

Phänotypische und funktionelle
Untersuchungen zur Transdifferenzierung von
 $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen in $\alpha\beta$ T-Zellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

M. Sc. Jenny Carla Bauer

aus Esslingen

Tübingen

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

08.11.2021

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatterin:

Apl. Prof. Dr. Karin Schilbach

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

Für Frieda und Dana.

Danksagungen

Hiermit möchte ich mich bei Apl. Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat mit meiner Arbeit am Herzstück ihres wissenschaftlichen Interesses mitzuarbeiten. Besonders dankbar bin ich für ihre hervorragende, herzliche und permanente Unterstützung, unzählige Stunden wissenschaftlicher Diskussionen und das hohe Maß an Freiheit und Vertrauen das sie mir bei der Wahl des optimalen Versuchsaufbaus in ihrem Labor gewährte.

Darüber hinaus danke ich der Jürgen-Manchot-Stiftung für die finanzielle Förderung meines Promotionsvorhabens.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Franziska Wiese, Dr. Katja Kühn, Dr. Hisayoshi Hashimoto sowie allen anderen Labormitgliedern, Studenten und Technikern der Kinderklinik für die gute Arbeitsatmosphäre und das stets offene Ohr für spontane Fragen. Besonders hervorheben möchte ich zudem Dr. David Heister und Kiona Lim für ihr großes Interesse am Thema und ihren kooperativen Arbeitsstil bei der Anfertigung ihrer Abschlussarbeiten.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Mann, meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung außerhalb des Labors bedanken. Sie halfen mir auch nach dem härtesten wissenschaftlichen Tag neu durchzustarten und stets an mich zu glauben. Mit Euch an meiner Seite ist nichts unmöglich - danke!

Zusammenfassung

T-Zellen spielen bei der Aufrechterhaltung des Gesundheitszustandes des Körpers eine entscheidende Rolle, die durch ein möglichst breites Antigenerkennungspotential, also einen diversen TZR-Pool, gewährleistet wird. Durch thymische Involution und Selektionsmechanismen sinkt mit zunehmendem Alter, vor allem auch nach klinisch indizierter Immundeprivation, jedoch sowohl die Rate der T-Zell-Neogenese als auch die T-Zell-Diversität, wodurch das Risiko einer schweren Erkrankung zunimmt. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sich naive T-Zellen unter klar definierten Bedingungen (z. B. in sek. Lymphorganen oder durch TZR-Revision) auch extrathymisch entwickeln können. Die Rekonstitution des T-Zellrepertoires über die extrathymische/*in vitro* Entwicklung autologer T-Zellen stellt damit einen Rescuemechanismus mit hohem therapeutischem Potential dar. Für den hauptsächlich gewebeständigen Subtyp der $\gamma\delta$ -T-Zellen, $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen, konnte der Klassenwechsel von $\gamma\delta$ zu $\alpha\beta$ -T-Zelle (Transdifferenzierung) bereits gezeigt werden. Die Parameter, die diesen Vorgang triggern, konnten bisher allerdings noch nicht identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Progenitoren weiter charakterisiert und das für sie beschriebene Potential der Transdifferenzierung in $\alpha\beta$ -T-Zellen untersucht werden. Die möglichen Analogien der Transdifferenzierung zur thymischen T-Zellenentwicklung und TZR-Revision wurden dabei in der inflammatorischen Standardkultur und in Experimenten mit konditionierten Zellkulturüberständen genauer untersucht. Die Charakterisierung der $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klone auf Genexpressions- und Proteinebene (v. a. via qPCR, Durchflusszytometrie, Sequenzierung) zeigten, dass $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen ein heterogener Progenitorpool sind, dass nicht alle $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen *ex vivo* kultivierbar sind, dass diese Zellen vielfältige Liganden/Rezeptor-Paare tragen (z. B. Notch/Notch-Liganden, Integrine, CD58/CD2) über die eine homotypische Interaktion möglich ist und dass sie in der Standardkultur, die eine milde Inflammation darstellt, nicht spontan transdifferenzieren. Die experimentellen Ansätze mit von Immunzellen präkonditionierten Zellkulturmedien zeigten, dass Komponenten des darin enthaltenen Sekretoms und eine hohe räumliche Nähe (3D-Kontext) der Progenitoren die Transdifferenzierung wahrscheinlicher machen, dass dafür akzessorische Zellen nicht obligat sind und dass weder ein inflammatorisches Milieu noch die Stimulation über den TZR allein die Transdifferenzierung initiieren können. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die Transdifferenzierung durch eine Sequenz multifaktorieller Trigger, durch die Kombination von Rezeptor-Interaktionen und universellen Sekretomkomponenten, möglicherweise im Kontext der Wundheilung, hervorgerufen wird. Dies hebt die Bedeutung von $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen für die Homöostase hervor und ist sowohl mit ihrer Eigenschaft in entzündetes Gewebe zu migrieren als auch ihrem „innate-like“ Charakter gut vereinbar.

