

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse des T-Zell-Rezeptor-V β -Repertoires und verschiedener
T-Zell-Subpopulationen mittels multiparametrischer
Durchflusszytometrie und deren Beeinflussung durch
Virusinfektionen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Isabell Bretschneider

aus Herzberg (Elster)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
2. Prof. Dr. med. F. Kern
3. Prof. Dr. med. K. Asadullah

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
1 Einleitung.....	6
1.1 <i>Das Immunsystem.....</i>	6
1.2 <i>T-Zellen</i>	6
1.3 <i>Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen</i>	7
1.4 <i>Durchflusszytometrische Bestimmung der Subpopulationen von T-Zellen</i>	8
1.5 <i>TCR-Diversität durch TCR-Rearrangement.....</i>	8
1.6 <i>TCR-Klonotypen zur Darstellung von Häufigkeiten.....</i>	9
1.7 <i>Ubiquitäre Viren bei immunsupprimierten Patienten</i>	10
1.8 <i>Bisherige Bedeutung der adoptiven Immuntherapie</i>	10
1.9 <i>Zielstellung der Arbeit.....</i>	11
2 Material.....	13
2.1 <i>Verbrauchsmaterial.....</i>	13
2.2 <i>Reagenzien und Chemikalien</i>	13
2.3 <i>Medien und Puffer.....</i>	14
2.4 <i>Antikörper, Beads und Live/Dead fixable Kit.....</i>	15
2.5 <i>Produkte zur magnetischen Zellseparation</i>	16
2.6 <i>Laborgeräte.....</i>	16
2.7 <i>Software.....</i>	17
3 Methoden	18
3.1 <i>Eigenschaften der Kontrollgruppe</i>	18
3.2 <i>Methoden der Zellisolierung und Zellkultur.....</i>	19
3.2.1 <i>Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation</i>	19
3.2.2 <i>Zellzählung</i>	19
3.2.3 <i>CMV-IgG-Serologie.....</i>	19
3.2.4 <i>Generierung der CMV T-Zelllinien mittels INF-γ Sekretions Assay</i>	20
3.2.5 <i>Kultivierung und Expansion der CMV-spezifischen T-Zelllinien.....</i>	20
3.2.6 <i>Zellkultur der CMV-, EBV- und Adenovirus-spezifischen T-Zelllinien</i>	21
3.2.7 <i>Kryokonservierung von Spenderzellen.....</i>	21
3.3 <i>Durchflusszytometrie.....</i>	22
3.3.1 <i>Durchflusszytometrische Färbung</i>	22
3.3.2 <i>Durchflusszytometrische Messung</i>	23
3.3.3 <i>Datenanalyse.....</i>	23
3.4 <i>TCR-Single-Kolonie-Sequenzierung.....</i>	25
3.4.1 <i>Separation von CD4+ und CD8+ T-Zellen und RNA-Isolierung</i>	26
3.4.2 <i>Herstellung der cDNA</i>	26
3.4.3 <i>Amplifizierung der TCR-Vβ-Familien</i>	26
3.4.4 <i>Klonierung und Transformation des PCR-Produktes</i>	27
3.4.5 <i>Kolonie-PCR</i>	27
3.4.6 <i>Aufreinigung und Sequenzierung</i>	27

3.4.7 Analyse der Sequenzen.....	27
3.5 Statistische Analyse	28
4 Ergebnisse	29
4.1 Messung und Berechnung der TCR-V β -Familien-Referenzwerte bei gesunden Probanden	29
4.1.1 Zusammenstellung des Antikörperpanels für eine optimale Gating-Strategie.....	29
4.1.2 Verteilung der T-Zell-Subpopulationen bei gesunden Probanden	29
4.1.3 Bestimmung des TCR-V β -Repertoires bei CD4+ und CD8+ T-Zellen.....	31
4.1.4 Bestimmung des TCR-V β -Repertoires bei T-Zell-Subpopulationen – stark polarisiertes TCR-V β - Repertoire bei den Effektor-T-Zell-Subpopulationen.....	34
4.1.5 Der CMV-Serostatus beeinflusst maßgeblich das TCR-V β -Repertoire bei CD8+ T-Zellen, nicht aber bei CD4+ Subpopulationen	36
4.2 Analyse der T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie	37
4.2.1 Molekularbiologische und durchflusszytometrische Beurteilung von Klonalitäten bei T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie	37
4.2.2 Keine Korrelation zwischen TCR-Diversität und Subpopulationenanalyse	40
5 Diskussion	42
5.1 Diskussion der Hypothese und Zielstellung.....	42
5.2 Auswirkung und Bestätigung der Erkenntnisse über die Klonalität der T-Zell-Subpopulationen.....	43
5.3 Referenzwerte des TCR-V β -Repertoire bei CD4+ und CD8+ T-Zellen im Vergleich mit anderen Studien.....	44
5.4 Optimierungspotential und Alternativen zum verwendeten Antikörperpanel.....	44
5.5 Anteil der T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut	45
5.6 CMV-Serostatus und TCR-V β -Repertoire	45
5.7 Kritische Bewertung von Spekratyping und Real-time-PCR als Alternativen zur der TCR-V β - Durchflusszytometrie.....	46
5.8 Die hochparallele Pyrosequenzierung als quantitativ überlegene Methode zur Single-Kolonie-Sequenzierung – Alternative der Zukunft?.....	47
5.9 Dominierender Effektor-T-Zell-Phänotyp bei den T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie	48
5.10 Bedeutung der TCR-V β -Repertoire-Durchflusszytometrie und der Single-Kolonie-Sequenzierung für die adoptiven T-Zelltherapie	48
5.11 Ausblick.....	49
6 Zusammenfassung.....	51
7 Summary	53
8 Abkürzungsverzeichnis	55
9 Literaturverzeichnis.....	57
Veröffentlichung.....	62
Kongressbeiträge.....	62
Erklärung.....	63
Danksagung	64

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierungsstatus der T-Zellen in Thymus, Blut und Lymphknoten	9
Abbildung 2: Darstellung des T-Zell-Rezeptors	11
Abbildung 3: Übersicht der angewendeten Methoden	18
Abbildung 4: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Messung mit Beispielfärbung	23
Abbildung 5: Festlegung von verschiedenen CD3+/CD4+ und CD3+/CD8+ T-Zell-Subpopulationen.....	24
Abbildung 6: Die einzelnen Schritte der TCR-Sequenzierung	25
Abbildung 7: Vergleich der Subpopulationen-Verteilung mit Antikörpern für verschiedene Oberflächenmoleküle und die Wahl der geeigneten Kombination	30
Abbildung 8: Unterschiede bei den Effektor-T-Zell-Subpopulationen bei CD4+ und CD8+ T-Zellen.....	31
Abbildung 9: Bei CD8+ T-Zellen waren signifikant höhere Expansionszahlen und Expansionsfaktoren als bei CD4+ T-Zellen zu sehen.	33
Abbildung 10: Die Effektor-T-Zellen haben mehr Expansionen und höhere Expansionswerte als naive oder Memory-T-Zellen.....	34
Abbildung 11: Beispiel 1 – die Expansion der TCR-V β -Familie 8 bei CD8+ T-Zellen konnte durch verschiedene Oberflächenmarker-Kombinationen für Effektor-T-Zellen bestätigt werden.	35
Abbildung 12: Beispiel 2 - auch die Expansion der TCR-V β -Familie 5.1 bei CD8+ T-Zellen konnte durch verschiedene Oberflächenmarker-Kombinationen für Effektor-T-Zellen bestätigt werden.....	36
Abbildung 13: Bei CD8+ T-Zellen ist der Expansionsfaktor bei CMV-seropositiven Probanden signifikant höher als bei CMV-seronegativen Probanden	37
Abbildung 14: Die Anzahl der Expansionen und die Expansionswerte der T-Zellen vor und nach Viruspeptid-spezifischer Expansion zur adoptiven T-Zelltherapie	38
Abbildung 15: Bei den analysierten T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie besteht keine Korrelation zwischen TCR-Klonalität und Subpopulationen-Verteilung	41
Abbildung 16: Erweitertes verzweigtes Differenzierungsmodell nach den hier gewonnenen Erkenntnissen über die Klonalität von naiven, Central-Memory-, Effektor-Memory- und Effektor-T-Zellen.	42
Tabelle 1: TCR-V β -Familien-Verteilung bei CD4+ und CD8+ T-Zellen.....	32
Tabelle 2: Die Sequenzen der Probanden vor und nach Expansion bei T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie...	39

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist essentiell für das Überleben. Es hilft dem Körper bei der Abwehr von Bakterien, Viren, Protozoen und malignen körpereigenen Zellen. Dafür muss es die Pathogene erkennen und eliminieren. Die erste Verteidigungslinie ist hierbei die Haut, welche bereits das Eindringen in den Körper verhindern soll. Umgehen Pathogene diese äußeren Barrieren, wird die angeborene Immunität aktiviert. Der angeborenen Immunität gehören Komplementsystem, Phagozyten (Makrophagen, dendritische Zellen), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und lösliche Mediatoren an.

Körpereigene Zellen tragen zur Erkennung spezifische Glykoproteine, genannt Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse 1. Über diesen MHC Klasse 1 werden von der Zelle synthetisierte Proteine prozessiert, sodass entartete oder infizierte Zellen erkannt werden können. Die Komponenten des erworbenen Immunsystems, B-Zellen und T-Zellen, können so eine pathogenfokussierte Abwehr generieren. Beim Kontakt mit bekannten Pathogenen wird das erworbene Immunsystem diese über Antikörper, produziert von B-Zellen, und durch direkt zytotoxische T-Zellen effektiver und schneller als mit der angeborenen Immunität eliminieren können [1].

1.2 T-Zellen

T-Zellen können nach ihren Aufgaben bei der Pathogenerkennung und bei deren Eliminierung unterschieden werden. Die T-Helfer-Zellen, welche durch das Oberflächenmolekül CD4 gekennzeichnet sind, erhalten Signale von antigenpräsentierenden Zellen und aktivieren anschließend die weiteren Komponenten der erworbenen Immunität. Antigenpräsentation ist eine wesentliche Funktion von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen. Hierzu werden extrazelluläre Proteine durch Endozytose aufgenommen und in kurze Peptide gespalten. Diese werden dann über den MHC Klasse 2 für die T-Helfer-Zellen prozessiert. Auf dieses Signal hin geben die T-Helfer-Zellen Typ 2 über Zytokine (Il-3, Il-4 und Il-10) Signale an B-Zellen und stimulieren diese zur Antikörperproduktion und Antikörperfreisetzung. Eine andere Gruppe, die T-Helfer-Zellen Typ 1, stimulieren mit den Zytokinen Il-2, INF- γ und TNF zytotoxische T-Zellen. Diese zytotoxischen T-Zellen, welche durch das Oberflächenmolekül CD8 zu erkennen sind, zerstören über Perforine die Membranintegrität der Zielzellen. Darüber

hinausgehend können zytotoxische T-Zellen und T-Helfer-Zellen nach ihrem Differenzierungsgrad unterschieden werden [1].

1.3 Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen

Die T-Vorläuferzellen werden im Knochenmark gebildet und wandern anschließend in den Thymus. Dort werden während der positiven Selektion nur T-Zellen ausgewählt, welche MHC-Moleküle erkennen und somit funktionsfähig sind. Weiterhin werden durch negative Selektion T-Zellen, die eine Immunantwort gegen körpereigene Zellen auslösen, in die Apoptose getrieben. Dann verlassen T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen den Thymus. Zu diesem Zeitpunkt besitzen sie die Fähigkeit, über hochendotheliale Venolen in alle sekundär lymphatischen Organe, d. h. Lymphknoten und Tonsillen, einzuwandern. Dort kommen sie in Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen. Durch Antigenkontakt differenzieren sich die T-Zellen weiter zu verschiedenen Populationen von Memory-T-Zellen und Effektor-T-Zellen. Effektor-T-Zellen befinden sich vor allem im peripheren Gewebe, wo sie direkt und schnell auf Antigene reagieren. Central-Memory-T-Zellen können hingegen in die sekundär lymphatischen Organe einwandern [1] [Abbildung 1].

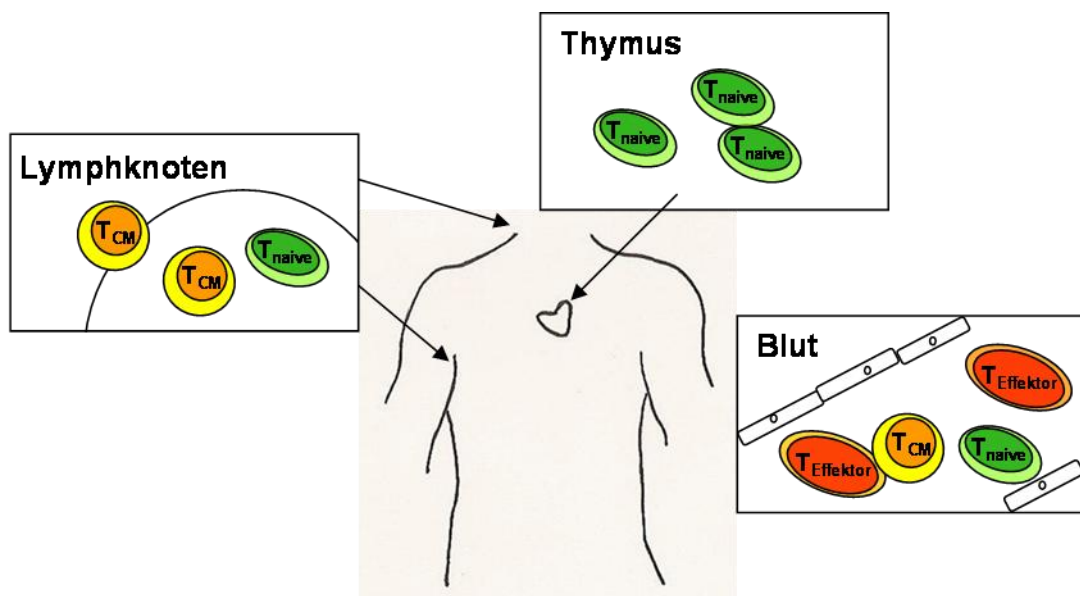


Abbildung 1: Differenzierungsstatus der T-Zellen in Thymus, Blut und Lymphknoten

Nach der Selektion verlassen die naiven T-Zellen den Thymus. Sie können, wie auch Central-Memory-T-Zellen, in den Lymphknoten immigrieren. Im Blut finden sich alle verschiedenen T-Zell-Subpopulationen. T_{CM} = Central-Memory-T-Zelle

1.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Subpopulationen von T-Zellen

In den vergangenen Jahren wurden verstärkt Anstrengungen unternommen um den Phänotyp von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen genau zu beschreiben und dadurch das Verständnis über ihre funktionellen Aufgaben im erworbenen Immunsystem zu erhöhen. Seit dem Aufkommen von multiparametrischer Durchflusszytometrie ist es möglich, gleichzeitig verschiedene Oberflächenmoleküle, die von einer T-Zelle exprimiert werden, zu detektieren.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Hypothesen über die T-Zell-Differenzierung veröffentlicht. Diese unterscheiden sich grundsätzlich dadurch, dass sie eine *lineare* Entwicklung einer *verzweigten* Entwicklung gegenüberstellen [2, 3]. Manche Autoren beschreiben die Entwicklung in nur eine Richtung, während andere von reversiblen Differenzierungsschritten ausgehen. Obwohl sich noch keines der Differenzierungsmodelle durchgesetzt hat, haben sich einige stabile Oberflächenmoleküle zur effizienten Charakterisierung von naiven, Memory- und Effektor-T-Zellen etabliert: CD45RA, CD27, CD28, CCR7 und CD57 [4-17]. Diese Oberflächenmoleküle werden entsprechend dem Vorhandensein oder Fehlen von Antigenen und co-stimulatorischen Molekülen schnell hoch- oder herunterreguliert. Im Allgemeinen kann man sagen, dass beim Menschen das Priming von naiven T-Zellen zu deren Entwicklung zu antigenspezifischen T-Zellen mit verschiedenen funktionellen Eigenschaften führt. Solche Entwicklungsstadien schließen CD45RA+/CD27+/CCR7+ naive, CD45RA+/CD27+/CCR7- Effektor-, CD45RA-/CD27-Memory-, CD45RA-/CD27-/CCR7+ Central-Memory-, CD45RA-/CD27-/CCR7- Effektor-Memory-T-Zellen mit ein.

Bis heute wurden diese T-Zell-Subpopulationen nicht bezüglich der Zusammensetzung ihrer T-Zell-Rezeptoren (TCR) untersucht. Im Allgemeinen ist wenig über die Wechselwirkung der T-Zell-Differenzierung mit der Etablierung eines funktionellen TCR-V β -Repertoires bekannt.

1.5 TCR-Diversität durch TCR-Rearrangement

Der TCR ist ein membrangebundener Heterodimer, welcher aus zwei Polypeptidketten (α/β oder γ/δ) besteht. Er ist assoziiert mit dem zytoplasmatischen Protein CD3 [18]. Während der T-Zell-Entwicklung stellt das Rearrangement von VDJ- und VJ-Genen der α/β - und γ/δ -Ketten die molekulare Basis der enormen Diversität des TCR dar [19]. Durch die allelische Exklusion kann nur eine Art der β -Kette auf jeder α/β -T-Zelle exprimiert werden. Daher kann sie genutzt

werden, um klonale Expansionen ausfindig zu machen und das TCR-V β -Repertoire zu untersuchen [20].

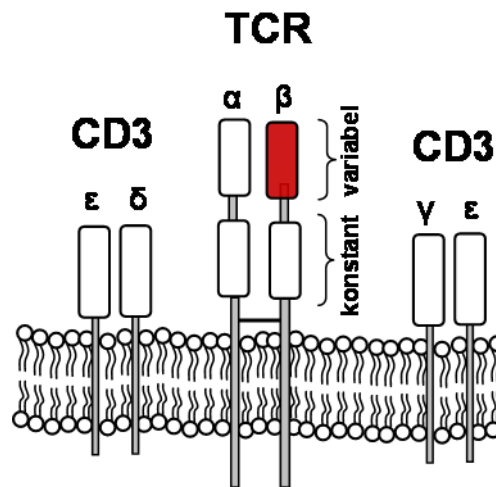


Abbildung 2: Darstellung des T-Zell-Rezeptors

Der TCR ist ein membrangebundener Heterodimer, welcher aus einer α - und einer β -Polypeptidkette besteht. Jede der beiden Ketten setzt sich aus einer variablen und einer konstanten Region zusammen. Die variable Region der β -Kette kann genutzt werden, um klonale Expansionen ausfindig zu machen. Der TCR ist assoziiert mit dem zytosolischen Protein CD3.

Derzeit können mit Hilfe von Durchflusszytometrie und 25 monoklonalen Antikörpern fast 85 % der TCR-V β -Familien humaner T-Zellen charakterisiert werden. Dieses Verfahren wurde weiterhin genutzt, um das TCR-V β -Repertoire bei verschiedenen Krankheitsbildern wie Infektionen, Neoplasien und Transplantation zu untersuchen [21-23]. Bei diesen Arbeiten lag der Fokus eher auf zytotoxischen und T-Helfer-Zellen. Damit ist bislang der Aufbau des TCR-V β -Repertoires innerhalb der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen unzureichend erfasst. Einzelne Darstellungen zeigen vor allem die technischen, aber nicht die biologischen Aspekte auf und bestätigen die Komplexität der TCR-V β -Repertoire-Zusammensetzung [24].

