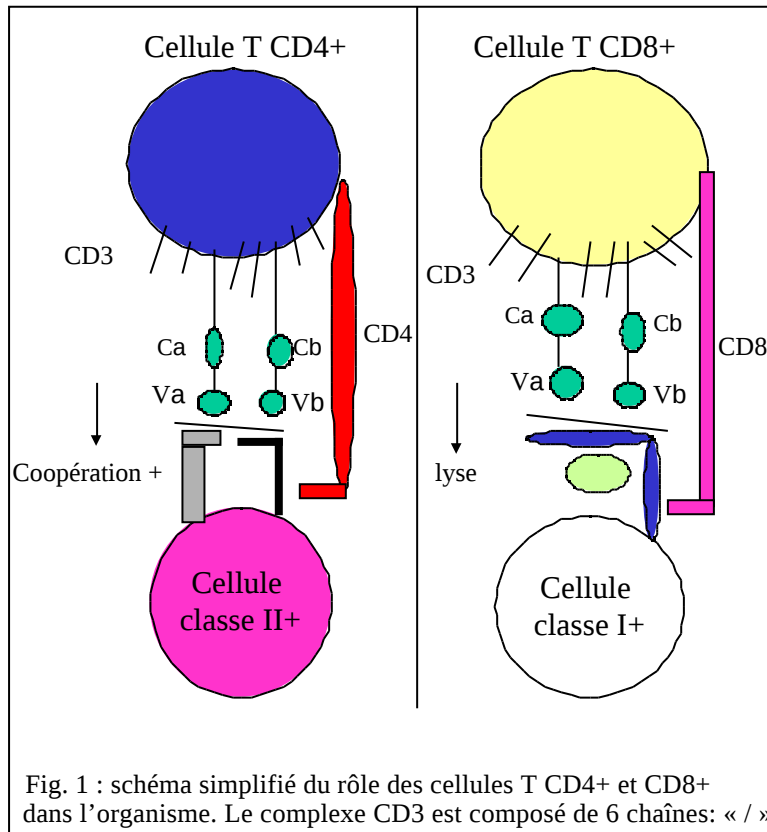
Semi-quantitative RT-PCR and Northern-blotting technics have showed that the highest CD3 g/d mRNA expression was located in the thymus followed by spleen, blood and finally intestine therefore confirming the tissular and lymphoid specificities of this mRNA.

Concerning the T cell-ontogeny, semi-quantitative RT-PCR applied to embryonic and larval stages permitted to show that CD3 g/d mRNA expression begins early at the neurula stage (stage 15, 69 h after laying), increases up to the stage 33 (9 days after laying) and afterwards remains stable at least until the stage 42 (26-27 days after laying). As the thymus primordium appears much later, the question of the formation and the maturation of the first T cells outside this organ is posed.

key-words: *Pleurodeles waltl*, urodele, T lymphocyte, CD3 complex

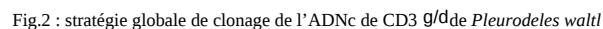
INTRODUCTION

Le développement de la cellule T, la reconnaissance antigénique et les réponses initiées par le lymphocyte T sont contrôlés par un complexe formé de différentes protéines membranaires appelé "récepteur de la cellule T" (TCR). Il comporte 2 parties: la 1ère reconnaît le peptide antigénique et l'autre (le complexe CD3) transduit le signal qui a lieu après la liaison à l'antigène. L'unité de reconnaissance de l'antigène est composée de 2 chaînes provenant de réarrangements géniques (α ou β) et ensemble, avec les molécules CD8 ou CD4 peuvent lier des peptides associés respectivement à des molécules de classe I ou de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), (Fig.1). Chez les mammifères étudiés, le complexe CD3 contient 6 chaînes: γ, δ, (ε)₂, (ζ)₂. Toutes ces chaînes sont susceptibles d'être phosphorylées/déphosphorylées et sont connectées à la voie d'activation des tyrosine kinases (CHAN *et al.* 1994, IWASHIMA *et al.* 1994). La régulation de ces phénomènes est requise pendant toute la vie de la cellule T. Pendant l'ontogenèse de la cellule T, chaque chaîne joue un rôle non redondant à différents stades de la maturation et de la survie des thymocytes (ARNAIZ-VILLENA *et al.* 1992, SOUDAIS *et al.* 1993, MALISSEN *et al.* 1995, HAKS *et al.* 1998, DELGADO *et al.* 2000). Ensuite, si la cellule T reconnaît un peptide, le complexe CD3 joue là encore un rôle crucial dans l'activation de cette cellule.



Chez les mammifères étudiés, les gènes codant les chaînes CD3 γ , δ et ϵ sont très proches sur le chromosome (TUNNACLIFFE *et al.* 1987) et les gènes CD3 γ et δ sont en plus très homologues en termes de séquence (SAITO *et al.* 1987). L'hypothèse d'un gène ancestral commun pour CD3 γ et δ a été proposée et les calculs ont estimé que la duplication avait eu lieu il y a 230 millions d'années pour créer 2 gènes distincts (KRISSENSSEN *et al.* 1987). Le séquençage de ce gène, CD3 γ/δ , chez le poulet (BERNOT et AUFRAY 1991) et chez *Xenopus laevis* Daudin (DZIALO et COOPER 1997) a permis de confirmer cette hypothèse et les calculs puisque mammifères et oiseaux ont divergé il y a 250 millions d'années.

Excepté les modèles *Xenopus laevis* (crapaud appartenant aux Anoures) et *Ambystoma mexicanum* Shaw (axolotl appartenant aux Urodèles), peu d'informations existent sur le système immunitaire des amphibiens, notamment sur les salamandres, alors qu'elles sont utilisées dans un certain nombre de laboratoires.



Clonage, séquence et expression de l'ARNm

La séquence complète en acides aminés déduite et comparée aux séquences CD3 g/d, g, données montre que la structure générale est préservée : elle présente 48% d'homologie avec celle du poulet, 46% avec CD3g murin et 44% avec CD3g humain. La partie transmembranaire est la plus conservée: elle présente 61% d'homologie avec celle du poulet et avec celle de *X. laevis*. Le domaine cytoplasmique présente de 49 à 57% d'homologie avec les séquences CD3 g/d, CD3g, CD3d connues (Fig.3).