1.6 TCR-Klonotypen zur Darstellung von Häufigkeiten

Bei jeder T-Zelle wird die Antigenspezifität durch ihre spezifische TCR-CDR3-Region, auch Klonotyp genannt, bestimmt [25]. Klonotypen können zur Identifizierung von individuellen CTL Klonen genutzt werden und könnten damit den Angriffspunkt für die Zielantigene darstellen [26].

Moderne Technologien erlauben die Identifikation und Quantifikation von dominanten Klonotypen durch Darstellung der Häufigkeit von identischen Sequenzen innerhalb der CDR3-Region eines PCR-Produktes [23, 26, 27].

1.7 Ubiquitäre Viren bei immunsupprimierten Patienten

Eine effiziente Immunantwort auf ubiquitäre Viren wie Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV) und Adenovirus spielt eine wichtige Rolle bei immunsupprimierten Patienten. Beispielsweise sind diese Viren eines der klinischen Hauptprobleme bei Organ- und Knochenmarkstransplantationen [11, 28]. Antivirale Medikamente stellen die Therapie der Wahl dar, sind jedoch durch ihre toxischen Nebenwirkungen nur begrenzt einsetzbar. Beim klinischen Einsatz sind diese antiviralen Medikamente außerdem oft wirkungslos [28-32].

Für zahlreiche autoimmun-vermittelte und bakterielle Erkrankungen sind monoklonale Antikörper eine revolutionäre Therapieoption. Die Bekämpfung von zahlreichen Erkrankungen viraler Genese ist jedoch abhängig von der Interaktion mit T-Zellen und daher die Antikörpertherapie weniger bedeutend [3]. In den vergangenen Jahren wurde daher verstärkt auf dem Gebiet der zellulären Therapien mit autologen, ex vivo expandierten T-Zellen zur adoptiven T-Zelltherapie geforscht. Diese könnte in Zukunft eine Alternative zu bisherigen Therapieoptionen darstellen.

1.8 Bisherige Bedeutung der adoptiven Immuntherapie

Die adoptive T-Zelltherapie gilt als hoffnungsvoller Ansatz für viele bisher nur unzureichend therapierbare Krankheiten. Hierzu werden spezifische T-Zellen isoliert, *in vitro* kultiviert und anschließend zur Therapie dem Patienten infundiert. Ein Anwendungsgebiet könnten die oft tödlichen opportunistischen Infektionen nach Transplantationen sein. Es gibt derzeit hoffnungsvolle therapeutische Ansätze [33-35]. Auch an der Charité Berlin wurden bereits mehr als 30 Patienten erfolgreich gegen EBV bzw. CMV Infektionen mit adoptiver T-Zelltherapie behandelt [36-38]. Die Methode wird derzeit zur breiten Anwendung beim Patienten vorbereitet.

Jedoch haben diese frühen Studien auch die Grenzen von T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie aufgezeigt. Ein wesentlicher Punkt ist hierbei die Limitation der Lebenszeit der T-Zellen auf wenige Wochen, vor allem bei CMV-spezifischen T-Zell-Kulturen, die vorwiegend Effektor-Memory-T-Zellen enthalten [39, 40]. In Studien wurde die Dauer der Lebenszeit mit dem Subpopulationen-Typ korreliert, denn vor allem Central-Memory-T-Zellen werden als

besonders langlebig im Vergleich zu Effektor- und Effektor-Memory-T-Zellen beschrieben [8]. Diese Tatsache suggeriert, dass die Bestimmung der Subpopulation als Parameter zum besseren Monitoring dieser Zellen genutzt werden könnte.

1.9 Zielstellung der Arbeit

T-Zellen expandieren, nachdem sie durch Antigene *geprimt* wurden. Sogar nach einer Reduzierung der Klone und Kontrolle der Infektion während der Kontraktionsphase ist die Anzahl der antigenspezifischen Zellen innerhalb der Memory-T-Zellen immer noch deutlich größer als bei den naiven T-Zellen. Unter Berücksichtigung dieser Veränderungen bei der Verteilung würde man ein polarisiertes TCR-V β -Repertoire bei den Memory-T-Zell-Subpopulationen erwarten. Basierend auf diesen Erwägungen, lautet die Hypothese dieser Arbeit:

Hypothese: Die Klonalität der T-Zell-Subpopulationen nimmt entlang des Differenzierungspfadens von naiven zu Memory-T-Zellen zu und ist somit am meisten polarisiert innerhalb der Effektor- und Effektor-Memory-T-Zellen.

Zudem wurden die Ergebnisse durch die Analyse von T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie mit der hier etablierten Methode in die klinische Anwendung übertragen. Insgesamt werden daher folgende Teilaspekte bearbeitet:

- 1. Bestimmung der TCR-V β -Repertoire-Variabilität bei verschiedenen Subpopulationen entlang des T-Zell-Differenzierungspfadens.*
- 2. In vitro Analyse der durch virusspezifische Peptide expandierten humanen T-Zellen im Bezug auf TCR-V β -Expression und Subpopulationenspezifität.*
- 3. Molekulare Analyse der einzelnen rearrangierten TCR-Klonotypen und Ermittlung von klonotypischen Expansionen innerhalb einzelner TCR-V β -Familien.*

Dies ist die erste systematische Arbeit, welche bei allen T-Zell-Subpopulationen den Einfluss des Differenzierungsstatus auf das TCR-V β -Repertoire untersucht. Es wird das *in vivo* TCR-V β -Repertoire unter verschiedenen physiologischen Bedingungen mit T-Zellen in verschiedenen

Differenzierungsstufen charakterisiert und quantifiziert. Diese Differenzierungsstufen schließen Effektor-, Memory- und naive T-Zellen mit ein. Sie werden bezüglich der Expression der Oberflächenmoleküle CD27, CD45RA, CCR7 und CD57 untersucht. Diese Werte können als Referenzwerte für andere Studien über das TCR-V β -Repertoire unter pathologischen Bedingungen genutzt werden.

Weiterhin wird das TCR-V β -Repertoire bei diesen Lymphozyten-Subpopulationen nach *ex vivo* Expansion zur adoptiven T-Zelltherapie mit Viruspeptiden untersucht. Dafür wird das TCR-V β -Repertoire von 18 antigenspezifischen T-Zelllinien im ersten Schritt mit monoklonalen Antikörpern analysiert, um dann im Weiteren prominente Expansionen zu sequenzieren.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller
Kryo-Einfrierröhrchen	Greiner, Ammerbuch , Deutschland
25- und 75 cm ² Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
24-Loch Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
96-Loch Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
3,5 ml Transfer-Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5, 10, 25 ml Pasteurpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
10, 100, 1000 µl Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10, 100, 1000 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15 und 50 ml Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Phase Lock Gel Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit	Millipore, Billerica, USA

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Natriumazid-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS-Pufferlösung	PAA, Pasching, Österreich
RPMI-Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penizillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland

Proleukin-2 (humanes Interleukin-2)	Chiron, Ratingen, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
IMMULITE 1000 Luminometric Assay	Siemens, Deerfield, USA
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, USA
Chloroform	Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Isopropanol	Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Ethanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
nukleasefreies Wasser	Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
TAE-Puffer für Gele	Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
Ethidiumbromid	Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
PCR-Loading-Farbstoff	Promega, Madison, USA
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SuperScript III RT Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Taq-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Magnesiumazetat	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP)	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
TA Cloning Vector pCR2.1	Invitrogen, Carlsbad, USA
x-Gal	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.3 Medien und Puffer

Artikel	Zusammensetzung
Zellkulturmedium	500 ml RPMI-Medium, 10 % FCS, 1 % Penizillin/Streptomycin

Einfriermedium	50 ml FCS, 10 % DMSO
Durchflusszytometrie-Puffer	500 ml PBS, 1 % FCS, 0,01 % Natriumazid
PCR-Gel	1,5 % Agarose, 3 µl Ethidiumbromid je 100 ml TA Puffer
DANN-Suspensionspuffer	EDTA und Tris

2.4 Antikörper, Beads und Live/Dead fixable Kit

Antikörper, Beads, Live/Dead fixable Kit	Hersteller
Antikörper CD4 (PeCy7)	Caltag Laboratories, Bangkok, Thailand
Antikörper CD8 (Pacific Orange)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Antikörper CD3 (PerCP)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Antikörper CD27 (Alexa Fluor 700)	BioLegend, San Diego, USA
Antikörper CD45RA (ECD)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Antikörper CD45RA (PE Texas Red)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Antikörper CD57 (Alexa 647)	BioLegend, San Diego, USA
Goat-anti-Mouse-IgG2a, human-ads-Biot	Biozol, Eching, Deutschland
Streptavidin (Pacific Blue)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti-human CCR7 (unkonjugiert)	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Antikörper Vβ 6.7 (FITC)	Pierce Endogen, Rockford, USA
Antikörper CD4 (Pacific Blue)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BD Comp beads Anti-Mouse-Ig	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BD Comp Beads Negative Control	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IO Test Beta Mark TCR Beta-Repertoire Kit	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Live/Dead fixable Kit (APC Cy7)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Antikörper CD4+ PE für magnetische Beads	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Antikörper CD8+ PE für magnetische Beads	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti-PE für magnetische Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.5 Produkte zur magnetischen Zellseparation

Artikel	Hersteller
INF- γ Secretion Assay (Cell Enrichment and Detection Kit)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Trennsäulen (MS; LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mini- und OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSmix Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.6 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsgerät Gamma Cell-40	Atomic Energy, Mississauga, Kanada
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbox	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Feinwaage	Satorius, Göttingen, Deutschland
Gefriertruhe (-80 °C)	Liebherr, Oberhausen, Deutschland
Inkubator	Heraeus, Berlin, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Oberhausen, Deutschland
Mikroskop	Leica, Braunschweig, Deutschland

Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Jena, Deutschland
Pipettierhilfe	Matrix Technologies, Feldkirchen, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus, Berlin, Deutschland
Stickstofftank	Taylor-Wharton, Husum, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuum Manifold	Millipore, Billerica, USA
4625 Titer-Plate-Shaker	Lab line, Vadodara, India

2.7 Software

Software	Hersteller
FACSDiva Software	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FlowJo 8.8.3	Tree Star, Ashland, USA
Microsoft Excel und Word 2002	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
SPSS 16.0 für Windows	SPSS GmbH Software, München, Deutschland

3 Methoden

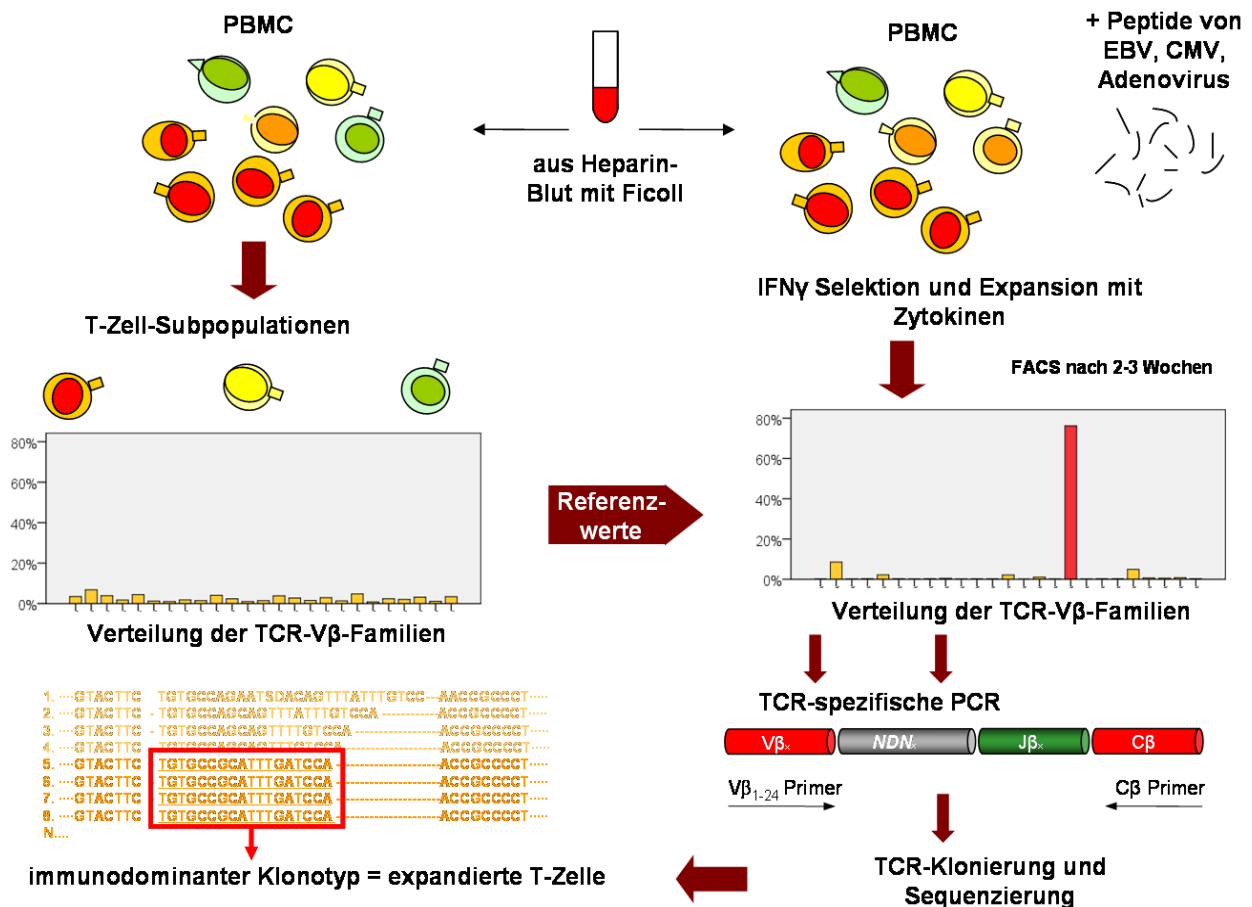


Abbildung 3: Übersicht der angewendeten Methoden

Initial wurden aus dem Heparin-Blut gesunder Probanden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gewonnen. Ein Teil der Zellen wurde am Entnahmetag mittels Durchflusszytometrie auf die T-Zell-Subpopulationenverteilung im peripheren Blut analysiert. Mit den verbliebenen T-Zellen wurden T-Zellkulturen zur adoptiven T-Zelltherapie generiert und die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen verglichen. Herausstechende TCR-V β -Expansionen wurden für die molekulare Analyse mittels TCR-Sequenzierung gewählt.

3.1 Eigenschaften der Kontrollgruppe

Das Blut von 66 Probanden deutscher und US-amerikanischer Herkunft wurde, nach Ausschluss von autoimmunologischen und malignen Erkrankungen in der Krankheitsgeschichte und mit schriftlichem Einverständnis der Probanden, für die Analyse genutzt. Insgesamt wurden 34 Männer und 28 Frauen (das Geschlecht der vier Nabelschnurblutspender ist unbekannt) untersucht. Die Probanden waren im Median 38 Jahre alt. Das Altersspektrum reichte von 0 (Nabelschnurblut) bis 71 Jahren.

3.2 Methoden der Zellisolierung und Zellkultur

3.2.1 Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation

Heparin-Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Falcon-Röhrchen mit einem Volumen von 50 ml wurden mit je 15 ml des Lymphozytentrennmediums Ficoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Deutschland) befüllt. Darauf wurden vorsichtig 30 ml des mit PBS verdünnten Vollblutes geschichtet, um eine Vermischung der beiden Substanzen zu verhindern. Die befüllten Röhrchen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur und einer Beschleunigung von 1000 g mit Verzicht der Bremse zentrifugiert. Es bildeten sich unter Zentrifugation vier Phasen heraus. Das Pellet, bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten, wurde durch eine Schicht aus Ficoll von einem feinen Ring von den mononukleären Zellen (MNC) des peripheren Blutes und dem darauf befindlichen Plasma getrennt. Der weiße Ring aus mononukleären Zellen wurde vorsichtig unter Vermeidung der Mitnahme von Plasma und Ficoll mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. In diesem Röhrchen wurden die mononukleären Zellen zweimal mit 50 ml Durchflusszytometrie-Puffer (PBS, 2 % FCS, 0,02 % Natriumazid) gewaschen und bei Raumtemperatur und einer Beschleunigung von 200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden vorsichtig in Kulturmedium resuspendiert.

3.2.2 Zellzählung

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension mit 190 µl einer 1 %-igen Trypanblaulösung vermischt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Die Deckgläser wurden angefeuchtet und gegen die Neubauer Zählkammer gedrückt, bis die sogenannten Newtonschen Ringe entstanden. Es wurde das Mittel der lebenden, ungefärbten Zellen in den vier Großquadraten der Zählkammer bestimmt.

3.2.3 CMV-IgG-Serologie

Der CMV-Serostatus von 21 Probanden wurde mittels IMMULITE 1000 Luminometric Assay für die Bestimmung von CMV-IgG Antikörpern in humanem Serum bestimmt.

3.2.4 Generierung der CMV T-Zelllinien mittels INF- γ Sekretions Assay

Es wurden 25 Millionen mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut pro CMV-positiven Spender isoliert. 10 Millionen Zellen wurden für die durchflusszytometrische Färbung der TCR-V β -Familien am Tag 0 benötigt. Mit weiteren mindestens 15 Millionen Zellen wurde eine T-Zelllinie generiert.

Die Zellen wurden zur Stimulation in eine 24-Lochplatte gesetzt (1×10^7 Zellen/Loch) und sechs Stunden lang mit dem CMV-Peptid pp65 stimuliert. Danach wurden die Zellen im Zellkulturmedium aufgenommen und auf eine Zellzahl von 200 Millionen Zellen je 1 ml Zellkulturmedium eingestellt. Für die Menge von einer Million Zellen wurde 25 μ l INF- γ -Fang-Antikörper zugefügt. Dieses Gemisch musste 10 min auf Eis inkubieren. Danach wurde mit warmem Zellkulturmedium (Verdünnung auf eine Million Zellen/1 ml) die INF- γ Sekretion induziert. Die Inkubation erfolgte unter kontinuierlicher Rotation bei 37 °C und 5 % CO₂ für 50 min. Im Anschluss wurden die Zellen mit kaltem Zellkulturmedium bei 4 °C gewaschen und abzentrifugiert (4 °C, 8 min, 400 g). Das Pellet wurde mit Pycoerythrin (PE) markiertem INF- γ Detektions-Antikörper (100 μ l Zellkulturmedium sowie 25 μ l/20 Millionen Zellen) gemischt und auf Eis inkubiert. Nach 10 min wurden die Zellen erneut mit kaltem Zellkulturmedium bei 4 °C gewaschen. Die Zellen wurden nach Zentrifugation (4 °C, 8 min, 400 g) mit anti-PE-Beads für 25 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen nochmals bei 4 °C gewaschen, zentrifugiert (4 °C, 8 min, 400 g) und das Pellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine vorgespülte Separations-Säule gegeben und im Magnetfeld in INF- γ -positive und INF- γ -negative Fraktionen getrennt. Die in der Säule verbliebenen INF- γ -positiven Zellen wurden mit 1 ml Zellkulturmedium (mit 100 IU/ml IL-2) und mit der Hilfe eines Stempels von der Säule in ein Loch einer 24-Lochplatte eluiert. Die INF- γ -negative Zellfraktion wurde bestrahlt (in einem Röhrchen auf Eis mit 30 Gy) und auf eine Konzentration von $7,5 \times 10^6$ Zellen pro 1 ml Zellkulturmedium (mit 100 IU/ml IL-2) eingestellt. Ein Milliliter dieser Zellsuspension wurde als Feederzellfraktion zu den INF- γ -positiven, CMV-spezifischen Zellen gegeben.