ANALYSE DE L'EXPRESSION DE CD3 DANS DIFFERENTS TISSUS DE

	-----signal-----> <-----extracellulaire----->	
MurineCD3g	MEQRKGLAGLFLVISLLQGTVAQTNKAKNL VQVDGSRGDGSLVLLTCGLTDKTIKWKDGS	60
rattusCD3g	MEQKGGLAGLFLVISLLQGTMAQQKEEHL FKVDDSGDGSVLLTCDFNEKITWLKDGH	59
HumanCD3g	MEQKGGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHL VKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGK	60
MurineCD3d	MEHSGILASLILIAVLPQG-----SP FKIQVTEYEDKVFVTCNT----SVMHLDGT	47
RattusCD3d	MEHYGILVSLLLATVLPQG-----SP FKIEVVEYEDKVFVNCNT----SIRHLDGS	47
humanCD3d	MEHSTFLSGLVLATLLSQV-----SP FKIPIEELEDKVFVNCNT----SITWVEGT	45
GallusCD3g/d	MWKGRALGTWLLACVAVAKLGV-----HG LSMVKEVSGKVFLLQCQESKDLNTNYLWKK	55
XenopusCD3g/d	MKNHLQIAWMLVLMVTLKA-----TC NKIEAFVKNHLYLTCCKVDEK-GESFLWTH	50
PleuroCD3g/d	MLGRRALALLLAVFGLG-----SG VNVTVRESLGELVL-CKG---ATNAEWNT	46
	* : : *	
	-----> <-----	
MurineCD3g	IISPLNATKNTWNLGNNAKDPRGTYYCQCGAKETSNP---LQVYYRMCNCIELN	117
rattusCD3g	RISPPNATKSTWNLGNNAKDPRGTYYCQCGAKKKSQ---LLQVYYRLCNCIELN	116
HumanCD3g	MIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGTYYCQCGSQNKSKP---LQVYYRMCNCIELN	117
MurineCD3d	VEGWFAKNKT-LNLGKGVLDPRGIYLCNGTEQLAKVSSVQVHYRMCQNCVELD	106
RattusCD3d	VERWLTKNKS-LILGKGILDPRGTYYCQCGSQNKSKP---LQVYYRMCQNCVELD	106
humanCD3d	VGTLTSDITR-LDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELD	105
GallusCD3g/d	GKEELGNMRQ-LDLGAIYDDPRGTYYTCQ-RDENVNS--TLHVHYRMCQNCIEVD	111
XenopusCD3g/d	DTKNIDLFNKTLDLGSVWNPDRGTYYCQCGAKETSQ---IEVFVYRMCQNCIEMD	108
PleuroCD3g/d	G---GRNLE-VNLGALTRDPRGTYYSCS-EHGNPQSKDTLQVYYRMCNCIELD	100
	*** ** *	
	-----> <-----	
MurineCD3g	FIFAEVISIFFLALGVYLIA GQDGVQRQR--ASDKQTLQNEQLYQPLKDREYDQYSHLQ	175
rattusCD3g	FIFAEIISIFFLAVGVYFIA GQDGVQRQR--ASDKQTLQNEQLYQPLKDREYDQYSHLQ	174
HumanCD3g	FLFAEIVSIFVLAVGVYFIA GQDGVQRQR--ASDKQTLQNEQLYQPLKDREDDQYSHLQ	175
MurineCD3d	VIFIDLIATLLALGVYCFAGHETGRPSG--AAEVQALLKNEQLYQPLRDREDTQYSHLQ	164
RattusCD3d	VIITDLIATLLALGVYCFAGHETGRPSG--AAEVQALLKNEQLYQPLRDREDTQYSHLQ	164
humanCD3d	IIVTDVIATLLALGVYCFAGHETGRPSG--AAEVQALLKNEQLYQPLRDREDTQYSHLQ	163
GallusCD3g/d	IVVADVATVLLAIAYVCIT GQDKGLMSR--ASDRQNLIANDQYQPLGERNDGQYSQLA	169
XenopusCD3g/d	FIIADIIMIGLIAIAYVCVS GSETRRRP--ASDKQNLLQND-LYQPLQRSEDYSHLN	165
PleuroCD3g/d	IVVADVITILIAVAYVCVS GSEKGRPSRGKSSDKQVLIPNDQYQPLRDREESAYSHT	160
	.. : : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *	
	----->	
MurineCD3g	GNQLRKK--	182
rattusCD3g	GNQVRKK--	182
HumanCD3g	GNQLRRN--	182
MurineCD3d	GNWPRNKKS	173
RattusCD3d	GNWPRNKRS	173
humanCD3d	GNWARNK--	171
GallusCD3g/d	TAKARK---	175
XenopusCD3g/d	SR-----	167
PleuroCD3g/d	ASRPRRK--	167

Fig.3 : comparaison entre la séquence CD3 de *Pleurodeles waltl* obtenue et les séquences CD3 g, d, g/d déjà connues chez *Xenopus laevis*, le poulet et des mammifères. Les différents domaines potentiels de la protéine sont indiqués. Les acides aminés identiques sont marqués d'un astérisque (*). Le signe (:) indique des acides aminés substitués mais conservés et enfin le signe(.) indique des acides aminés substitués semi-conservés.

PLEURODELES WALT

L'obtention de cette séquence CD3 a permis de localiser et de quantifier l'expression du complexe CD3. Le sang et les différents organes proviennent de pleurodèles adultes âgés de 2 ans; par contre, le thymus provient de larves parvenues au stade 42 (26-27 jours après la ponte) car il a été montré par TOURNEFIER (1976) qu'à partir du stade 50, les thymocytes migraient hors du thymus. Ces stades ont été définis par GALLIEN et DUROCHER (1957).

Deux techniques différentes: RT-PCR semi-quantitative et Northern-blot (SAMBROOK *et al.* 1989) ont été utilisées et ont montré que le thymus est l'organe dont l'expression en ARNm CD3 est la plus forte suivie de la rate (55% du signal donné par le thymus), du sang (33 % du signal thymique) et enfin des intestins (16%), (Fig. 4). Ceci confirme bien les spécificités tissulaire et lymphoïde de la séquence obtenue.

ANALYSE DE L'EXPRESSION DE CD3 AU COURS DE L'ONTOGENESE PRECOCE CHEZ *PLEURODELES WALT*

Pour cette étude, des embryons et des larves âgés de quelques heures à 27 jours après la ponte ont été utilisés (stades 2 à 42) et analysés par la technique de RT-PCR semi-quantitative. L'ARNm CD3 est présent dès le stade 15 (69 h après la ponte) donc dès le stade neurula; son expression augmente jusqu'au jour 9 (stade 33) et ensuite, il semble qu'elle se stabilise (stade 42; 26-27 jours), (Fig.5).

DISCUSSION

SIMILITUDE ENTRE L'ADNC CLONE ET SEQUENCE ET LES SEQUENCES CD3 γ , δ , γ/δ DEJA CONNUES

La 1ère amplification obtenue par RT-PCR a donné un produit unique d'amplification. Après clonage et séquençage, il s'est avéré que cette bande était homogène et présentait une très forte homologie avec le fragment correspondant au CD3 g/d de *Xenopus laevis* et au CD3 g/d du poulet: respectivement 62% et 60 % d'homologie en acides aminés. Cette homologie atteint 70 % quand on considère les acides aminés similaires en taille et/ou en charge. Le fait de n'avoir obtenu à ce stade qu'une bande d'amplification laisse présager qu'il n'y a qu'un gène de type CD3 g/d comme chez *X. laevis* ou chez le poulet.

Le séquençage de ce fragment interne a permis de synthétiser des oligonucléotides pour amplifier les parties 5' et 3' de l'ADNc c'est-à-dire d'obtenir la séquence complète de l'ADNc.

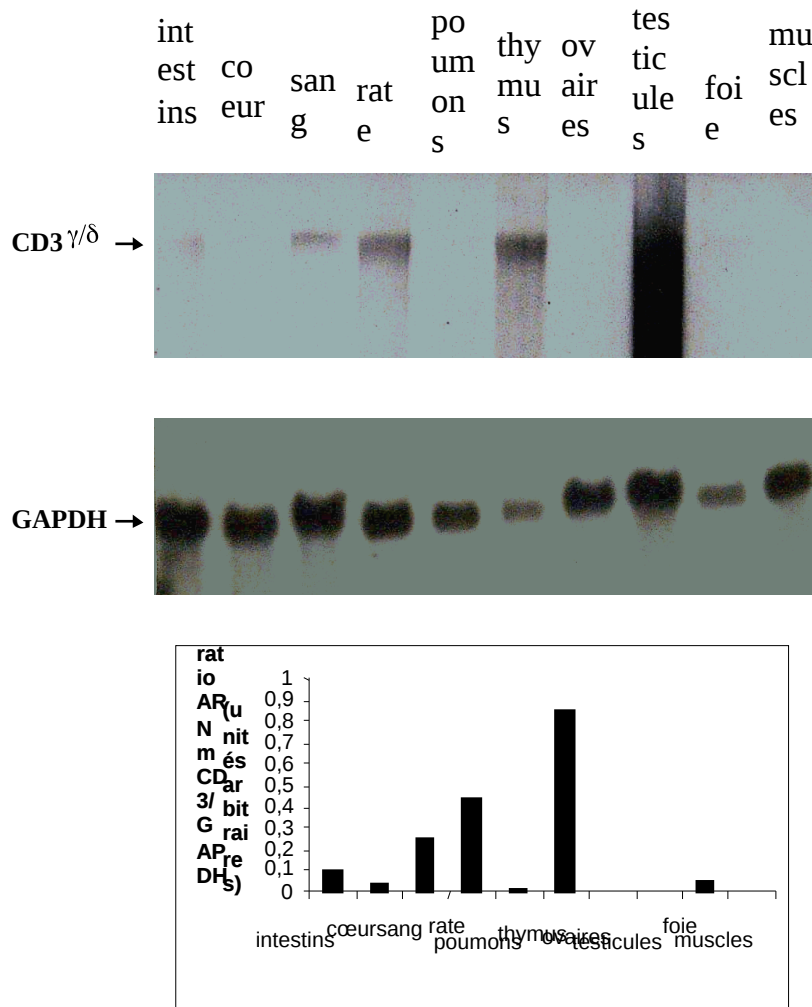


Fig.4: analyse par Northern blot de l'expression d'ARNm CD3 chez *Pleurodeles waltl* dans différents tissus et dans le sang. Tous les prélèvements proviennent de pleurodeles adultes âgés de 2 ans excepté le thymus qui provient de larves au stade 42 (26-27 jours après la ponte). Le glyceraldéhyd 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH) sert de contrôle pour quantifier cette

ROPARS A.