3.2.5 Kultivierung und Expansion der CMV-spezifischen T-Zelllinien

Die Kultivierung der T-Zelllinien erfolgte in 24-Loch Zellkulturplatten. Das Zellwachstum wurde anhand der Größe der Proliferationsklumpen mikroskopisch bewertet. Die makroskopische Kontrolle der Farbe des Zellkulturmediums diente als weiterer Indikator zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens der Zellen. Die Zellen wurden bei ausreichender Dichte

und gleichzeitigem Farbumschlag des Zellkulturmediums von rot nach gelb gesplittet. Hierfür wurden sie mit Hilfe einer Pasteurpipette resuspendiert und die Hälfte der Zellsuspension wurde in ein neues Loch überführt. Abschließend wurde das Kulturvolumen durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium (mit 100 IU/ml IL-2) wieder auf 2 ml pro Loch gebracht.

3.2.6 Zellkultur der CMV-, EBV- und Adenovirus-spezifischen T-Zelllinien

Anschließend wurde die Analyse von T-Zellen gesunder Probanden vor und nach Virusexpansionen durchgeführt. Die Virus-Zelllinien wurden durch bekannte T-Zell-Expansionsprotokolle und wie oben beschrieben generiert [30, 31]. Für diese Doktorarbeit wurden in vitro Kulturen von CMV- (n = 7), EBV- (n = 6) und Adenovirus-spezifischen (n = 5) Lymphozyten genutzt. Für diese Kulturen wurden T- Zellen nach Peptidstimulation und IFN- γ -Selektion expandiert. Die Peptidstimulation erfolgte für CMV Stimulierung mit pp65/IE1 Peptiden und für EBV Stimulierung mit EBNA 1, 2, 3, BZLF1 und LMP2. Für die Stimulierung mit Adenovirus wurde ein Adenovirus-Peptid-Mix verwendet.

Zwei der CMV-Zelllinien generierte ich selbst. Außerdem wurden vier CMV-Zelllinien von Sandra Zwinger (Medizinische Immunologie, Charité), sechs EBV-Zelllinien von Andy Römhild (Medizinische Immunologie, Charité) und sechs Adenovirus-Zelllinien von Sophie Gaubert (Experimentelle Pädiatrie, Charité) generiert.

3.2.7 Kryokonservierung von Spenderzellen

Die Zellen wurden auf 4 °C gekühlt und dann pelletiert. Nach 30 min Kühlung auf Eis wurden die Zellen in kaltem Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO, 4 °C) aufgenommen. In die, bei 4 °C vorgekühlten, Kryoröhrchen wurden 1,6 ml der Zellsuspension aliquotiert, sodass die absolute Zellzahl bis 25×10^6 Zellen pro Röhrchen betrug. Die Kryoröhrchen wurden mit Hilfe einer temperaturkontrollierten Einfrierbox, gefüllt mit Iso-Propylalkohol, um 1 °C je Minute auf -80 °C abgekühlt und anschließend zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Am Tag der TCR-V β -Färbung wurden die Zellen aus dem Stickstofftank genommen und für den Transport auf Eis gelagert, um dann direkt in das 37 °C warme Wasserbad überführt zu werden. Danach wurden die Zellen in Röhrchen mit vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt und ihre Zellzahl mit Hilfe von Trypanblau bestimmt.

3.3 Durchflusszytometrie

3.3.1 Durchflusszytometrische Färbung

Zu Beginn der Experimente wurden verschiedene Antikörper, Antikörpertitrations, Färbezeiten und Temperaturbedingungen getestet. Um den spektralen Spillover und die Variabilität zwischen den Messungen zu minimieren, wurde jede Färbung durch eine spektrale Kompensation mit BD Kompensationsbeads vorbereitet. Die folgenden Bedingungen erwiesen sich als ideal:

Für jeden Probanden wurden neun Röhrchen gefärbt, jedes mit mindestens einer Million Zellen. Die Färbung dauerte 30 min, wurde abgedunkelt und bei 4 °C gekühlt durchgeführt. In jedem der Röhrchen befanden sich die Antikörper zur Bestimmung der Subpopulationen von T-Zellen: Pacific Blue-konjugierter CCR7 (selbst-konjugiert: 1 µl Goat-anti-Mouse IgG2a + 1 µl Streptavidin + 1 µl anti-Human CCR7), 6 µl PerCp-konjugierter CD3, 2,8 µl Pacific Orange-konjugierter CD8, 1,5 µl ECD-konjugierter CD45RA oder 3 µl PE Texas Red-konjugierter CD45RA, 3 µl PeCy7-konjugierter CD4 oder 3 µl Pacific Blue-konjugierter CD4, 1 µl Alexa 700-konjugierter CD27, 2,5 µl Alexa 647-konjugierter CD57. Für die TCR-Vβ-Färbung wurden 8 µl der 24 FITC oder PE einfach-konjugierte oder doppelt-konjugierte monoklonale Antikörper genutzt.

Zur Bestimmung des TCR-Vβ-Repertoires wurde das IO Test Beta Mark Kit von Beckman Coulter verwendet. Das Kit besteht aus acht verschiedenen Antikörperkombinationen, welche jeweils drei TCR-Vβ-Familien beinhalten. Die Antikörper der einzelnen Familien sind jeweils an die Fluoreszenzfarbstoffe FITC oder PE oder FITC/PE gekoppelt. Zusätzlich wurde die Vβ 6.7 Familie mit 4 µl eines FITC-konjugierten Antikörpers gefärbt. Nach zweifacher Waschung wurde die Messung am Durchflusszytometer LSR2 durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in 200 µl Durchflusszytometrie-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden während der gesamten Prozedur gekühlt und möglichst wenig dem Licht ausgesetzt. Abbildung 4 zeigt eine Beispielfärbung.

Zur Färbung der kryokonservierten T-Zellen der viralen Zellkulturen wurde außerdem 4 µl des APC Cy7-konjugierten Live/Dead fixable Kit genutzt.

FACS-Gating-Strategie

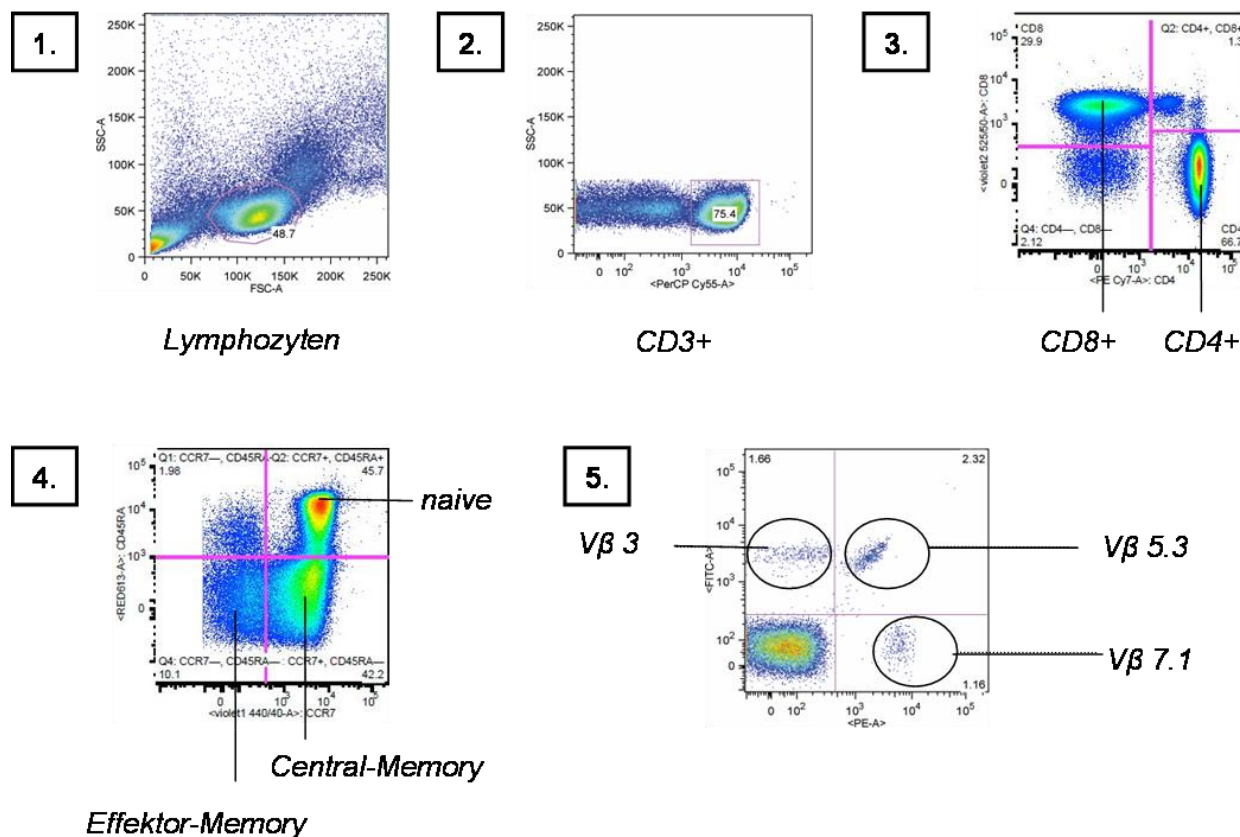


Abbildung 4: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Messung mit Beispielfärbung

Es wurde das Blut von 66 Probanden zwischen 0 und 72 Jahren analysiert. 25 TCR-Vβ-Familien und verschiedene Oberflächenmoleküle wurden in neun verschiedenen Röhrcchen gefärbt. Mit FlowJo 8.8.3 wurden die Daten wie folgt ausgewertet: Zuerst wurden bei den Lymphozyten die T-Zellmarker CD3 und CD4 oder CD8 gated. Diese wurden dann bei den verschiedenen T-Zell-Subpopulationen untersucht. Das TCR-Vβ-Repertoire von CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen und ihren Subpopulationen wurde bestimmt.

3.3.2 Durchflusszytometrische Messung

Das 3-Laser, 10-Kanal Durchflusszytometer LSR2 wurde für die Messungen genutzt. Für die Kompensation wurden Kompensationsbeads und die automatische Kompensation der DIVA-Software genutzt. Jede Messung wurde mit der maximalen Anzahl möglicher Events, mindestens jedoch mit 10^5 Zellen im Lymphozytengate, durchgeführt.

3.3.3 Datenanalyse

Die weitere Kompensation und die Datenanalyse wurden mit FlowJo 8.8.3 (Free Star, USA) durchgeführt. Um das TCR-Vβ-Repertoire bei CD3+/CD4+ und CD3+/CD8+ Zellpopulationen

und ihren individuellen Subpopulationen zu charakterisieren, wurde die in Abbildung 5 dargestellte Gating-Strategie gewählt. Dabei wurden zu Beginn die Lymphozyten mit Hilfe von Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht gated. Bei den zuvor eingefrorenen Zellen der Zelllinien wurde dann zusätzlich noch mit einem Live/Dead-Farbstoff sichergestellt, dass alle nicht durch die Waschschriffe beseitigten, toten Zellen ausgeschlossen wurden. Danach wurden die Lymphozyten noch einmal anhand von CD3 selektiert. Daraufhin wurde zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten unterschieden. Um die TCR-V β -Familien zu charakterisieren, wurden weiterhin FITC-, PE- oder FITC/PE-positive Events in jedem Röhrchen gated und der prozentuale Anteil jeder TCR-V β -Familie errechnet. Für die weitere Analyse wurden sowohl bei CD3⁺/CD4⁺ als auch bei CD3⁺/CD8⁺ Lymphozyten weitere Subpopulationen anhand der Oberflächenmoleküle CD45RA, CD27, CCR7 und CD57 charakterisiert. Auch bei diesen Subpopulationen wurden die TCR-V β -Familien bestimmt. Um statistische Kohärenz zu gewährleisten und die Detektion von Pseudoklonalitäten durch zu geringe Zellzahlen zu vermeiden, wurden für die TCR-V β -Familien-Analyse nur Subpopulationen mit einem Mittelwert von mindestens 2000 Zellen genutzt.

naive	Memory		Effektor
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD27 ⁺	CD45RA ⁻	CD27 ⁺	CD45RA ⁺ CD27 ⁻
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	Central-Memory	Effektor-Memory	CD45RA ⁺ CCR7 ⁻
CD45RA ⁺ CD27 ⁺	CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD27 ⁺	CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD27 ⁺	CD27 ⁻
	CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	CD57 ⁺

Abbildung 5: Festlegung von verschiedenen CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen

Die Nutzung verschiedener Kombinationen von Oberflächenmolekülen erlaubt die Identifikation fast aller T-Zell-Subpopulationen. In dieser Studie wurden die subpopulationendefinierenden Oberflächenmoleküle CD45RA, CCR7, CD27 und CD57 genutzt. Durch sie war eine Unterteilung in naive, Memory-, Central-Memory-, Effektor-Memory- und Effektor-T-Zellen möglich.

3.4 TCR-Single-Kolonie-Sequenzierung

Herausstechende, mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelte, pathologische TCR-V β -Expansionen wurden für die weitere molekulare Analyse selektiert. Die Sequenzierung wurde in den folgenden Schritten durchgeführt [Abbildung 6]:

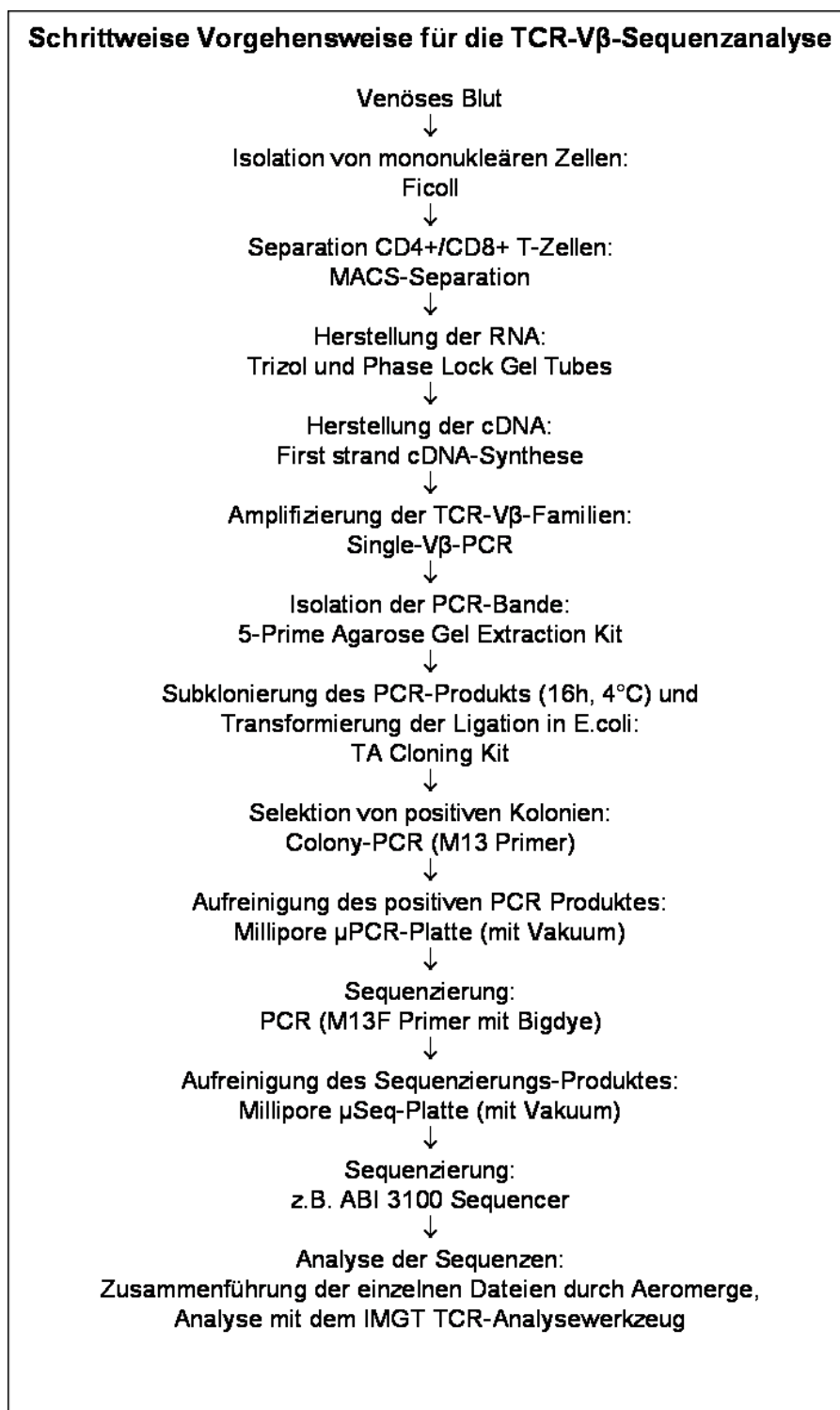


Abbildung 6: Die einzelnen Schritte der TCR-Sequenzierung

3.4.1 Separation von CD4+ und CD8+ T-Zellen und RNA-Isolierung

Es wurden die T-Zellen gesunder Probanden vor und nach Kultur genutzt. In einem Magnetfeld wurden die Zellen in CD4-/CD8+ und CD4+/CD8- Fraktionen getrennt. Im Weiteren wurde RNA extrahiert. Dafür wurden je 1×10^7 Zellen mit 1 ml Trizol für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Phase Lock Gel Röhrchen durch 2 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit vorbereitet. Anschließend wurde in jedes Röhrchen 1 ml Trizol/RNA-Gemisch und 200 μ l Chloroform gefüllt, beides vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trennung der beiden Phasen wurde durch Zentrifugation bei 12000 g für 5 min erreicht. Die obere Phase mit der RNA wurde in 500 μ l Isopropanol überführt und nach 10 min Inkubation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Dadurch setzte sich die RNA ab. Anschließend wurde die RNA im Pellet mit 75 %-igem Ethanol gereinigt und dann bei 55 bis 60 °C in 20 μ l nukleasefreiem Wasser aufgelöst.

3.4.2 Herstellung der cDNA

Aus der RNA wurde mit dem SuperScript III RT Kit von Invitrogen nach Herstellerinformation cDNA synthetisiert.

3.4.3 Amplifizierung der TCR-V β -Familien

Die cDNA wurde mit einem nicht-gelabelten *Constant-Region antisense Primer* und 22 verschiedenen TCR-V β -Familien-spezifischen *sense Primern* amplifiziert [41]. Dabei waren, anders als bei der Durchflusszytometrie, V β 6, V β 15 und V β 24 inbegriffen. Jedoch gibt es keine Primer für die Pseudogene V β 10 und V β 19.

Der PCR-Mastermix setzte sich wie folgt zusammen: 2,5 μ l 10 x PCR-Puffer mit Magnesiumazetat (15 mM), 2 μ l Deoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) (2,5 mM), 2 μ l nicht-gelabelter *Constant-Region antisense Primer* (3 μ M), 2 μ l des 3 mM *sense TCR-V β Primer* (3 μ M), 0,25 μ l Taq (5 U/ μ l; Eppendorf), 1,5 bis 2 μ l cDNA wurden mit nukleasefreiem Wasser zu einem Volumen von 25 μ l aufgefüllt.

In einem Mastercycler (Eppendorf) wurde dann die Reaktion durchgeführt: Nach der initialen Denaturierung bei 95 °C für 5 min wurden die Touch-down-Cycles durchgeführt (Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden; Annealing bei 63 °C, -1 °C pro Schritt, für 40 Sekunden und Extension bei 72 °C für 50 Sekunden). Dann liefen die 20 finalen PCR-Zyklen (30 Sekunden bei 95 °C, 40 Sekunden bei 54 °C, 50 Sekunden bei 72 °C) [23].