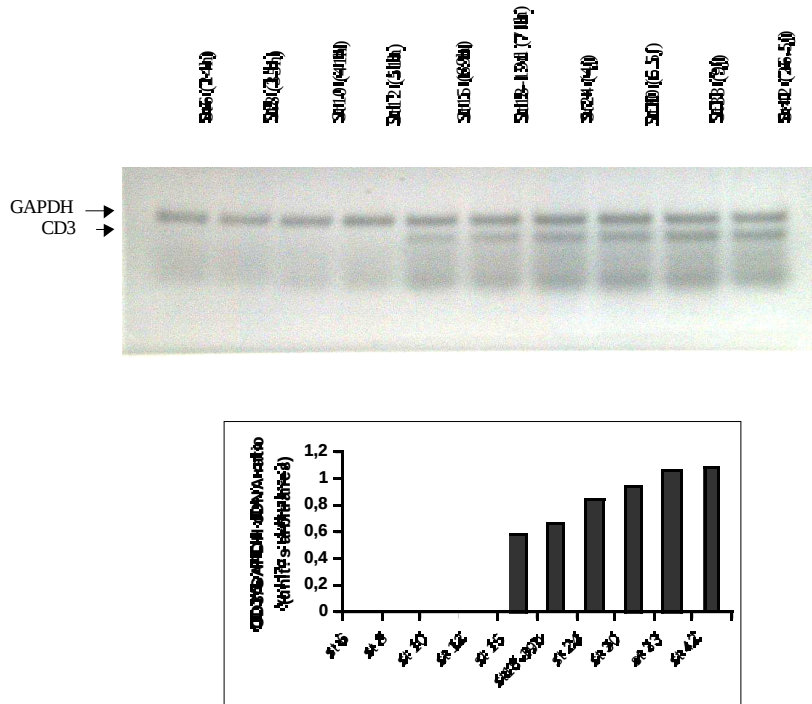


Fig.5: analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de CD3 au cours du développement prœcoce de *Pleurodeles waltl*. La GAPDH sert de témoin de base.

Ces extrémités 5' et 3' présentent des homologies moins fortes que celles obtenues avec le fragment interne mais les portions essentielles à la structure et à la fonction de la protéine sont conservées (ex: motif nécessaire à la dé/phosphorylation).

Comme les Urodèles constituent un lien entre les poissons téléostéens et les anoures, il serait intéressant de connaître la composition de leur complexe CD3, de même que pour les axolotls, mais malheureusement aucune séquence CD3 à part CD3 g/d de *X. laevis* et de *P. waltl* n'est disponible actuellement.

EXPRESSION DANS LES TISSUS

Parmi toutes les sources d'ARN utilisées, la plus forte expression de l'ARNm CD3 g/d est détectée dans le thymus de larves parvenues au stade 42 (26-27 jours après la ponte). Cette observation est en accord avec une étude précédente où nous trouvons une très forte expression thymique d'un autre

marqueur lymphoïde: RAG-1, enzyme impliquée dans les réarrangements dans les lymphocytes B et T (FRIPPIAT *et al.* 2001). Ces résultats impliquent donc que le thymus chez le pleurodèle est un organe lymphoïde primaire pour la maturation des cellules T. Une forte expression de CD3 g/d est retrouvée dans la rate, confirmant ainsi les observations de TOURNEFIER (1976) qui décrivait cet organe comme étant un organe lymphoïde secondaire chez *P. waltl*. Etant donné qu'il existe un niveau moyen en ARNm CD3 g/d dans les intestins de *P. waltl*, l'hypothèse de l'existence de tissu lymphoïde secondaire est envisageable dans ce tissu comme dans d'autres espèces telles que *X. laevis*, les oiseaux et les mammifères. D'ailleurs, un urodèle, *Notophthalmus viridescens*, possède des îlots lymphoïdes dans la paroi intestinale (HIGHTOWER et St PIERRE 1971).