3.4.4 Klonierung und Transformation des PCR-Produktes

Die PCR-Produkte wurden mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Von dem gereinigten Produkt wurden je 4 µl über Nacht bei 14 °C mit dem TA Cloning Vector pCR2.1 gebunden. Am darauffolgenden Tag wurde die Hitzeschock-Transformierung in TOP10 E. coli durchgeführt. Anschließend wurden die E. coli für 45 min in 250 µl SOC-Medium bei 37 °C inkubiert und auf Agarose-Platten (50 µg/ml Ampicillin, 40 µl x-Gal) verteilt. Bis zum nächsten Morgen wuchsen die Kolonien bei 37 °C im Inkubator [23].

3.4.5 Kolonie-PCR

Mindestens 20 einzelne x-Gal-positive Kolonien, welche verschiedene Klonotypen repräsentieren, wurden im Weiteren für die Sequenzierung vorbereitet. Für die Reaktion wurden 2 µl M13R *Primer*, 3 µl PCR-Puffer, 1 µl MgCl₂, 2 µl dNTP (2,5 mM) und 0,1 µl Taq-Polymerase mit nukleasefreiem Wasser zu einem Volumen von 30 µl aufgefüllt. Dabei wurde die Kolonie PCR im Mastercycler durchgeführt (5 min Denaturierung bei 94 °C, 19 PCR-Zyklen: 30 Sekunden bei 94 °C, 30 Sekunden bei 55 °C und 40 Sekunden bei 72 °C) [23].

3.4.6 Aufreinigung und Sequenzierung

Zur Aufreinigung wurde das PCR-Produkt mit 80 µl DNA-Suspensionspuffer gemischt und unter Vakuumsog getrocknet. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die DNA mit 40 µl nukleasefreiem Wasser unter Schütteln gelöst (10 min bei Stufe 8). Davon wurden dann 10 µl mit je 1 µl M13 *Primer* zum *Genomics Core* der *Cleveland Clinic* zur Sequenzierung geschickt.

3.4.7 Analyse der Sequenzen

Innerhalb des Rahmens der CDR3-Aminosäuresequenz wurden die Sequenzen mit dem V-Quest Algorithmus der Firma International Immunogenetics Information System (<http://imgt.cines.fr>) analysiert. Die Häufigkeit, mit der ein bestimmter Klonotyp auftrat, wurde aus dem prozentualen Anteil der identischen Sequenzen berechnet.

3.5 Statistische Analyse

Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel und SPSS 16.0 für Windows (SPSS Software GmbH, Deutschland) durchgeführt. Zuerst wurden die Mittelwerte der TCR-V β -Expansionen plus zwei Standardabweichungen (SD) für jede TCR-V β -Familie bei CD4+ und CD8+ T-Zellen und allen Subpopulationen berechnet. Damit wurde die *Expansionszahl* als Anzahl der TCR-V β -Familien bei einem Individuum definiert, welche die Referenzwerte der jeweiligen TCR-V β -Familie (Mittelwert + 2 SD) übertrafen. Zur Veranschaulichung hier ein Beispiel: Der Referenzwert (Mittelwert + 2 SD) der V β 2 Familie bei CD4+ Lymphozyten beträgt 8,42 % + 3,94 %. Jeder V β 2 Wert größer 12,36 % gilt somit als Expansion.

Wenn eine TCR-V β -Familie eine Expansion, wie gerade beschrieben, zeigte, wurde außerdem der *Expansionsfaktor* berechnet. Dieser Expansionsfaktor wurde genutzt, um die Größe der Expansionen ins Verhältnis zum Referenzwert der TCR-V β -Familie zu stellen. Dafür wurde der Wert der Expansion durch den Mittelwert des Referenzwertes geteilt. Es wird für das genannte Beispiel eine Expansion der V β 2 Familie bei CD4+ von 16,84 % angenommen: Damit übersteigt der gemessene Wert den Referenzwert von 12,36 %. Der Mittelwert der Vergleichsgruppe ist nur halb so groß (8,42 %). Folglich beträgt der Expansionsfaktor 2,0.

Unterschiede zwischen Expansionswerten und Expansionsfaktoren der verschiedenen CD4+ und CD8+ Subpopulationen wurden mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test für gepaarte Werte analysiert. Für die 25 verschiedenen TCR-V β -Familien wurde die Korrektur für multiple Endpunkte mit Bonferroni-Test durchgeführt. Weiterhin wurde zur Untersuchung des Einflusses der CMV-Serologie auf das TCR-V β -Repertoire die Varianzanalyse genutzt. Bei allen Berechnungen wurde ein p-Wert kleiner 0,05 als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Messung und Berechnung der TCR-V β -Familien-Referenzwerte bei gesunden Probanden

4.1.1 Zusammenstellung des Antikörperpanels für eine optimale Gating-Strategie

Basierend auf den Erfahrungen bei der Analyse des TCR-V β -Repertoires bei Leukämien und weiteren Erkrankungen [23, 27, 42], wurde eine Strategie zur simultanen Erfassung von 12 Parametern und 10 Oberflächenmolekülen mit polychromatischer Durchflusszytometrie entwickelt. Hierfür wurden CD3, CD8, CD4, CD45RA, CD27, CCR7, CD57 und verschiedene TCR-V β -Antikörper genutzt.

Diese Vorgehensweise erlaubte mit Hilfe der Anwendung der drei Oberflächenmoleküle CD45RA, CD27 und CCR7 theoretisch die Bestimmung von 26 verschiedenen T-Zell-Subpopulationen. Für die Durchführung dieser Studie wurde die Anzahl der charakterisierten Populationen auf die elf in Abbildung 3 dargestellten begrenzt. Darunter befanden sich drei Definitionen für naive, fünf für Memory- und drei für Effektor-T-Zellen. Um die Effektor-T-Zellen exakt zu erfassen, wurde CD57 zum Panel hinzugefügt. Die Eignung der hier dargestellten Marker wurde bereits in mehreren Publikationen experimentell bestätigt [4-17].

4.1.2 Verteilung der T-Zell-Subpopulationen bei gesunden Probanden

Abbildung 7 zeigt die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen, welche wie folgt beschrieben werden können: Um Pseudoklonalitäten durch zu geringe Zellzahlen zu vermeiden, beschränkte sich die Analyse auf jene Zellpopulationen mit den höchsten Zellzahlen, d. h. CD45RA+/CD27+ naive (CD4+ 56,4 %; CD8+ 53,9 %), CD45RA-/CD27+ Memory- (CD4+ 36,2 %; CD8+ 24,9 %), CD45RA-/CCR7+ Central-Memory- (CD4+ 30,8 %, CD8+ 8,2 %), CD45RA-/CCR7- Effektor-Memory-T-Zellen (CD4+ 10,4 %; CD8+ 19,5 %).

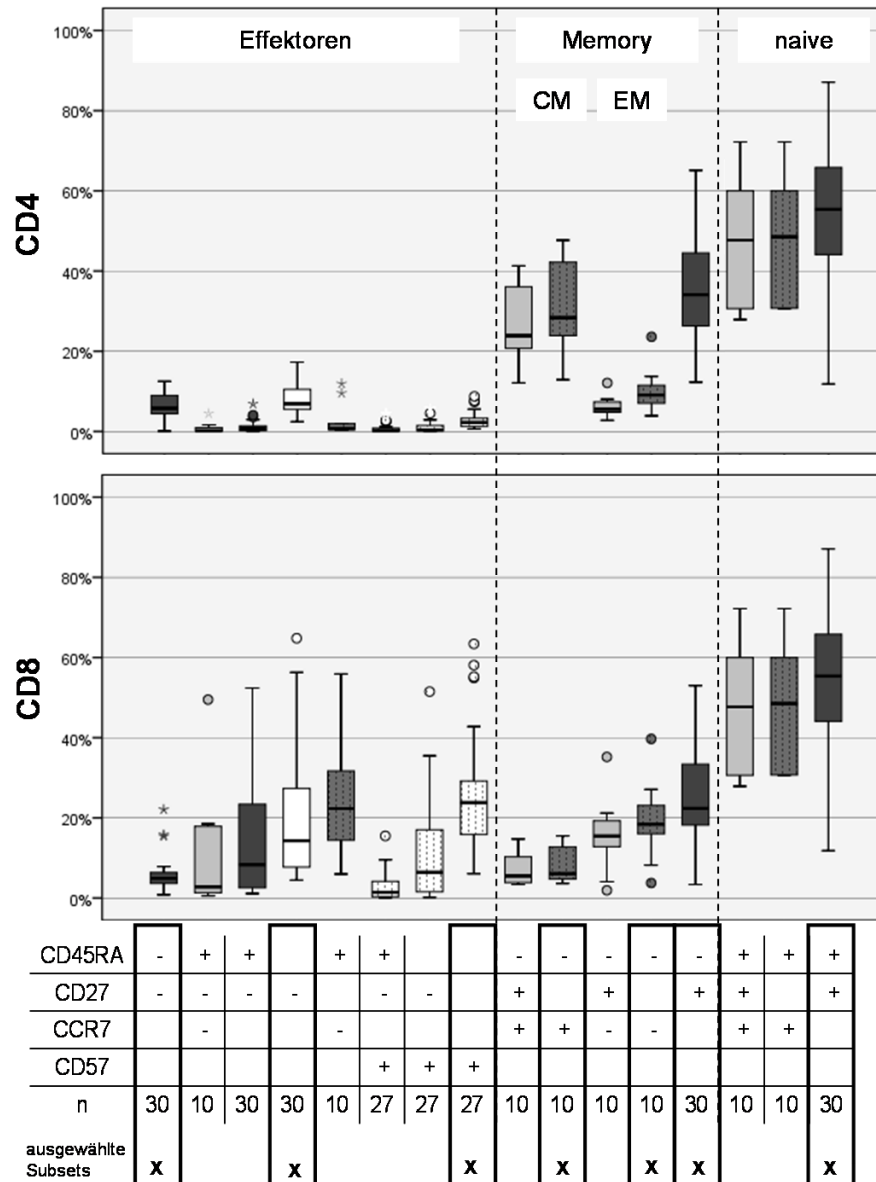


Abbildung 7: Vergleich der Subpopulationen-Verteilung mit Antikörpern für verschiedene Oberflächenmoleküle und die Wahl der geeigneten Kombination

In den Boxplots ist der prozentuale Anteil der entsprechenden Subpopulation auf dem CD3+/CD4+ oder CD3+/CD8+ Lymphozyten-Gate zu sehen. Das gleiche Muster der Kästen veranschaulicht, dass für die entsprechenden Subpopulationen die gleiche Kombination an Oberflächenmolekülen genutzt wurde (genaue Informationen dazu in der Tabelle unter der Abbildung). CM: Central-Memory-T-Zellen; EM: Effektor-Memory-T-Zellen, n: Anzahl der analysierten gesunden Probanden. Leere Felder in der Tabelle zeigen nicht genutzte Oberflächenmoleküle.

Bei der Untersuchung der CD45RA+/CD27- Effektor-T-Zellen waren ausreichende Zellzahlen nur bei CD8+ (15,2 %), jedoch nur zu geringem Anteil bei CD4+ (1,2 %) T-Zellen zu finden. Der in Abbildung 8 dargestellte Vergleich illustriert das Fehlen der Effektor-T-Zell-Subpopulation bei CD4+ T-Zellen. Aus diesem Grund wurden die CD4+/CD45RA+/CD27-

Effektor-T-Zellen von der weiteren Analyse ausgeschlossen und andere Marker zur Definition der Effektor-T-Zellen genutzt. Entsprechend wurden die Effektor-T-Zellen im Weiteren mit dem Marker CD27- dargestellt (CD4+ 7,6 %; CD8+ 21 %). Um die Aussagen über das TCR-V β -Repertoire bei Effektor-T-Zellen zu verifizieren, wurde ein weiterer Marker hinzugefügt. Mit CD57 im Panel konnten höhere Werte der CD57+ Effektor-T-Zellen sowohl bei CD4+ (2,80 %) als auch bei CD8+ (26,24 %) T-Zellen gefunden werden. Die genauen Werte der Zellpopulationen sind in den Boxplots von Abbildung 7 zu sehen.

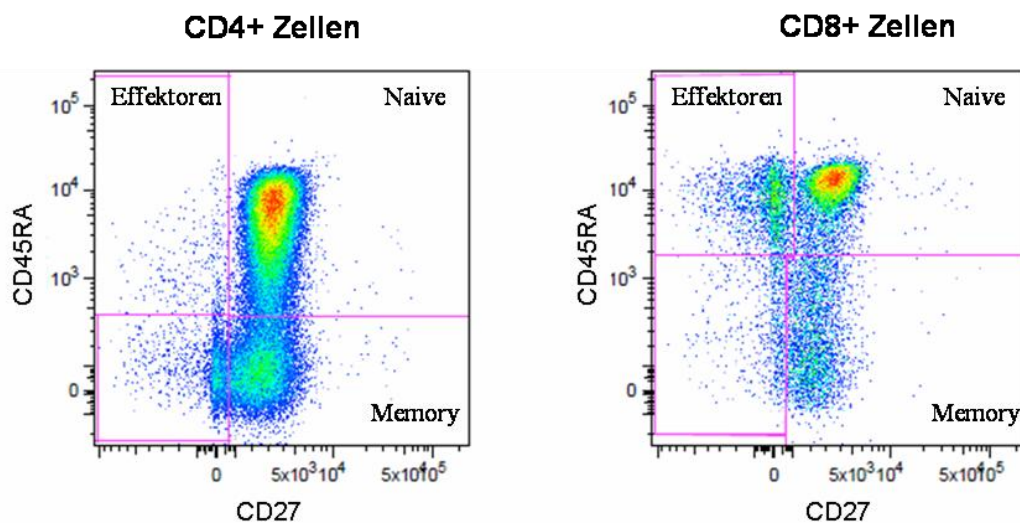


Abbildung 8: Unterschiede bei den Effektor-T-Zell-Subpopulationen bei CD4+ und CD8+ T-Zellen

Hier wird die Subpopulationen-Verteilung bei CD4+ und CD8+ T-Zellen anhand einer Beispielfärbung gegenübergestellt. Es ist zu sehen, dass es kaum CD45RA+/CD27- Effektor-T-Zellen bei CD4+ und kaum CD27-/CD45RA- T-Zellen bei CD8+ T-Zellen gab. Diese Beobachtung traf ebenso für die anderen Probanden zu, wie die prozentuale Verteilung der Subpopulationen in Abbildung 7 illustriert.

4.1.3 Bestimmung des TCR-V β -Repertoires bei CD4+ und CD8+ T-Zellen

Weiterhin wurde das TCR-V β -Repertoire untersucht. Zuerst wurden separat für CD4+ und CD8+ T-Zellen Referenzwerte für die weitere Analyse errechnet. Die Werte wurden bei den PBMC von 66 Probanden gemessen. Es fanden sich die folgenden Charakteristika: Bei den Durchschnittswerten des TCR-V β -Repertoires zeigten CD4+ T-Zellen kleinere Standardabweichungen als CD8+ T-Zellen. Das entspricht den Beckmann Coulter Referenzwerten und Angaben in der Literatur [43].

Tabelle 1: TCR-V β -Familien-Verteilung bei CD4+ und CD8+ T-Zellen

* nach der Nomenklatur von Wei et al [44], ^ nach der IMGT Nomenklatur (imgt.cines.fr)

p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet, n. s. nicht signifikant, sig. signifikant

Mit Hilfe der Formel Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen wurden Referenzwerte für jede TCR-V β -Familie berechnet, sodass im Folgenden Expansionszahlen und Expansionsfaktor berechnet werden konnten (wie in Abbildungen 7, 9, 10 gezeigt)

V β * (^)	<i>CD3</i>				<i>CD4</i>				<i>CD8</i>				<i>CD4 + CD8</i>	
	N	MW	SD	MW +2SD	N	MW	SD	MW +2SD	N	MW	SD	MW +2SD	p-Wert	adjust. p-Wert
V β 1 (TRBV13)	31	3,45	1,69	6,83	65	3,12	0,86	4,84	66	4,54	2,85	10,24	0,000	sig.
V β 2 (TRBV20-1)	31	6,77	2,15	11,07	65	8,42	1,97	12,36	66	5,00	2,97	10,94	0,000	sig.
V β 3 (TRBV28)	31	3,86	2,13	8,12	65	4,39	2,26	8,91	66	4,18	3,11	10,4	0,427	n. s.
V β 4 (TRBV29-1)	31	1,74	0,81	3,36	65	1,72	0,84	3,40	66	2,33	2,72	7,77	0,326	n. s.
V β 5.1 (TRBV5-1)	31	4,42	1,51	7,44	65	5,99	1,55	9,09	66	1,6	1,38	4,36	0,000	sig.
V β 5.2 (TRBV5-6)	31	1,21	1,03	3,27	65	1,07	0,34	1,75	66	2,26	2,36	6,98	0,405	n. s.
V β 5.3 (TRBV5-5)	31	0,97	0,61	2,19	65	0,95	0,36	1,67	66	1,00	0,66	2,32	0,000	sig.
V β 7.1 (TRBV4-1. TRBV4-2. TRBV4-3)	31	1,82	0,56	2,94	65	1,63	0,63	2,89	66	2,11	1,83	5,77	0,000	sig.
V β 7.2 (TRBV4-3)	31	1,41	1,26	3,93	65	1,11	0,69	2,49	66	2,77	1,52	5,81	0,000	sig.
V β 8 (TRBV12-3. TRBV12-4)	31	4,06	1,42	6,90	65	4,93	1,86	8,65	66	3,14	2,51	8,16	0,000	sig.
V β 9 (TRBV3-1)	31	2,35	0,83	4,01	65	2,8	1,03	4,86	66	1,89	1,31	4,51	0,000	sig.
V β 11 (TRBV25-1)	31	0,97	0,49	1,95	65	0,86	0,64	2,14	66	0,99	1,28	3,55	0,433	n.s.
V β 12 (TRBV10-3)	31	1,45	0,49	2,43	65	1,98	0,82	3,62	66	1,48	1,26	4,00	0,002	sig.
V β 13.1 (TRBV6-5. TRBV6-6. TRBV6-9)	31	3,82	0,93	5,68	65	4,11	1,07	6,25	66	3,38	1,78	6,94	0,007	n.s.
V β 13.2 (TRBV6-2)	31	2,72	1,20	5,12	65	2,50	0,90	4,30	66	3,07	1,79	6,65	0,003	sig.
V β 13.6 (TRBV6-6)	31	1,55	0,39	2,33	65	1,71	0,48	2,67	66	1,17	0,65	2,47	0,000	sig.
V β 14 (TRBV27)	31	2,92	0,88	4,68	65	2,61	0,79	4,19	66	4,99	2,13	9,25	0,000	sig.
V β 16 (TRBV14)	31	1,31	1,37	4,05	65	1,08	0,52	2,12	66	2,24	3,45	9,14	0,013	sig.
V β 17 (TRBV19)	31	4,75	1,12	6,99	65	5,21	1,20	7,61	66	4,84	3,81	12,46	0,473	n. s.
V β 18 (TRBV18)	31	0,83	0,48	1,79	65	1,05	0,46	1,97	66	0,87	1,49	3,85	0,345	n. s.
V β 20 (TRBV30)	31	2,41	0,87	4,15	65	2,88	1,34	5,56	66	2,19	1,72	5,63	0,001	sig.
V β 21.3 (TRBV11-2)	31	2,08	0,82	3,72	65	2,41	1,22	4,85	66	3,01	2,11	7,23	0,014	n. s.
V β 22 (TRBV2)	31	3,17	1,10	5,37	65	3,64	1,15	5,94	66	2,74	1,91	6,56	0,000	sig.
V β 23 (TRBV13)	31	1,07	0,88	2,83	65	0,4	0,17	0,74	66	2,15	1,84	5,83	0,000	sig.
V β 6.7	31	3,41	1,13	5,67	56	4,68	1,40	7,48	56	1,73	1,22	4,17	0,000	sig.