ONTOGENESE T PRECOCE

L'ARNm CD3 g/d apparaît donc très rapidement : au stade neurula (st15, 69 h après la ponte); ceci peut paraître surprenant car à ce stade, l'ébauche thymique est absente. Chez le pleurodèle, elle apparaît au jour 9 (CHARLEMAGNE 1977) soit 6 jours après le début de l'expression de l'ARNm CD3 g/d et 2 jours avant l'éclosion.

Dans une étude précédente, nous avons montré que l'ARNm RAG-1 apparaissait 71h après la ponte (stade 18), (FRIPPIAT *et al.* 2001). L'apparition concomitante de ces 2 marqueurs lymphoïdes suggère que les premières cellules T réarrangent en dehors du thymus. Qu'en est-il chez les autres animaux?

De fait, dans les modèles très étudiés ayant une éclosion très rapide, comme *Danio rerio* ou *X. laevis*, il y a une bonne corrélation entre l'apparition de RAG et l'ébauche thymique (WILLET *et al.* 1997, 1999).

Par contre, chez la truite arc-en-ciel, qui présente un développement long comme *P. waltl*, il semble qu'il y ait un décalage entre les marqueurs lymphoïdes et la formation des organes lymphoïdes primaires: les ARNm RAG-1 et RAG-2 sont détectés au 10ème jour après la ponte; la recombinaison complète VDJ pour le TCR a lieu 5 jours plus tard et le thymus apparaît seulement 20 ou 23 jours après la ponte (GRACE et MANNING 1980, CASTILLO *et al.* 1991). De même, lors de l'ontogenèse B, on observe aussi un décalage car les premières cellules B apparaissent alors que le pronéphros est seulement hématopoïétique (CASTILLO *et al.* 1993, HANSEN et ZAPATA. 1998). Donc chez *P. waltl* et chez la truite arc-en-ciel, se pose la question du où des lieu(x) où réarrangent ces premières cellules B et T et de leur rôle.

Ces premières cellules répondent-elles à un répertoire antigénique correspondant à des agents pathogènes capables de dégrader la gangue de l'oeuf et d'infecter ce dernier par la suite?

Ce phénomène semble en tout cas assez général car chez les mammifères et chez les oiseaux, il a été mis en évidence chez la souris pour les cellules T (RODEWALD *et al.* 1994) et chez le poulet pour les cellules B (REYNAUD *et al.* 1992). Ces phénomènes sont-ils tous similaires et répondent-ils tous à un répertoire antigénique restreint?

L'obtention des ADNc de RAG-1 et de CD3 chez *P. waltl* et l'utilisation de l'hybridation *in situ* pourra peut-être nous permettre de répondre à la première partie de la question, à savoir la localisation de l'endroit où naissent ces premières cellules T.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNAIZ-VILLENA A., TIMON M., CORELL A., PEREZ-ACIEGO P., MARTIN-VILLENA J.M., REGUEIRO J.R., 1992 - Primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3 subunit of the T-lymphocyte receptor. *N. Engl. J. Med.*, **327**, 529-533.
- BERNOT A., AUFFRAY C., 1991 - Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2550-2554.
- CASTILLO A., LOPEZ-FIERRO P., ZAPATA A., VILLENA A.J., RAZQUIN B., 1991 - Post-hatching development of the thymic epithelial cells in the rainbow trout *Salmo gairdneri* : an ultrastructural study. *Am. J. Anat.*, **190**, 299-307.
- CASTILLO A., SANCHEZ C., DOMINGUEZ J. KAATARI S.L., VILLENA A.J., 1993 - Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 419-424.
- CHAN A.C., DESAI D.M., WEISS A., 1994 - The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Re. Immunol.*, **12**, 555-592.
- CHARLEMAGNE J., 1977 - Thymus development in amphibians: colonization of the thymic endodermal rudiments by lymphoid stem-cell of mesenchymal origin in the Urodele *Pleurodeles waltlii* Michah. *Ann. Immunol. (Inst Past)*, **128c**, 897-904.
- DELGADO P., FERNANDEZ E., DAVE V., KAPPES D., ALARCON B., 2000 - CD3 delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature*, **406**, 426-430.
- DZIALO R.C., COOPER M.D., 1997 - An amphibian homologue of the mammalian CD3 gamma and delta genes. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 1640-1647.
- FRIPPIAT C., KREMARIK P., ROPARS A., DOURNON C., FRIPPIAT J.P., 2001 - The recombination-activating gene 1 of *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian) is transcribed in lymphoid tissues and in the central nervous system. *Immunogenetics*, **52**, 264-275.
- GALLIEN L., DUROCHER M., 1957 - Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. France et Belgique*, **91**, 97-114.
- GRACE M.F., MANNING M.J., 1980 - Histogenesis of the lymphoid organs in the rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.*, **4**, 255-264.
- HAKS M.C., KRIMPENFORT P., BORST J., KRUISBEEK A.M., 1998 - The CD3 gamma chain is essential for development of both the TCR alphabeta and TCR gammadelta lineages. *EMBO J.*, **17**, 1871-1882.