Für 23 der 25 TCR-V β -Familien zeigten sich zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen signifikante Unterschiede. Daher wurde im Folgenden eine separate Analyse der beiden Zellpopulationen durchgeführt. CD4+ T-Zellen zeigten höhere Werte bei den Familien V β 2, V β 3, V β 5.1, V β 8, V β 9, V β 12, V β 13.1, V β 13.6, V β 17, V β 18, V β 20, V β 22, V β 6.7, hingegen CD8+ bei den Familien V β 1, V β 4, V β 5.2, V β 5.3, V β 7.1, V β 7.2, V β 11, V β 13.2, V β 14, V β 16, V β 21.3 und V β 23 [Tabelle 1].

In der weiteren Analyse lag der Fokus auf den klonalen Expansionen innerhalb der Versuchsgruppe. Eine signifikante klonale Expansion entsprach einer Überschreitung des Mittelwertes um zwei Standardabweichungen, wie bereits in der Literatur beschrieben [43, 45].

Außerdem wurden die klonalen Expansionen innerhalb der Kohorte genauer untersucht. Die *Expansionszahl* (vergleiche Kapitel 3.6) wurde als Anzahl der TCR-V β -Familien innerhalb eines Individuums definiert, welche die Referenzwerte der jeweiligen TCR-V β -Familie (Mittelwert plus zwei Standardabweichungen) übertrafen. Dies wurde bereits früher so beschrieben [43, 45]. Wenn eine TCR-V β -Familie eine Expansion, wie gerade beschrieben, aufwies, wurde außerdem den Expansionsfaktor berechnet. Dieser Expansionsfaktor zeigt die Größe der Expansionen im Verhältnis zum Referenzwert der TCR-V β -Familie. Dafür wurde der Wert der Expansion durch den Mittelwert des Referenzwertes geteilt.

Es gab signifikant ($p < 1 \cdot 10^{-4}$) höhere Expansionszahlen bei CD8+ (Median = 1,0) als bei CD4+ (Median = 0) T-Zellen. Dementsprechend war auch der Expansionsfaktor bei CD8+ (Median = Faktor 5,7) signifikant ($p > 5 \cdot 10^{-7}$) höher als bei CD4+ (Median = Faktor 0) [Abbildung 9]. Diese Tatsache steht im Einklang mit früheren Ergebnissen [22, 43, 45].

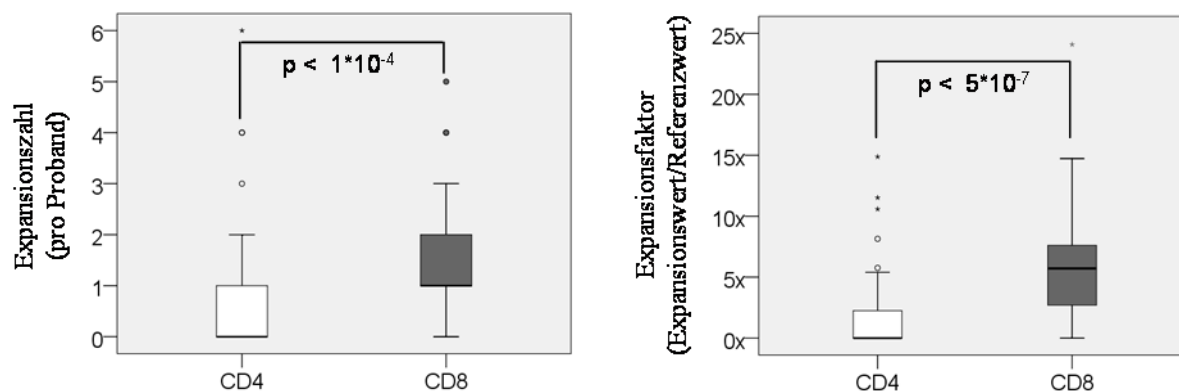


Abbildung 9: Bei CD8+ T-Zellen waren signifikant höhere Expansionszahlen und Expansionsfaktoren als bei CD4+ T-Zellen zu sehen.

Die Expansionszahl (siehe Methoden Kapitel 3.5) wurde als Anzahl der TCR-V β -Familien innerhalb eines Individuums definiert, welche die Referenzwerte der jeweiligen TCR-V β -Familie (Mittelwert + 2 SD) übertrifft. Der Expansionsfaktor wurde genutzt, um die Größe der Expansionen im Verhältnis zum Referenzwert der TCR-V β -Familien zu vergleichen. Dafür wurde der Wert der Expansion durch den Mittelwert des Referenzwertes geteilt. Es wurden Blutproben von 66 Probanden analysiert. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

4.1.4 Bestimmung des TCR-V β -Repertoires bei T-Zell-Subpopulationen – stark polarisiertes TCR-V β -Repertoire bei den Effektor-T-Zell-Subpopulationen

Ist der gesteigerte Anteil von antigenspezifischen T-Zellen unter Memory- und Effektor-Subpopulationen auch mit einem polarisierten TCR-V β -Repertoire assoziiert?

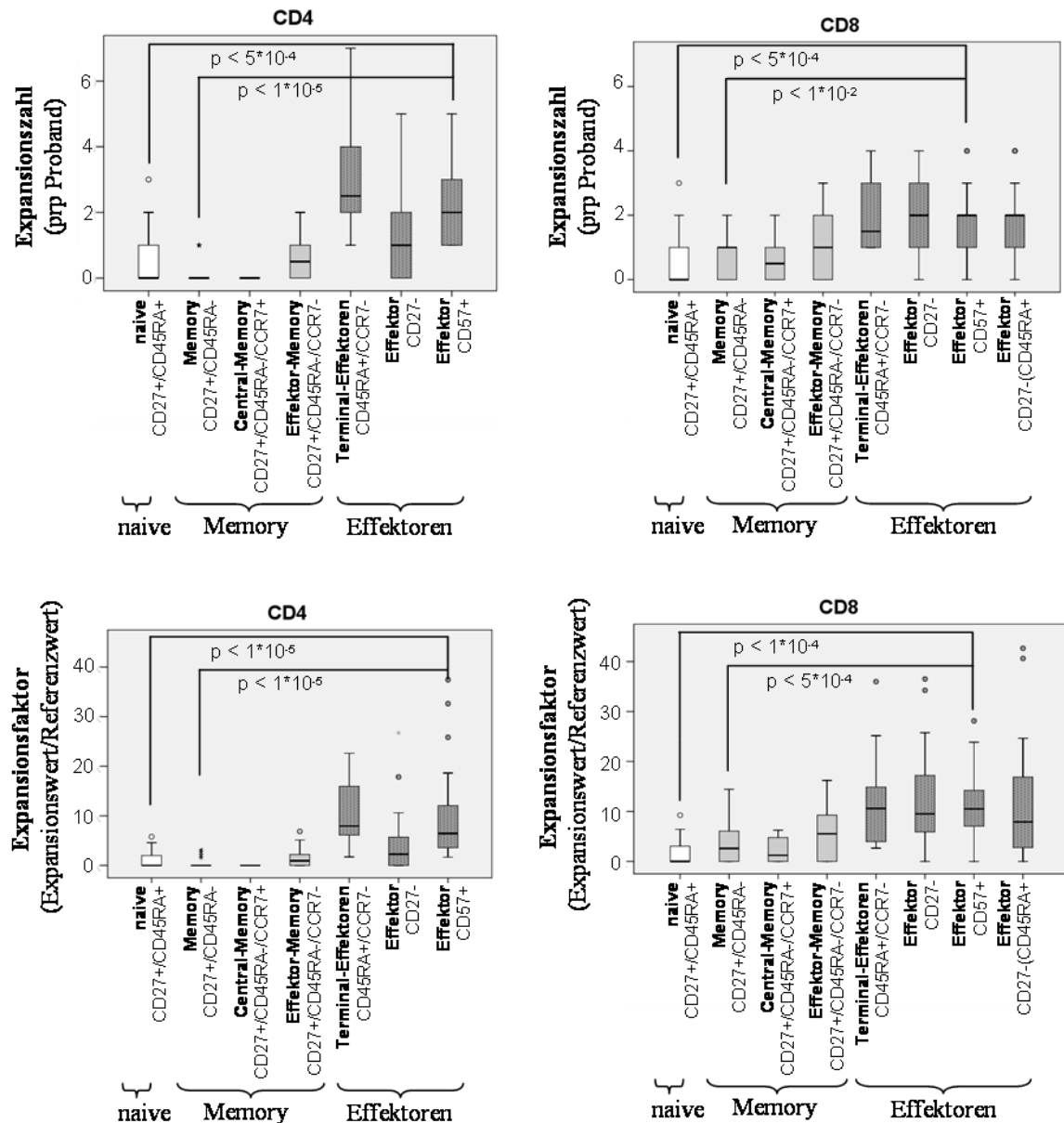


Abbildung 10: Die Effektor-T-Zellen haben mehr Expansionen und höhere Expansionswerte als naive oder Memory-T-Zellen.

Auf den oben abgebildeten Graphiken wurden die Expansionszahlen von verschiedenen Subpopulationen von CD4+ und CD8- T-Zellen gegenübergestellt. Es fielen die deutlich höheren Expansionswerte bei den Effektorzell-Subpopulationen auf. Diese Beobachtung konnte durch verschiedene Oberflächenmolekül-Kombinationen für Effektor-T-Zellen bestätigt werden. Die beiden unteren Graphiken zeigen die Expansionsfaktoren bei denselben Subpopulationen. Auch die dort dargestellten Werte der Expansionen sind bei Effektor-T-Zellen signifikant höher. In Beispielen werden p-Werte zur zweiseitigen Signifikanz gezeigt, welche mit dem Wilcoxon-Test berechnet wurden.

Basierend auf der zuvor beschriebenen Subpopulationen-Analyse, wurde der Einfluss der T-Zell-Differenzierung auf das TCR-V β -Repertoire untersucht. Um die Klonalität von naiven, Effektor- und Memory-T-Zellen zu untersuchen, wurde die in Abbildung 10 dargestellte Kombination von Oberflächenmolekülen genutzt, die sich in der Vergangenheit als sinnvollste erwiesen hatte. Wie in Abbildung 10 gezeigt, waren die Anzahl der Effektor-T-Zellen bei CD4⁺ (Median: [CD45RA⁺/CCR7⁻] = 2,5; [CD27⁻] = 1; [CD57⁺] = 2) und bei CD8⁺ (Median: [CD45RA⁺/CCR7⁻] = 1,5; [CD27⁻] = 2; [CD57⁺] = 2; [CD27⁻/CD45⁺] = 2) signifikant im Vergleich zu Memory- (Median: CD4⁺ = 0; CD8⁺ = 1) oder naiven T-Zellen (Median: CD4⁺ = 0; CD8⁺ = 0) erhöht. Interessanterweise fanden sich nur wenige (Median: CD8⁺ = 0,5) oder keine (Median: CD4⁺ = 0) Expansionen bei den langlebigen Central-Memory-T-Zellen. Entsprechend waren die Expansionsfaktoren der Effektor-T-Zellen bei CD4⁺ (Median: [CD45RA⁺/CCR7⁻] = Faktor 8,0; [CD27⁻] = Faktor 2,3; [CD57⁺] = Faktor 6,5) und CD8⁺ (Median: [CD45RA⁺/CCR7⁻] = Faktor 10,6; [CD27⁻] = Faktor 9,5; [CD57⁺] = Faktor 10,5; [CD27⁻/CD45RA⁺] = Faktor 7,9) T-Zellen zu sehen, welche ebenfalls höher waren als bei naiven (Median: CD4⁺ = Faktor 0; CD8⁺ = Faktor 0) und Memory-T-Zellen (Median: CD4⁺ = Faktor 0; CD8⁺ = Faktor 2,6). Beachtlich waren die hohen Expansionswerte, die bei den Effektor-T-Zellen auch bei Populationen mit großen Zellzahlen zu finden waren, z.B. CD8⁺/CD57⁺ hatten einen Mittelwert von 8353 detektierten Events.

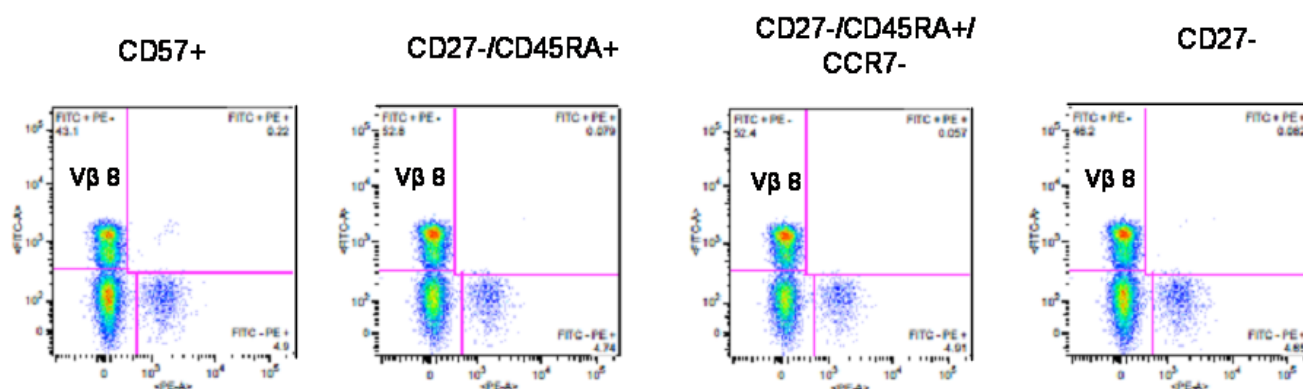


Abbildung 11: Beispiel 1 – die Expansion der TCR-V β -Familie 8 bei CD8⁺ T-Zellen konnte durch verschiedene Oberflächenmarker-Kombinationen für Effektor-T-Zellen bestätigt werden.

In der ersten Graphik links wird eine Expansion der FITC⁺/PE⁻ TCR-V β -Familie 8 bei CD8⁺ T-Zellen gezeigt. Daraus ergibt sich die Frage, ob bei diesem Probanden auch andere, in dieser Arbeit beschriebene Kombinationen von Oberflächenmarkern für Effektor-T-Zellen diese Expansion aufweisen. Wie die Graphik zeigt, kann die Expansion der TCR-V β -Familie 8 auch mit den Oberflächenmarkern CD27⁻/CD45RA⁺, CD27⁻/CD45RA⁺/CCR7⁻ und CD27⁻ nachgewiesen werden. Damit konnte ein Gating-Bias bei Expansionen einzelner T-Effektorzell-Subpopulationen aufgrund geringer Zellzahlen ausgeschlossen werden.

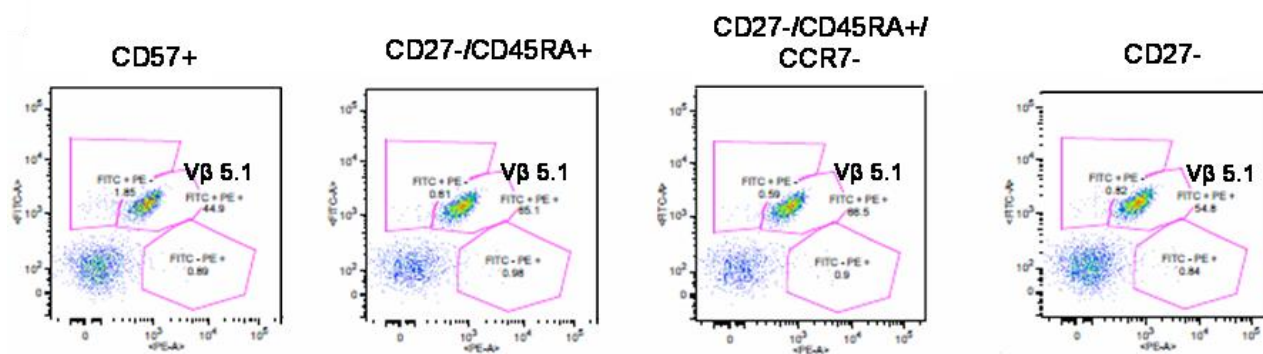


Abbildung 12: Beispiel 2 - auch die Expansion der TCR-V β -Familie 5.1 bei CD8⁺ T-Zellen konnte durch verschiedene Oberflächenmarker-Kombinationen für Effektor-T-Zellen bestätigt werden.

Analog zu Abbildung 11 wurde hier bei einem weiteren Probanden eine Expansion nachgewiesen. Diese befindet sich bei der FITC⁺/PE⁺ TCR-V β -Familie 5.1 der CD8⁺ T-Zellen. Zuerst wurde diese, wie links ersichtlich, bei CD57⁺ Effektor-T-Zellen gezeigt. Auch mit den Oberflächenmarker-Kombinationen CD27⁻/CD45RA⁺, CD27⁻/CD45RA⁺/CCR7⁻ und CD27⁻ wurde die Expansion nachgewiesen. Damit konnte ein Gating-Bias bei Expansionen einzelner T-Effektorzell-Subpopulationen aufgrund geringer Zellzahlen ausgeschlossen werden.

Außerdem wurde untersucht, ob diese Expansionen für verschiedene Effektor-T-Zellen sich bei den gleichen TCR-V β -Familien befinden. In der graphischen Analyse konnte bestätigt werden, dass die Expansionen bei allen verschiedenen definierten Effektor-T-Zell-Subpopulationen eine große Ähnlichkeit der expandierten TCR-V β -Familien zeigen. Zwei ausgewählte Beispiele von CD8⁺ der V β 8 und der V β 5.1-Familien veranschaulichen diese Beobachtung [Abbildungen 11 und 12].

4.1.5 Der CMV-Serostatus beeinflusst maßgeblich das TCR-V β -Repertoire bei CD8⁺ T-Zellen, nicht aber bei CD4⁺ Subpopulationen

Zusätzlich wurde der Einfluss anderer Parameter auf die TCR-V β -Verteilung untersucht. Bei der Datenanalyse war keine Einfluss von Alter oder Geschlecht auf die TCR-V β -Verteilung festzustellen. Anders war die Analyse des Einflusses der CMV-Serologie. Bei den CD8⁺ T-Zellen waren mehr Expansionen bei CMV-positiven (n = 14) als bei CMV-negativen (n = 7) Spendern vorhanden. Die CMV-positiven Probanden zeigten signifikant höhere Expansionsfaktoren (p < 0,05) als CMV-negative Probanden (Median: Faktor 6,0 vs. Faktor 1,5) [Abbildung 13].

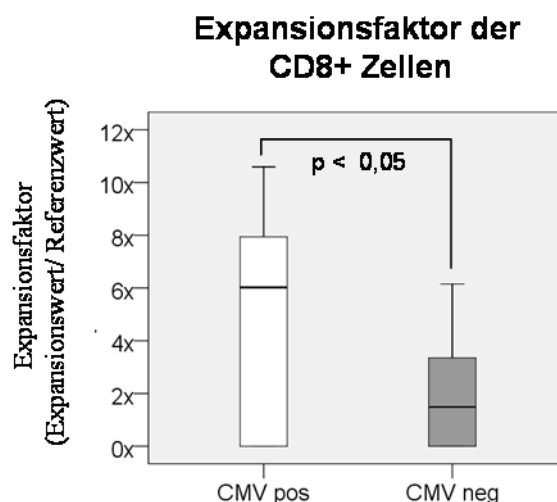


Abbildung 13: Bei CD8+ T-Zellen ist der Expansionsfaktor bei CMV-seropositiven Probanden signifikant höher als bei CMV-seronegativen Probanden

Anhand dieser Ergebnisse wurde statistisch signifikant ($p < 0,05$) gezeigt, dass gesunde CMV-positive Probanden höhere Expansionswerte bei CD8+ T-Zellen haben. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die CMV-Infektion, egal ob klinisch oder subklinisch verlaufend, eine besondere Rolle bei der Modulation des Immunsystems spielt. P-Werte wurden durch die Varianzanalyse berechnet.

CMV-seropositive und CMV-seronegative Probanden zeigten auch Unterschiede bei der Anzahl der Effektor-T-Zellen. Die Anzahl der CD8+ bei Effektor-T-Zell-Subpopulationen ist bei CMV-positive Probanden erhöht (Median: [CD45RA+/CCR7-] 24,1 % vs. 14,4 %; [CD27-] 17,9 % vs. 8,3 %; [CD57+] 21,6 % vs. 15,4 %; [CD27+/CCR7-] 12,4 % vs. 2,6 %). Aufgrund der kleinen Kohortenzahl waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant. Eine zusätzliche multivariate Analyse war zudem nicht möglich.

4.2 Analyse der T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie

4.2.1 Molekularbiologische und durchflusszytometrische Beurteilung von Klonalitäten bei T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie

Es wurden insgesamt 18 durch Peptidstimulation generierte lymphozytäre T-Zelllinien analysiert. Zuerst wurden diese mit der an PMBC etablierten TCR-V β -Durchflusszytometrie untersucht. Dabei waren 4,3 Expansionen pro T-Zelllinie bei CD4+ T-Zellen gegenüber 2,4 Expansionen bei CD8+ T-Zellen nachzuweisen. Im Wilcoxon-Test erwies sich dieser Unterschied als hoch signifikant [Abbildung 14]. Der Vergleich der Expansionen innerhalb der CD4+ und CD8+ T-Zellen der gleichen Spender zeigte, dass vor der Expansion kein Unterschied

zwischen den Populationen bestand. Beim Vergleich der Werte dieser Expansionen waren die CD8+ Expansionswerte (37,7 %) im Durchschnitt höher als die CD4+ Expansionswerte (9,2 %). Auch bei den Expansionswerten zeigte sich vor der Expansion kein Unterschied zwischen den CD4+ und CD8+ Zellen derselben Probanden.

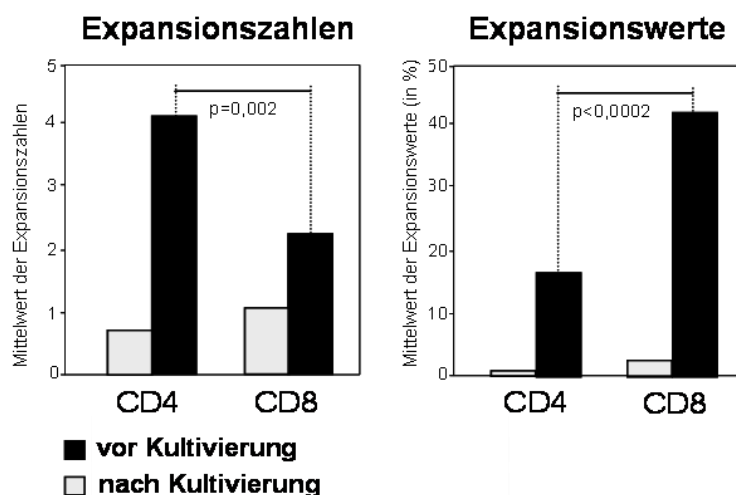


Abbildung 14: Die Anzahl der Expansionen und die Expansionswerte der T-Zellen vor und nach Viruspeptid-spezifischer Expansion zur adoptiven T-Zelltherapie

Im Durchschnitt waren 4,3 TCR-V β -Expansionen pro T-Zelllinie bei CD4+ T-Zellen zu sehen. Im Gegensatz dazu waren nur 2,4 Expansionen bei CD8+ T-Zellen zu sehen. Im Wilcoxon-Test war dieses Ergebnis hoch signifikant. Die Werte der einzelnen Expansionen waren bei CD8+ höher als bei CD4+ T-Zellen ($p < 0,002$). Vor Expansion gab es keinen Unterschied zwischen CD4+ und CD8+ Zelllinien.

TCR-V β -Familien, die große Expansionen aufwiesen, wurden bei den Zelllinien identifiziert und weiter mit Single-Kolonie-Sequenzierung untersucht. Wo dies möglich war, wurden Vergleichswerte vor der Expansion hinzugezogen, um die TCR-V β -Verteilung vor und nach der Expansion zu vergleichen.

Hierdurch konnten verschiedene immunodominante, d. h. redundante, Sequenzen bei den T-Zelllinien identifiziert werden. Beispiele hierfür sind in Tabelle 2 zu sehen: Bei der T-Zelllinie CMV3 resultierte aus der Peptidstimulation eine monoklonale Expansion von nur einem TCR. Diese war bei 22 der 24 sequenzierten Klonotypen nachzuweisen. Dieser Proband hatte diesen TCR-Klonotyp bereits vor der Expansion. Weiterhin wurde ein zweiter Klonotyp sowohl vor als auch nach Expansion detektiert. Dieser war jedoch bei der Zellkultur nur bei 1/22 Sequenzen

vertreten. Dieses Ergebnis unterstreicht die These der Rekrutierung von T-Zellklonen, hochaffin zum Viruspeptid, aus einem Pool von bereits vor Expansionen existierenden Memory-T-Zellen.

Tabelle 2: Die Sequenzen der Probanden vor und nach Expansion bei T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie

TCR-V β -FACS = TCR-V β -spezifische Durchflusszytometrie, Freq. = Anteil des sequenzierten Klonotypen
Monoklonal expandierte Klonotypen sind durch fett gedruckt markiert.

		T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie		vor Expansion	
	TCR-V β -FACS	Klonotyp-Sequenz	Freq.	Klonotyp-Sequenz	Freq.
CMV3	CD8+ V β 13.1: 95%	CASSYQTGAAAYGYTF	22/24	CASSYQTGAAAYGYTF	2/15
		CASSYSTGVIDGYTF	1/24	CASSYSTGVIDGYTF	1/15
		CASSFQTGTGVYGYTF	1/24	CASSYSLGLEPAYEQYF	1/15
				CASSYWVKMGPSYEQYF	1/15
				CASSYVAGGLSTDTQYF	1/15
				CASSYSSTGGEGNYGYTF	1/15
				CAGPPNNGVKQFF	1/15
				CASKSVEAFF	1/15
				CASSYWVKMGPSYEQYF	1/15
				CASTDGTAPFSGANVLTf	1/15
				CASSYLGNTTEAFF	1/15
				CASRLTGGGGTEAFF	1/15
				CASSYLSGRDTNSPLHF	1/15
				CATRDSYEQYF	1/15
EBV5	CD8+ V β 13.1: 63.7%	CASSSQGGNYGYTF	3/13	CASKGSTGFETQYF	1/6
		CASSPQGGFNYGYTF	2/13	CASSPFPQGADTQYF	1/6
		CASSPQGGNDGYTF	2/13	CASSYSGGYTF	1/6
		CASSPQGGIDGYTF	2/13	CASTGQGDGYTF	1/6
		CASSTQGGSDGYTF	1/13	CASSSTGTTGWDGYTF	1/6
		CASSTQGGGYGYTF	1/13	CASSYSIRGGNQPHF	1/6
		CASTLQGGNEQFF	1/13		
		CASSYSRGALKNIQYF	1/13		
CMVi	CD8+ V β 24: 66,2%	CATSRKRRSYNEQFF	14/14	CATSRDFSPGHQNTTEAFF	9/11
				CATSRVASPEELSF	1/11
				CATSRDSGVNTEAFF	1/11
CMVi	CD4+ V β 6: 12.2%	CASSFRTVSSYEQYF	14/16	CASSPLRANQPQHF	1/6
		CASSLAPGATNEKLFF	1/16	CASSLVANTDTQYF	1/6
		CRAPEDGSIEQFL	1/16	CASSLFRFTSGTYNEQFF	1/6
				CASSSGQGETQYF	1/6
				CASSTDRGQVNEQFF	1/6
				CASSQGI#NEQFF	1/6

In einem anderen Fall (EBV5) wurde die T-Zelllinie mit EBV-Peptiden stimuliert. Es zeigte sich eine deutliche Expansion von V β 13.1 bei der durchflusszytometrischen Analyse. Die entsprechenden Sequenzen von V β 13 zeigten auf den ersten Blick keine offensichtliche immunodominante Expansion. In diesem Fall war die Immunantwort eher oligoklonal und war durch wenige Effektor-T-Zellen erfolgt, welche gegen das gleiche Antigen gerichtet waren. Die Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass innerhalb der V β 13-Sequenzen viele hochgradig ähnliche Sequenzen zu finden waren.

Schließlich ist in Tabelle 2 die T-Zelllinie CMVi zu sehen. Verschiedene TCR-V β wurden bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sequenziert. Bei beiden Populationen fanden sich monoklonale Expansionen der Zelllinien. Jedoch zeigte sich bei CD4⁺ T-Zellen, bei der V β 24 Familie, bereits vor der Zellkultur eine monoklonale Expansion. Diese zeigte sich jedoch bei einem anderen Klonotyp, was für eine Infektion des Probanden zu diesem Zeitpunkt spricht, nicht jedoch bei der CMV Immunantwort relevant war.

4.2.2 Keine Korrelation zwischen TCR-Diversität und Subpopulationenanalyse

Weiterhin wurde der Einfluss der Verteilung der Subpopulationen auf die Klonalität untersucht. Abbildung 15 zeigt durchflusszytometrische Daten von drei verschiedenen T-Zelllinien. Bei diesen T-Zelllinien wurden auffallende Expansionen auf ihre Subpopulationen-Verteilung mit den Oberflächenmolekülen CD45RA und CD27 untersucht. Wie erwartet, waren die Verteilung der Subpopulationen und die Klonalität vor der Expansion innerhalb der Referenzwerte. Aufgrund der niedrigeren Zellzahl waren nur wenige Events bei den Boxplots der Subpopulationen vor Expansion zu sehen. Alle Zelllinien zeigten, wie erwartet, hohe Zahlen von naiven T-Zellen.

Während die Untersuchung der T-Zelllinien vor Expansion keine Unterschiede zeigte, waren nach der Expansion folgende Ergebnisse auffällig: T-Zellen verloren unter Zellkultur-Bedingungen ihre Oberflächenmoleküle CD45RA und CD27. So waren die CD45RA-/CD27- T-Zellen zu über 98 % bei allen vier TCR-V β -Familien zu dominant. Diese Verteilung der Subpopulationen war unabhängig von der Klonalität, denn es war keinen Unterschied bei der Subpopulationen-Verteilung zwischen der monoklonalen TCR-V β -Familie von T-Zelllinie CDV3 und der polyklonalen TCR-V β -Familie von CMVi zu sehen. Interessanterweise zeigte die T-Zelllinie EBV5 innerhalb der CD8⁺ T-Zellen 10,5 % Memory-T-Zellen, während die monoklonale T-Zelllinie CMV3 nur 0,67 % Memory-T-Zellen aufwies. Dadurch wurde gezeigt, dass die Memory-T-Zellantwort der T-Zelllinie CMV3 durch die nicht-expandierten TCR-V β -Familien des TCR-V β -Repertoires verursacht wird.

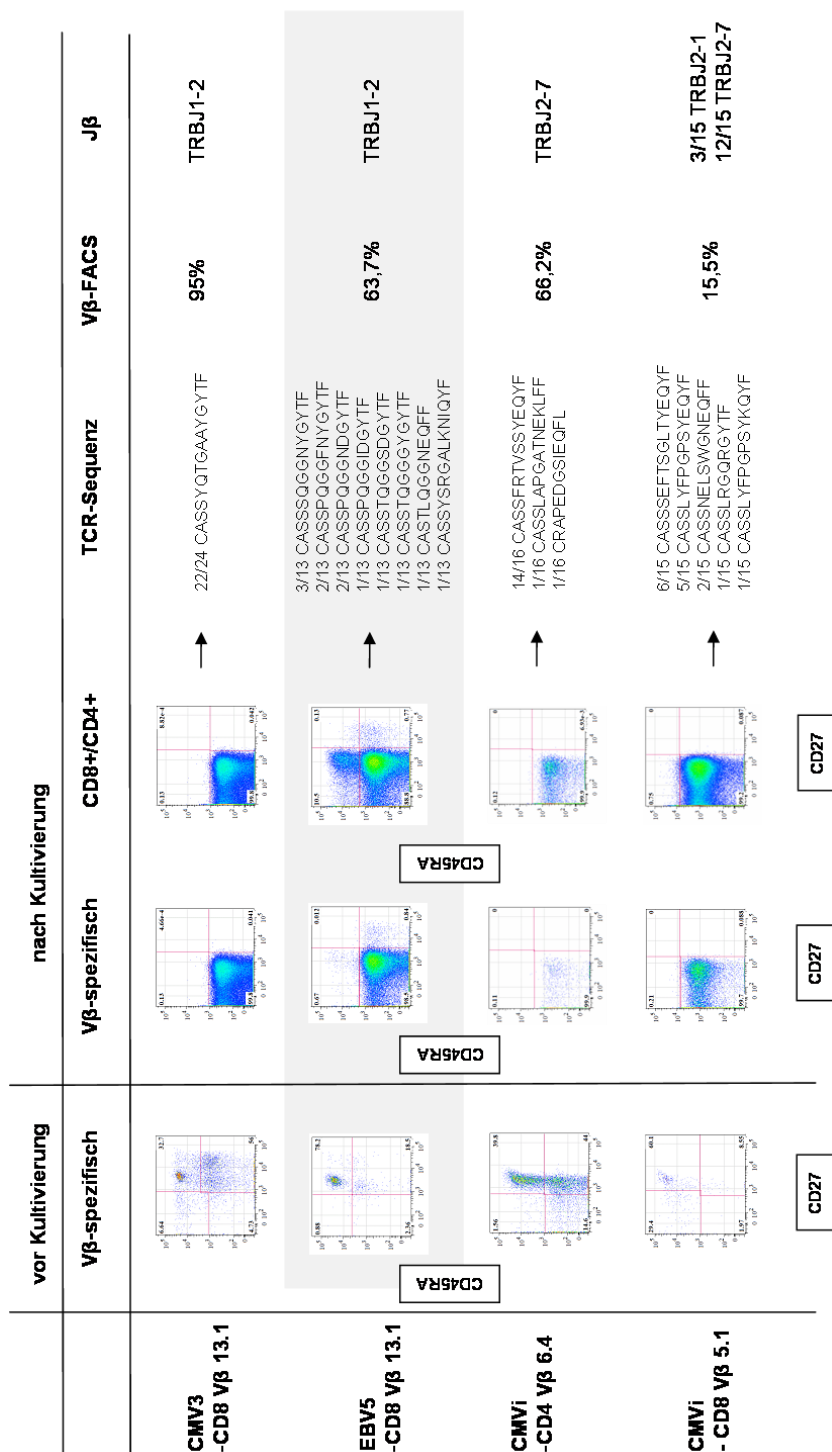


Abbildung 15: Bei den analysierten T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie besteht keine Korrelation zwischen TCR-Klonalität und Subpopulationen-Verteilung

Bei drei T-Zelllinien wurden hervorstechende Expansions nach ihrer Subpopulationen-Verteilung untersucht. Die Verteilung der Subpopulationen vor Expansion war normal. Hingegen regulierten die T-Zelllinien nach Expansion die Expression ihrer Oberflächenmoleküle CD45RA und CD27 herunter. Dadurch ergaben sich bei der TCR-V β -spezifischen Analyse über 98 % CD45RA-/CD27- T-Zellen bei allen vier gezeigten TCR-V β -Familien. Die Verteilung der Subpopulationen war dabei unabhängig von der Klonalität. Interessanterweise waren unter den CD8+ T-Zellen des Klones EBV5 10,5 % Memory-T-Zellen. Es waren jedoch weniger als 1 % Memory-T-Zellen bei der zu 63,7 % expandierten Familie V β 13.1 zu sehen.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Hypothese und Zielstellung

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte die These „Die Klonalität der T-Zell-Subpopulationen nimmt entlang des Differenzierungspfadades von naiven zu Memory-T-Zellen zu und ist somit am meisten polarisiert innerhalb der Effektor- und Effektor-Memory-T-Zellen.“ experimentell bestätigt werden.

Es wurde gezeigt, dass die antigenvermittelte Expansion der langlebigen Central-Memory-T-Zellen polyklonaler ist als jene bei kurzlebigen und differenzierten Effektor-T-Zellen. Diese Ergebnisse stützen somit das von Chang *et al.* vertretene Modell der verzweigten Differenzierung, laut dem Central-Memory- und Effektor-Memory-T-Zellen aus verschiedenen naiven T-Zellen stammen [46]. Zusätzlich konnten die Ergebnisse zeigen, dass Effektor-T-Zellen durch die Selektion der am stärksten antigenstimulierten Effektor-Memory-T-Zellen entstehen, denn ihre Immunantwort ist eher oligo- oder monoklonal im Gegensatz zu den anderen T-Zell-Subpopulationen [Abbildung 16].

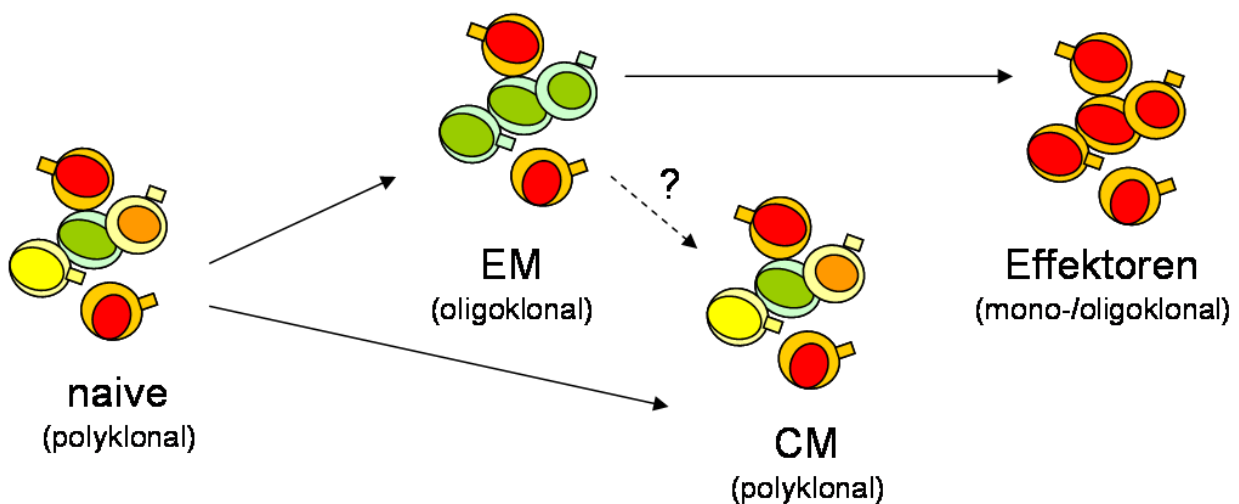


Abbildung 16: Erweitertes verzweigtes Differenzierungsmodell nach den hier gewonnenen Erkenntnissen über die Klonalität von naiven, Central-Memory-, Effektor-Memory- und Effektor-T-Zellen.

Hier konnte gezeigt werden, dass Central-Memory-T-Zellen ein naïv-ähnliches TCR-Vβ-Repertoire aufweisen. Hingegen ist die klonale Diversität von Effektor-T-Zellen geringer. Daraus kann auf eine Entwicklung von naiven zu Effektor-Memory und weiter zu Effektor-T-Zellen geschlossen werden. Die Entwicklung von Central-Memory-T-Zellen ist davon unabhängig.