- HANSEN J.D., ZAPATA A.G., 1998 - Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol. Rev.*, **166**, 199-220.
- HIGHTOWER J.A., SAINT-PIERRE R.L., 1971 - Hematopoietic tissue in the adult Newt, *Notophthalmus viridescens*. *J. Morphol.*, **135**, 299-308.
- IWASHIMA M., IRVING B.A., VAN OERS N.S., CHAN A.C., WEISS A., 1994 - Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*, **263**, 1136-1139.
- KRISSANSEN G.W., OWEN M.J., FINK P.J., CRUMPTON M.J., 1987 - Molecular cloning of the cDNA encoding the T3 gamma subunit of the mouse T3/T cell antigen receptor complex. *J. Immunol.*, **138**, 3513-3518.
- MALISSEN M., GILLET A., ARDOUIN L., BOUVIER G., TRUCY J., FERRIER P., VIVIER E., MALISSEN B., 1995 - Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J.*, **14**, 4641-4653.
- REYNAUD C.A. IMHOF B.A., ANQUEZ V. WEILL J.C., 1992 - Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *EMBO J.*, **11**, 4349-4358.
- RODEWALD H.R., KRETZSCHMAR K., TAKEDA S., HOHL C., DESING M., 1994 - Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood : T lineage commitment can precede thymus colonization. *EMBO J.*, **13**, 4229-4240.
- ROPARS A., BAUTZ A.M., DOURNON C., 2002 - Sequencing and expression of the CD3 g/d mRNA in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). *Immunogenetics*. **54**, 130-138.
- SAITO H., KOYAMA T., GEORGOPOULOS K., CLEVERS H., HASER W.G., LEBIEN T., TONEGAWA S., TERHORST C., 1987 - Close linkage of the mouse and human CD3 gamma- and delta- chain genes suggests that their transcription is controlled by common regulatory elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9131-9134.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (eds), 1989 - Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SOUDAIS C., DE VILLARTAY J.P., LE DEIST F., FISCHER A., LISOWSKA-GROSPIERRE B., 1993 - Independent mutations of the human CD3-epsilon gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nat. Genet.*, **3**, 77-81.
- TOURNEFIER A., 1976 - Contribution à l'étude des organes lymphoïdes et de la réponse immunitaire chez les amphibiens urodèles: *Triturus alpestris* Laur. et *Pleurodeles waltlii* Michah. PhD thesis. University Pierre and Marie Curie. Paris.
- TUNNACLIFFE A., BULUWELA L., RABBITTS T.H., 1987 - Physical linkage of three CD3 genes on human chromosom 11. *EMBO J.*, **6** 2953-2957.
- WILLET C.E., ZAPATA A.G., HOPKINS N., STEINER L.A., 1997 - Expression of zebrafish rag genes during early development identifies the thymus. *Dev. Biol.*, **182**, 331-341.

ROPARS A.

WILLET C.E., CORTES A., ZUASTI A., ZAPATA A.G., 1999 - Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **214**, 323-336.