5.2 Auswirkung und Bestätigung der Erkenntnisse über die Klonalität der T-Zell-Subpopulationen

In dieser Studie wurde systematisch die Klonalität aller T-Zell-Subpopulationen im menschlichen, peripheren Blut untersucht. Es stellte sich heraus, dass Memory-T-Zellen trotz der deutlich höheren Antigenspezifität eine nur geringgradig niedrigere klonale Diversität als naive T-Zellen haben.

Diese Aussage, die hier erstmalig mit statistischer Signifikanz an einem großen Kollektiv bewiesen werden konnte, wurde in der Literatur von zwei Autoren mit Hilfe anderer Methoden an einem bzw. zwei Probanden erwähnt. Robins *et al.* zeigten dies bei den CD45RO+ T-Zellen [47] und Klarenbeck *et al.* bestätigten die Aussage innerhalb der CD45RA- CD27+ Memory-T-Zellen [48]. Klarenbeck *et al.* beschrieben, dass diese Erkenntnisse das momentan vorherrschende Dogma über das zelluläre Gedächtnis des Immunsystems revolutionieren könnten. Die hohe Diversität des Memory-Pool würde eine Antwort gegen eine höhere Anzahl von Antigenen ermöglichen.

Weiterhin vermuten Klarenbeck *et al.*, dass mit dem großen Pool von klonal verschiedenen, latenten Memory-T-Zellen auch die Möglichkeit von Autoimmunität mit dem Alter deutlich steigt. Denn im zunehmenden Alter werden immer weniger ungeprimte naive T-Zellen produziert, wodurch die latenten Memory-T-Zellen autoimmun wirksam werden können. Daraus schlussfolgert er, dass ein polyklonales Memory-TCR-V β -Repertoire für Autoimmunkrankheiten prädispositioniert.

Über die Studien von Klagenbeck hinaus wurden hier Central-Memory- und Effektor-Memory-T-Zellen untersucht und neue Erkenntnisse über die Effektor-T-Zellen gewonnen. Damit können offene Fragen aus den vorangegangenen Studien beantwortet werden. Es konnte damit gezeigt werden, dass aus dem Pool der Effektor-Memory-T-Zellen hochspezifische Effektor-T-Zellen zur Antwort auf akute Erkrankungen in hoher Anzahl gebildet werden.

Eine mögliche klinische Anwendung der hier beschriebenen Ergebnisse könnte die Entwicklung viraler Vakzine darstellen. Bei einem verzweigten Entwicklungsmodell der T-Zellen ist davon auszugehen, dass allein *eine* primäre Central-Memory-T-Zellantwort für die Entwicklung einer lang anhaltenden Vakzine ausreichend ist [3]. Genaue Kenntnisse über den physiologischen Ablauf der T-Zell-Differenzierung sind damit unabdingbar.

Methodisch ist zu bedenken, dass bisher nur peripheres Blut untersucht wurde. Könnten spezifische Klone in sekundär lymphatische Organe migrieren und daher bei der Analyse

unentdeckt bleiben? Diese Frage kann mit den vorliegenden Daten noch nicht beantwortet werden und wird Gegenstand weiterer Forschung sein.

5.3 Referenzwerte des TCR-V β -Repertoire bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich mit anderen Studien

In dieser Studie wurde systematisch das TCR-V β -Repertoire von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen untersucht. Grundlage dafür waren die Referenzwerte der TCR-V β -Verteilung bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die hier erhobenen Werte konnten durch die im Beckmann Coulter *IO Test Beta Mark TCR Beta-Repertoire Kit* enthaltenen Referenzwerte und die von McLean-Tooke *et al.* veröffentlichten Daten bestätigt werden [22]. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeichnen sich durch die große Probandenanzahl und ein breites Altersspektrum aus.

5.4 Optimierungspotential und Alternativen zum verwendeten Antikörperpanel

Weiterhin wird die Verteilung von naiven, Memory- und Effektor-Subpopulationen bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beschrieben. Dazu wurde eine optimale Färbemethode entwickelt. Es wurden mehrere Antikörper getestet und Vor- und Nachteile der einzelnen Produkte abgewogen. Folgende Charakteristika sollten bei der Zusammenstellung weiterer Antikörperpanels zur Beurteilung von T-Zell-Subpopulationen beachtet werden:

Zur Differenzierung der Memory-Subpopulationen wurde CCR7 statt CD62L gewählt, weil dadurch eine klare Trennung zwischen Effektor-Memory- und Central-Memory-T-Zellen möglich ist. Da keiner der kommerziell verfügbaren CCR7 Antikörper zu diesem Zeitpunkt eine gute Färbung in einem Schritt gewährleistete, wurde ein selbst-konjugierter Antikörper genutzt. Die zwei zusätzlichen Färbeschritte führten zu Zell- und Zeitverlust. Daher sollten für weitere Projekte neu auf den Markt kommende CCR7 Antikörper getestet werden [8].

Wichtig zur klaren Definition der Subpopulationen sind weiterhin die zwei Isoformen CD45RO und CD45RA der Tyrosinphosphatase CD45. Naive T-Zellen exprimieren CD45RA auf ihrer Oberfläche, nicht aber CD45RO. Bei Stimulation verlieren sie durch ihre Entwicklung zu den Memory-T-Zellen CD45RA, exprimieren aber CD45RO. Neben Memory-T-Zellen sind auch Effektor-T-Zellen CD45RA positiv [7, 49].

Ein entscheidender Unterschied zwischen den Zellpopulationen ist ihre Lebensdauer. So indiziert die Expressierung von CD57, einem Oligosaccharid auf NK und allen T-Zellen, antigeninduzierte Apoptose und Proliferationshemmung. Der Marker steht für eine späte

Gedächtnisfunktion. Es ist daher nicht überraschend, dass CDD57 verstärkt bei Effektor-T-Zellen zu finden ist. Er ist als ergänzender Marker im Panel daher unverzichtbar [9].

Weitere Oberflächenproteine, die zur Unterteilung der T-Zell-Subpopulationen dienen, sind CD27 und CD28. Auch diese werden u.a. von naiven T-Zellen exprimiert und durch Antigenpräsentation langsam herunterreguliert. Jedoch sind sie, im Gegensatz zu den CD45 Isotypen, bei einigen Memory-T-Zellen zu sehen. Bei allen CD28 positiven Zellen findet sich auch CD27, jedoch gibt es einige Memory-T-Zellen, welche nur CD27 zeigen. Effektor-T-Zellen exprimieren keinen der beiden Marker [7, 10].

5.5 Anteil der T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut

Durch die simultane Färbung mit CD27, CD45RA, CCR7 und CD57 Oberflächenmolekülen war es möglich, verschiedene Strategien zur Identifizierung von T-Zell-Subpopulation im Kollektiv zu vergleichen. Da bei der weiteren Färbung bei den 25 TCR-V β -Familien teilweise nur geringe Zellzahlen zu erwarten waren, wurden die T-Zell-Subpopulationen mit den größten möglichen Zellzahlen analysiert. Daher wurden naive T-Zellen als CD45⁺/CD27⁺ definiert. Memory-T-Zellen wurden als CD45RA⁻/CD27⁺ definiert und weiter unterteilt mit CCR7 bei CD45RA⁻/CCR7⁺ Central-Memory- und CD45RA⁻/CCR7⁻ Effektor-Memory-T-Zellen. Die erhöhte Klonalität der Effektor-T-Zellen sollte als Grundthese bei verschiedenen Populationen nachgewiesen werden: CD45RA⁺/CCR7⁻, CD27⁻, CD57⁻.

Hier, wie auch in anderen Analysen der T-Zell-Subpopulationen, wurden die meisten Zellen bei der naiven Fraktion gemessen. Der Grund hierfür könnte der relativ niedrige Altersmedian der Probanden von 38 Jahren sein. Bei älteren Probanden stand die Mehrzahl von T-Zellen bereits in Antigenkontakt [50].

5.6 CMV-Serostatus und TCR-V β -Repertoire

Obwohl bekannt ist, dass Menschen im Laufe ihres Lebens mit unzählig vielen Antigenen in Kontakt kommen, scheint eine CMV-Infektion, egal ob klinisch oder subklinisch verlaufend, eine besondere Rolle zu spielen. Da bekannt ist, dass über 60 % der Menschen CMV-positiv sind [51], stellt sich die Frage, ob dadurch ein klonaler Bias entsteht. Daher wurde der Einfluss des CMV-Serostatus auf die Klonalität untersucht. Hierfür wurden CMV-positive und CMV-negative Individuen miteinander verglichen, die sich in weiteren anamnestisch erhobenen

Parametern nicht signifikant unterschieden. Beim Vergleich fiel innerhalb der CD8+ T-Zellen die signifikant niedrigere klonale Diversität der T-Zellen der CMV-positiven Individuen auf.

Mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten wurde im peripheren Blut der CMV-positiven Probanden eine signifikant höhere Anzahl CD8+ Effektor-T-Zellen nachgewiesen. Dies wurde durch vier verschiedene Oberflächenmarker-Definitionen von Effektor-T-Zellen gezeigt. Auch andere Autoren bestätigen, dass die CMV-Seropositivität die Subpopulationen-Verteilung der CD8+ T-Zellen beeinflusst. So wird von 40 % weniger naiven T-Zellen bei CMV-seropositiven Individuen berichtet [51]. Andere beschreiben eine Zunahme der CD57+/CD28- T-Zellen [52] und vermuten eine damit zusammenhängende Zunahme der Klonalität bei CMV-seropositiven Individuen. Letzteres konnte mit den hier gezeigten Daten nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses des CMV-Status bei CD4+ T-Zellen war jedoch kein Unterschied zwischen seropositiven und seronegativen Probanden nachzuweisen. Andere Studien bestätigen dies indirekt und zeigen, im Gegensatz zur CD8+ Population, keine Abnahme der naiven CD4+ Zellen bei CMV-positiven Probanden [51]. Es wird sogar eine Abnahme von CD58+ Effektor-T-Zellen unter den CD4+ Zellen bei CMV-positiven Probanden gezeigt [53].

Somit konnte ein Zusammenhang zwischen dem polarisierten TCR-V β -Repertoire bei Effektor-T-Zellen und dem polarisierten CD8+ TCR-V β -Repertoire bei CMV-seropositiven Probanden hergestellt werden. CMV-positive Menschen haben durch die erhöhte Anzahl von Effektor-T-Zellen ein oligoklonales TCR-V β -Repertoire.

5.7 Kritische Bewertung von Spektratyping und Real-time-PCR als Alternativen zur der TCR-V β -Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit wurde die TCR-V β -Durchflusszytometrie genutzt, um das TCR-V β -Repertoire zu analysieren. Alternative Verfahren stellen das TCR-Spektratyping und die Real-time-PCR dar.

Spektratyping nutzt die Längenunterschiede der einzelnen TCR-V β -Familien in der CDR3-Region, welche aufgrund von unterschiedlicher Anzahl der Nukleotide und anderen Positionen der Verknüpfungen entstehen. Diese Methode war eine der ersten, die eine Untersuchung des TCR-V β -Repertoires ermöglichten [54, 55]. Im Laufe der Zeit wurden andere Methoden entwickelt und das Spektratyping konnte sich wegen der sehr oberflächlichen Bestimmung des TCR-V β -Repertoires nicht durchsetzen.

Zur Anwendung der Real-time-PCR wird, über die Extraktion von RNA, DNA synthetisiert. Es wird über Fluoreszenzsignale eine Quantifizierung der DNA durchgeführt. *Primer* der einzelnen TCR-V β -Familien wurden in verschiedenen Studien getestet [56, 57].

Ein Nachteil beider Methoden ist, dass sie nur TCR-V β -Familien analysieren. Zur Bestätigung der Ergebnisse und zum Monitoring einzelner Klone ist die Sequenzierung notwendig [57]. Sie sind dabei als Alternativen zur durchflusszytometrischen Bestimmung anzusehen. Bei der Durchflusszytometrie können jedoch direkt Zellen des peripheren Blutes gefärbt werden, während für Real-time-PCR RNA-Extraktion und DNA-Synthese nötig sind, was zusätzlich Zeit und Geld kostet. Weiterhin ist es bei der Durchflusszytometrie möglich, andere Parameter, wie hier die T-Zell-Subpopulationen, zeitgleich zu färben. Daher ist die Durchflusszytometrie, wie hier angewandt, als Screeningmethode der Wahl anzusehen. Eine Kombination zwischen Durchflusszytometrie und TCR-V β -Sequenzierung wurde bereits in Studien verwendet und erwies sich hierbei als besonders geeignet [12, 23].

5.8 Die hochparallele Pyrosequenzierung als quantitativ überlegene Methode zur Single-Kolonie-Sequenzierung – Alternative der Zukunft?

Die TCR-Single-Kolonie-Sequenzierung ist limitiert durch die geringe Anzahl der möglichen Sequenzen. In dieser Studie wurden ungefähr 20 Sequenzen pro TCR-V β -Familie generiert. Dadurch ergibt sich bei der Vielfalt von T-Zellen ein möglicher Bias. Eine Alternative bildet die hochparallele Pyrosequenzierung. Diese nutzt, wie die Kettenabbruch-Synthese nach Sanger, die DNA-Polymerase, misst aber nicht das Endprodukt, sondern optisch die enzymatische Aktivität. Mit diesem Verfahren besteht die Möglichkeit mehr als 1000 Sequenzen des TCR-V β -Genlocus zu analysieren und es ist damit quantitativ der hier angewendeten Methode überlegen. In der Literatur wird beschrieben, dass die hochparallele Pyrosequenzierung einfacher und weniger zeitintensiv als die Single-Kolonie-Sequenzierung sei, denn sie ist gut automatisierbar. Diese Vorteile stehen dem hohen Preis der Methode entgegen, welcher bei Anwendung in der Routinediagnostik unbezahlbar wäre. Es bleibt zu untersuchen, ob mit einer geringeren Anzahl an Sequenzen in Rahmen der Single-Kolonie-Sequenzierung, vielleicht eine hinreichende Genauigkeit erzielt wird. Die hochparallele Pyrosequenzierung könnte dann eventuell auf Forschungsebene beschränkt bleiben. Die Single-Kolonie-Sequenzierung würde damit eine günstige Screeningmethode für die vielfache Anwendung in der Klinik darstellen. Genaues werden die Entwicklungen in der Zukunft zeigen [58-60].

5.9 Dominierender Effektor-T-Zell-Phänotyp bei den T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie

Die in dieser Arbeit generierten und untersuchten 18 T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie zeigten zu über 98 % den CD45RA-/CD27- Phänotyp. Obwohl einzelne T-Zelllinien einen höheren Anteil an Memory-T-Zellen hatten, konnte kein Zusammenhang zum genutzten Peptidpool oder zur Klonalität gezeigt werden. Daher stellt sich die Frage, ob bereits von anderen Autoren die Herunterregulation der Oberflächenmoleküle beobachtet wurde und welche Auswirkung dies auf die Nutzung der T-Zellen zur adoptiven T-Zelltherapie *in vivo* hat. Ergebnisse von Wherry *et al.* zeigen, dass sowohl Central-Memory-T-Zellen als auch Effektor-Memory-T-Zellen durch Antigenkontakt *in vivo* und *in vitro* in Effektor-T-Zellen differenzieren. Die CD62L- T-Zellen dominieren in dieser Untersuchung [61].

Das Ziel der adoptiven T-Zelltherapie ist, T-Zellen mit langer Lebensdauer, also bestenfalls Central-Memory-T-Zellen, zu generieren. Mit der Fragestellung, ob sich Effektor-T-Zellen innerhalb der T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie *in vivo* in andere Subpopulationen wandeln können, wurden Primaten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Effektor-T-Zellen, die sich aus Central-Memory-T-Zellen entwickelt hatten, länger überleben und in der Lage sind, sich wieder in Central-Memory-T-Zellen und auch Effektor-Memory-T-Zellen zu entwickeln [62]. Diese Ergebnisse widerlegen Hinrichs *et al.* [63]. Sie weisen darauf hin, dass in der Primatenstudie die ursprünglich naiven T-Zellen vernachlässigt wurden und schreiben dieser Zellpopulation die besten Eigenschaften für die adoptive T-Zelltherapie zu. Auch die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigen diese Hypothese.

Damit ist eine abschließende Erklärung der Subpopulationenentwicklung bei T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie nicht möglich. Festzuhalten ist, dass die Eigenschaften der T-Zellen zu Anfang der T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie wichtiger sind als jene zu Ende der Kultur. Möglicherweise sind jedoch T-Zellen mit Memory-Eigenschaften nach drei Wochen Kultur noch besser geeignet.

5.10 Bedeutung der TCR-V β -Repertoire-Durchflusszytometrie und der Single-Kolonie-Sequenzierung für die adoptive T-Zelltherapie

Die adoptive T-Zelltherapie ist ein hoffnungsvoller Ansatz für bisher untherapierbare Erkrankungen. Sie kann ansetzen, wenn das Immunsystem versagt oder, wie bei

Transplantationen oder Autoimmunerkrankungen, ausgeschaltet werden muss, um Reaktionen gegen den eigenen Körper oder die Therapie zu verhindern.

Der breiten Anwendung der adoptiven T-Zelltherapie stehen bislang die Überlebensdauer der genutzten Zellen von wenigen Wochen und die geringe Erfahrung, mit hohen Risiken beim Eingriff in das Immunsystem, entgegen. Um diese Hindernisse zu überwinden und Komplikationen zu vermeiden ist eine genaue Charakterisierung der T-Zelllinien notwendig. Es müssen Eigenschaften definiert werden, die zu einer erfolgreichen Therapie führen, um die Kultivierung der T-Zelllinien in die gewünschte Richtung zu beeinflussen. Memory-Subpopulationen erwiesen sich hierbei als besonders geeignet für die adoptive T-Zelltherapie, weil sie eine längere Lebensdauer besitzen und sie eventuell teilungsfähig bleiben [24, 64, 65]. Mit höherer Lebensdauer der T-Zellen vergrößern sich die Therapieintervalle, welche entscheidend für den Erfolg und die Kosten des Verfahrens sind.

Das hier genutzte Antikörperpanel erlaubt die genaue Erfassung der Subpopulationen von T-Zellen. Es wurde erfolgreich zur Charakterisierung von 18 T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie genutzt, welche mit Peptiden von CMV, EBV und Adenovirus generiert wurden. Weiterhin wurde die Klonalität der T-Zelllinien durch Analyse des TCR-V β -Repertoires bestimmt. Anhand der Klonalität konnte die Entwicklung der T-Zelllinien während der Kultivierung nachvollzogen werden. Daraufhin wurden durch die TCR-Single-Kolonie-Sequenzierung sogar die spezifischen Sequenzen der T-Zelllinien ermittelt werden. Diese sind ein nützlicher Parameter für das Monitoring während der Therapie. So kann nach Infusion der T-Zelllinien durch Blutuntersuchung der verbleibende Anteil der Zellen unter den anderen T-Zellen des Patienten ermittelt werden. Weiterhin wären auch Untersuchungen von spezifischen Geweben, wie den Lymphknoten, denkbar [28].

Bei der adoptiven T-Zelltherapie mit nur einem T-Zellklon wäre die Therapieüberwachung am besten realisierbar. Dafür müsste sich der Kultivierung ein weiterer Schritt zur Selektion eines einzelnen Klones anschließen [29].

5.11 Ausblick

Die Optimierung der Expansionsprotokolle für T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie wird über die Möglichkeiten und Limitierungen der Methode bei der Anwendung *in vivo* entscheiden. Es gibt verschiedene denkbare Ansätze, mit denen in Zukunft Erfolge erzielt werden könnten.

Es ist bekannt, dass chronische Infektionen durch eine Schwächung der T-Zellantwort charakterisiert sind, welche durch die Induktion inhibitorischer Moleküle, wie beispielsweise

PD-1 und Tim-3, übermittelt wird [29]. Eine Blockierung dieser inhibitorischen Kaskaden mit dem Ziel längerer Lebensdauer und höherer Effektivität der T-Zellen wäre eine Optimierungsoption der Expansionsprotokolle.

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung von T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie stellt die genetische Modifikation dar. Dabei wird ein Retrovektor genutzt, um α - oder β -Sequenzen mit der gewünschten Antigenpezifität in die T-Zellen zu bringen. Die Stabilität der Bindung innerhalb der CDR3 Region, die grundlegend wichtig für die Etablierung neuer Eigenschaften ist, ließ sich in den Versuchen bisher jedoch nur ungenügend erhalten. Sollte dieses Problem gelöst werden, könnte dieses Verfahren auch für virusspezifische T-Zelllinien in Betracht gezogen werden [66].

An der Charité wird in Zukunft die klinische Anwendung der T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie im Fokus stehen. Insbesondere die Protokolle der hier analysierten CMV- und EBV-Zelllinien werden somit weiterhin klinisch eingesetzt. Die dargestellten Methoden der durchflusszytometrischen Analyse des TCR-V β -Repertoires und die TCR-Sequenzierung werden dabei wichtige Werkzeuge zum Monitoring der zur Therapie eingesetzten T-Zellen beim Patienten sein.

6 Zusammenfassung

Die auf Durchflusszytometrie basierende Messung des TCR-V β -Repertoires stellt eine etablierte Methode zur Bestimmung von klonalen T-Zell-Expansionen in physiologischen und pathologischen Konditionen dar. Ziel dieser Studie war die Charakterisierung des TCR-V β -Repertoires bei verschiedenen T-Zell-Subpopulationen gesunder Probanden und virusspezifischer T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie. Diese wurde mit Hilfe der 10-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Darüber hinaus wurden prominente Expansionen mit TCR-Single-Kolonie-Sequenzierung charakterisiert.

Für den ersten Teil der Studie wurde das Blut von 66 gesunden Probanden im Alter von 0 (Nabelschnurblut) bis 72 Jahren untersucht. Weiterhin wurden 18 T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie durch die Stimulation mit virusspezifischen Peptiden aus menschlichen PBMC generiert. Das zur Analyse genutzte Panel bestand aus 25 Antikörpern zur Bestimmung von menschlichen TCR-V β -Ketten und zusätzlich CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD25 und CD57. Zur TCR-Single-Kolonie-Sequenzierung wurde mit RNA die cDNA synthetisiert, die spezifischen TCR-V β -Familien amplifiziert, in *E.coli* transformiert, nochmals amplifiziert, aufgereinigt und anschließend sequenziert. Zur statistischen Analyse wurden der Wilcoxon-Test und die Varianzanalyse genutzt.

Zu Beginn wurden Expansionen, basierend auf der Analyse der TCR-V β -Verteilung, bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen berechnet. Daraufhin wurden Gating-Strategien zur vertiefenden TCR-Analyse bei naiven, Central-Memory-, Effektor-Memory- und Effektor-T-Zellen etabliert. Insgesamt waren mehr dominante Expansionen bei Effektor-T-Zellen im Gegensatz zu Central-Memory-, Effektor-Memory- oder naiven T-Zellen zu sehen. Beispielsweise waren die höchsten Expansionen bei CD45RA⁺/CCR7-Effektor-T-Zellen sowohl bei CD4⁺ (Faktor 8) als auch bei CD8⁺ (Faktor 11). Es waren jedoch keine Expansionen bei naiven T-Zellen zu finden. Bemerkenswerterweise fanden sich ebenfalls keine Expansionen bei CD4⁺ Central-Memory- und nur sehr wenige bei CD8⁺ Central-Memory-T-Zellen (0,5). Weiterhin wurde die Auswirkung des CMV-Serostatus auf die TCR-Klonalität der CD8⁺ T-Zellen untersucht: Expansionsfaktor 6 versus Expansionsfaktor 1,5 wurden beim Vergleich von CMV-positiven versus CMV-negativen Spendern gemessen.

Bei 18 virusspezifischen T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie wurden durchflusszytometrische Daten und TCR-V β -Sequenzen korreliert. Im Durchschnitt fanden sich 4,3 TCR-V β -Expansionen pro T-Zelllinie bei CD4⁺ Zellen. Dagegen waren nur 2,4 Expansionen pro T-Zelllinie bei den CD8⁺ T-Zellen zu sehen. Dieser Unterschied ist hoch signifikant

($p = 0,002$). Jedoch waren die Expansionswerte nach Zellkultur höher ($p < 0,002$) bei CD8+ (37,7 %) als bei CD4+ (9,2 %) T-Zellen. Die Expansionszahlen und Expansionswerte zeigten vor der Kultur noch keinen Unterschied zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen. Durch einen Vergleich der Klonotypen vor und nach Expansion konnten neue Erkenntnisse über die Eigenschaften der verschiedenen T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie gewonnen werden. Es zeigte sich, dass die Subpopulationen-Verteilung bei den analysierten T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie, anders als bei der Untersuchung des peripheren Blutes der Probanden, unabhängig von der Klonalität ist.

Diese Studie ermöglicht einen Einblick in die *in vivo* TCR-V β -Repertoire-Zusammensetzung der T-Zell-Subpopulationen. Effektor-T-Zellen zeigen ein stark polarisiertes TCR-V β -Repertoire und Central-Memory-T-Zellen zeigen überraschenderweise eine eher naiv-ähnliche Verteilung. Die Daten deuten darauf hin, dass die antigenvermittelte Expansion der langlebigen Central-Memory-Zellen polyklonaler ist als jene bei kurzlebigen terminal differenzierten Effektor-T-Zellen. Weiterhin ist festzustellen, dass TCR-Durchflusszytometrie in Kombination mit TCR-Single-Kolonie-Sequenzierung geeignete Methoden darstellen, um klonale Expansionen bei T-Zelllinien zur adoptiven T-Zelltherapie zu zeigen. weiteren Studien sollte die *in vitro* und *in vivo* Effektivität der expandierten Zellen gezeigt werden, um diese mit den Klonotypen korrelieren zu können.

7 Summary

Flowcytometry based analysis of the TCR repertoire is a well established tool for the detection of clonal T-cell expansions in physiologic and pathologic conditions. As no data are available, here was asked for the individual TCR repertoires in T-cell subsets and virus specific adoptive T-cell cultures using 10-color flowcytometry. Furthermore, prominent V β expansions were sequenced with TCR single colony sequencing and the results were correlated.

First blood of 66 healthy subjects aged 0 (cord blood) to 72 years was analysed. Then 18 adoptive T-cell cultures were generated after peptide specific expansion of human PBMC. For flowcytometry analysis a set of 25 antibodies detecting human TCR V β chains in addition to CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD27, CD57 was employed. For TCR single colony sequencing cDNA was synthesised from RNA, TCR specific V β families were amplified, transformed into E.coli, amplified, cleaned and finally sequenced. Statistical analysis included Wilcoxon and analysis of variance.

Initially, TCR expansion values were calculated based on the analysis of TCR-V β distribution on CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Then a gating strategy was established allowing discriminative TCR repertoire analysis of naive, central/effector memory, and effector subsets. Overall, more dominant TCR expansions were present within effector as opposed to central/effector memory or naive cells, e.g. median TCR V β expansion rate was highest on CD45RA⁺/CCR7⁻ effector CD4⁺ and CD8⁺ cells (8 and 11 fold, respectively) but absent on naive CD4⁺ and CD8⁺ cells. Remarkably, TCR expansions were missing (0) or very low (0.5) on CD4⁺ and CD8⁺ central memory population, respectively. The impact of CMV serostatus was also investigated: 6 vs. 1.5 fold expansion rate were encountered in CD8⁺ cells of CMV-positiv versus CMV-negativ donors.

In 18 virus specific T-cell cultures flowcytometry data and sequences were correlated. An average of 4.3 V β expansions was identified per cell line in CD4⁺ cells versus only 2.4 V β expansions in CD8⁺ subset; cross Wilcoxon testing showed highly significant difference ($p = 0.002$). The values of these expansion were post expansion higher ($p < 0.002$) on CD8⁺ (37.7 %) than on CD4⁺ cells (9.2 %). Values between CD4⁺ and CD8⁺ prior to expansion showed no difference.

Comparison of sequenced clonotypes and baseline values gives new insights into the properties of the different adoptive T-cell cultures. Effector T-cells show a strongly biased TCR repertoire whereas surprisingly, central memory T-cells show a rather naive-like distribution although they contain enhanced frequencies of antigen-specific T-cells. These data suggest that

antigen-driven expansion among long-lived central memory is more polyclonal and in short-lived terminally differentiated effector more oligoclonal. Furthermore, this study shows that TCR flowcytometry in combination with TCR sequencing is a suitable tool to identify clonal expansions in adoptive T-cells. Future studies are underway to explore the *in vitro* and *in vivo* killing efficiency of expanded T-cells and to correlate them with clonotypic sequence analysis.

8 Abkürzungsverzeichnis

adjust.	adjustiert
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BZLF	IE Z-Transaktivatorgen
CB	Calbindin
CCR7	C-C Chemokine Receptor Typ 7
CD	cluster of differentiation (Differenzierungskluster)
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CDR3	Complementary determining region 3
CM	Central-Memory
CMV	Cytomegalievirus
Cy7	Cyanine 7
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphate
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen (Epstein-Barr Kernantigen)
EBV	Epstein-Barr Virus
ECD	Phycoerythrin-Texas Red
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylendiamin-tetraessigsäure)
EM	Effektor-Memory
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Freq.	Frequenz
IE	immediate early
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IU	Internationale Unit
LMP	latentes Membranprotein
LSR2	Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson
MACS	magnetic activated cell sorting (magnetisch aktivierte Zellsortierung)
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)

MNC	mononukleäre Zellen
MW	Mittelwert
n	number (Anzahl)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
n. s.	nicht signifikant
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffer saline (Phosphat-gepufferte Salinelösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD-1	Programmed Death 1
PE	Pycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
pp65	Phospho-Protein 65
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI-Medium	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkriptase
SD	standard deviation (Standardabweichung)
sig.	signifikant
TA	Adenine und Thymin
TCR	t-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
Tim-3	t-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3
TNF	Tumornekrosefaktor
V β	variable TCR β chain

9 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. 2008, New York and London: Garland Science.
2. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(4): p. 251-62.
3. Bannard, O., M. Kraman, and D. Fearon, *Pathways of memory CD8+ T-cell development*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(8): p. 2083-7.
4. Hamann, D., et al., *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 1997. **186**(9): p. 1407-18.
5. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
6. Champagne, P., et al., *Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 106-11.
7. van Baarle, D., et al., *Failing immune control as a result of impaired CD8+ T-cell maturation: CD27 might provide a clue*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(12): p. 586-91.
8. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-63.
9. Bronke, C., et al., *Progression to CMV end-organ disease in HIV-1-infected individuals despite abundance of highly differentiated CMV-specific CD8+ T-cells*. *Immunol Lett*, 2005. **97**(2): p. 215-24.
10. Fritsch, R.D., et al., *Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6489-97.
11. Alves, N.L., et al., *Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5201-10.
12. Okada, R., et al., *Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation*. *Int Immunol*, 2008. **20**(9): p. 1189-99.
13. Brenchley, J.M., et al., *Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2711-20.
14. Hislop, A.D., et al., *Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 587-617.

15. Monteiro, M., et al., *Cartography of gene expression in CD8 single cells: novel CCR7-subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2863-70.
16. Lefrancois, L. and A.L. Marzo, *The descent of memory T-cell subsets*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 618-23.
17. Stemmerger, C., et al., *Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(6): p. 399-405.
18. Lefranc, M.P. and T.H. Rabbitts, *Two tandemly organized human genes encoding the T-cell gamma constant-region sequences show multiple rearrangement in different T-cell types*. Nature, 1985. **316**(6027): p. 464-6.
19. Meier, J.T. and S.M. Lewis, *P nucleotides in V(D)J recombination: a fine-structure analysis*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 1078-92.
20. Padovan, E., et al., *Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells*. Science, 1993. **262**(5132): p. 422-4.
21. Melenhorst, J.J., et al., *Contribution of TCR-beta locus and HLA to the shape of the mature human Vbeta repertoire*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6484-9.
22. McLean-Tooke, A., et al., *T cell receptor Vbeta repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 190-8.
23. Wlodarski, M.W., et al., *Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2769-80.
24. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 247-58.
25. Bitmansour, A.D., et al., *Direct ex vivo analysis of human CD4(+) memory T cell activation requirements at the single clonotype level*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1207-18.
26. Risitano, A.M., et al., *In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing*. Lancet, 2004. **364**(9431): p. 355-64.
27. Wlodarski, M.W., et al., *Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2632-41.

28. Babel, N., M.H. Hammer, and P. Reinke, [*Adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific T-lymphocytes in chronic active Epstein-Barr infection*]. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(11): p. 548-50.
29. Berger, C., et al., *Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 224-32.
30. Hammer, M.H., et al., *HLA type-independent generation of antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy*. Eur J Immunol, 2005. **35**(7): p. 2250-8.
31. Feuchtinger, T., et al., *Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy*. Exp Hematol, 2004. **32**(3): p. 282-9.
32. Lacey, S.F., et al., *Characterization of cytotoxic function of CMV-pp65-specific CD8+ T-lymphocytes identified by HLA tetramers in recipients and donors of stem-cell transplants*. Transplantation, 2002. **74**(5): p. 722-32.
33. Straathof, K.C., et al., *Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers in children*. Oncologist, 2003. **8**(1): p. 83-98.
34. DiNardo, C.D. and D.E. Tsai, *Treatment advances in posttransplant lymphoproliferative disease*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(4): p. 368-74.
35. Dong, L., et al., *Adoptive transfer of cytomegalovirus/Epstein-Barr virus-specific immune effector cells for therapeutic and preventive/preemptive treatment of pediatric allogeneic cell transplant recipients*. J Pediatr Hematol Oncol, 2010. **32**(1): p. e31-7.
36. Savoldo, B., et al., *Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs)*. Blood, 2006. **108**(9): p. 2942-9.
37. Savoldo, B., et al., *Autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for the treatment of persistent active EBV infection*. Blood, 2002. **100**(12): p. 4059-66.
38. Brestrich, G., et al., *Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy*. Am J Transplant, 2009. **9**(7): p. 1679-84.
39. June, C.H., *Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1466-76.
40. Hawkins, R.E., et al., *Development of adoptive cell therapy for cancer: a clinical perspective*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(6): p. 665-72.

41. Pannetier, C., J. Even, and P. Kourilsky, *T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples*. Immunol Today, 1995. **16**(4): p. 176-81.
42. Wlodarski, M.W., et al., *Clonal predominance of CD8(+) T cells in patients with unexplained neutropenia*. Exp Hematol, 2008. **36**(3): p. 293-300.
43. MacIsaac, C., et al., *Rapid analysis of the Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in whole blood*. J Immunol Methods, 2003. **283**(1-2): p. 9-15.
44. Wei, S., et al., *The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire*. Immunogenetics, 1994. **40**(1): p. 27-36.
45. Bonfigli, S., et al., *T-cell receptor repertoire in healthy Sardinian subjects*. Hum Immunol, 2003. **64**(7): p. 689-95.
46. Chang, J.T., et al., *Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1687-91.
47. Robins, H.S., et al., *Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells*. Blood, 2009. **114**(19): p. 4099-107.
48. Klarenbeek, P.L., et al., *Human T-cell memory consists mainly of unexpanded clones*. Immunol Lett, 2010. **133**(1): p. 42-8.
49. Michie, C.A., et al., *Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 264-5.
50. Goronzy, J.J., W.W. Lee, and C.M. Weyand, *Aging and T-cell diversity*. Exp Gerontol, 2007. **42**(5): p. 400-6.
51. Chidrawar, S., et al., *Cytomegalovirus-seropositivity has a profound influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals*. Clin Exp Immunol, 2009. **155**(3): p. 423-32.
52. Khan, N., et al., *Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1984-92.
53. Pourgheysari, B., et al., *The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7759-65.
54. Wu, C.J., et al., *Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism*. Blood, 2000. **95**(1): p. 352-9.

-
55. Gorski, J., et al., *Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status.* J Immunol, 1994. **152**(10): p. 5109-19.
 56. Seo, K.S., et al., *A quantitative real time PCR method to analyze T cell receptor Vbeta subgroup expansion by staphylococcal superantigens.* J Transl Med, 2010. **8**: p. 2.
 57. Ochsenreither, S., et al., *Relative quantification of TCR Vbeta-chain families by real time PCR for identification of clonal T-cell populations.* J Transl Med, 2008. **6**: p. 34.
 58. Parameswaran, P., et al., *A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(19): p. e130.
 59. Boyd, S.D., et al., *Measurement and clinical monitoring of human lymphocyte clonality by massively parallel VDJ pyrosequencing.* Sci Transl Med, 2009. **1**(12): p. 12ra23.
 60. Mukherjee, R., et al., *HIV sequence variation associated with env antisense adoptive T-cell therapy in the hNSG mouse model.* Mol Ther, 2010. **18**(4): p. 803-11.
 61. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets.* Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.
 62. Berger, C., et al., *Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates.* J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 294-305.
 63. Hinrichs, C.S., et al., *Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(41): p. 17469-74.
 64. Mackensen, A., et al., *Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma.* J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 5060-9.
 65. Gattinoni, L., et al., *Adoptive immunotherapy for cancer: building on success.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 383-93.
 66. Thomas, S., H.J. Stauss, and E.C. Morris, *Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer.* Immunology, 2010. **129**(2): p. 170-7.

Veröffentlichung

Clemente M.J., Wlodarski M.W., Makishima H., Viny A.D., **Bretschneider I.**, Shaik M., Bejanyan N., Lichtin A.E., His E.D., Paquette R.L., Loughran T.P. Jr, Maciejewski J.P., *Clonal drift demonstrates unexpected dynamics of the T-cell repertoire in T-large granular lymphocyte leukemia*. Blood, 2011. **118**(16):4384-93.

Kongressbeiträge

- 09/2009 **Vortrag beim *European Congress of Immunology in Berlin***
"Delineation of T cell receptor repertoires in human T cell subsets: polyclonal patterns in longlived oppose skewed repertoires in shortlived T cells."
- 08/2010 **Posterpräsentation beim *International Congress of Immunology in Kobe***
„T-cell receptor repertoires in human T-cell subsets: Strongly biased repertoires in short-lived effector T cells“

Erklärung

„Ich, Isabell Bretschneider, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse des T-Zell-V β -Repertoires und verschiedener T-Zell-Subpopulationen mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie und deren Beeinflussung durch Virusinfektionen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Bei Prof. Dr. Hans-Dieter Volk, Direktor der Klinik für Medizinische Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, bedanke ich mich herzlich für die Übertragung des Forschungsthemas sowie für die motivierende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten und bei den Laboranalysen möchte ich Dr. Marcin Wlodarski, Manuel Guerreiro, Mathias Streitz, Dr. Christian Meisel, Prof. Dr. Petra Reinke, Nadja Ledenig, Christa Liebenthal, Dr. Andy Roemhild, Dr. Sophie Gaubert, Dr. Gordon Brestrich, Dr. Sandra Schwele, Michael Clemente, Prof. Dr. Jaroslaw Maciejewski, Dr. Hadrian Spurka und Heather Cazzolli danken.

Ich danke Prof. Dr. Werner Hopfenmüller für die Unterstützung bei der kritischen Planung und der statistischen Analyse der Arbeit.

Meine Familie und Freunde haben mich bei der Durchführung der Arbeit begleitet. Besonderer Dank gilt meinen Eltern Siegfried und Carmen Bretschneider, Petra Goßlau und Jan-Christoph Deinert.

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."