Abstract

T cells play a crucial role in maintaining the body's health status, which is ensured by the broadest possible antigen recognition potential provided by a diverse TCR pool. However, due to thymic involution and selection mechanisms, both the rate of T-cell neogenesis and T-cell diversity decreases with age, especially after clinically indicated immunodeprivation, increasing the risk of a serious course of disease. In the past, it has been shown that naive T-cells can develop extrathymically under well-defined conditions (e. g. within sec. lymphatic organs or via TCR-revision). Reconstitution of the T-cell repertoire via extrathymic/*in vitro* development of autologous T-cells thus represents a rescue mechanism with high therapeutic potential. For $V\delta 1^+CD4^+$ T-cells, one mainly tissue-resident subtype of $\gamma\delta$ T-cells, the potential of a class change from $\gamma\delta$ to $\alpha\beta$ T-cell (transdifferentiation) has already been shown. The circumstances that trigger this process have not yet been identified. In this work, $V\delta 1^+CD4^+$ T-cell progenitors should therefore be characterized in more detail. Additionally, their potential of transdifferentiation into $\alpha\beta$ T-cells should be investigated. The possible analogy of the transdifferentiation process to thymic T-cell development and TCR-revision was investigated in detail in the inflammatory standard culture and in experiments with conditioned cell culture supernatants. The characterization of $V\delta 1^+CD4^+$ T-cell clones on gene expression and protein level (as assessed via qPCR, flow cytometry, sequencing) showed that $V\delta 1^+CD4^+$ T-cells are a heterogeneous progenitor pool, that not all $V\delta 1^+CD4^+$ T-cells are *ex vivo* cultivable, that these progenitors carry diverse ligand/receptor pairs (e.B. Notch/Notch ligands, integrins, CD58/CD2) through which also homotypical interaction is allowed and that transdifferentiation did not occur spontaneously in the standard culture (mild inflammation). The experiments with cell culture media, preconditioned by immune cells, showed that components of the contained secretome and a high spatial proximity (3D-context) of the progenitors make transdifferentiation more likely, that accessory cells are not obligatory for this, and that neither an inflammatory milieu nor stimulation via the TCR alone can initiate transdifferentiation. The results of this work suggest that transdifferentiation may be elicited by a sequence of multifactorial triggers that are the combination of receptor interactions and universal secretome components, possibly in the context of wound healing. This would highlight the importance of $V\delta 1^+CD4^+$ T cells for homeostasis and be consistent with their property to migrate into inflamed tissue and their 'innate-like' character.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Abstract	3
Abkürzungsverzeichnis, Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	8
1. EINLEITUNG	15
1.1. Das humane T-Zell-Kompartiment	15
1.1.1. Das T-Zell-Repertoire und $\alpha\beta$ T-Zellen	15
1.1.2. $\gamma\delta$ T-Zellen - ein Zelltyp der angeborenen Immunität?	17
1.1.3. $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen als $\alpha\beta$ T-Zell-Progenitoren	18
1.2. Mikroumgebungen	19
1.2.1. Zellen in Mikroumgebungen - Konsumieren, Wahrnehmen, Anpassen, Präsentieren, Sekretieren	19
1.2.2. Extrazelluläre Komponenten und der Einfluss des Zellsekretoms	20
1.3. Mögliche Kontexte der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Transdifferenzierung	22
1.3.1. Analogie zur thymischen T-Zell-Entwicklung	22
1.3.2. Transdifferenzierung als TZR-Revision	24
1.3.3. Entzündung/Wundheilung als Trigger der Transdifferenzierung	25
1.3.4. Metabolismus	26
1.4. Ziele dieser Arbeit	26
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1. Material	28
2.2. Methoden	35
2.2.1. PBMC-Isolation aus Vollblut und Zellzählung	35
2.2.2. Zellkultur	35
2.2.3. Isolation von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen	35
2.2.3.1. Magnet Assisted Cell Sorting (MACS)	36
2.2.4. FACS-Messungen	36
2.2.5. ELISA zur MICA-Quantifizierung	38
2.2.6. Detektion von TZR-Signalen über konfokale Laserscanningmikroskopie und die MAAACS-Methode	38
2.3. Molekularbiologie	39
2.3.1. Nukleinsäureisolationsstrategien	39
2.3.2. Reverse Transkription	39
2.3.3. Quantifikation und Qualitätskontrolle der Nukleinsäuren	39
2.3.3.1. Nukleinsäurequantifikation	39
2.3.3.2. Gelelektrophorese	39
2.3.4. PCR	40
2.3.4.1. Standard PCR-Einstellungen	40
2.3.4.2. QPCR-Einstellungen	41
2.3.5. Sequenzierung und Fragmentlängenanalysen	42
2.3.5.1. Sanger-Sequenzierung und Fragmentlängenanalyse	42
2.3.5.2. NGS auf der MiSeq-Plattform	43

2.3.5.3. NGS-Datenanalyse	45
3. ERGEBNISSE	46
3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	46
3.1.1. TZR V δ 1-CDR3 Sequenzanalysen	46
3.1.2. Transkriptom- und Proteomanalysen mehrerer V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klone	50
3.1.3. Untersuchungen einer möglichen Analogie zur thymischen T-Zell- Entwicklung	52
3.1.3.1. Der Notch-Signalweg in V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell Klonen	54
3.1.4. TZR-Revision als Mechanismus der Transdifferenzierung	57
3.1.4.1. V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell Liganden-Analysen	57
3.1.4.2. Integrine	58
3.1.4.3. Lair-1 - ein Antagonist des TZR-Signalings	62
3.1.4.4. Analyse von MMPs als bekannte Komponenten der T-Zell- Entwicklung und der TZR-Signaltransduktion	63
3.1.5. V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im Inflammationskontext	64
3.1.6. MICA-induzierte V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ -TZR-Stimulation	67
3.1.6.1. MICA/B-Sequenzierung und <i>in silico</i> -Interaktionsstudien . .	67
3.1.6.2. Einfluss von MICA/B auf das TZR-Signal	67
3.2. Transdifferenzierungsexperimente	68
3.2.1. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS1 .	71
3.2.2. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS2 .	75
3.2.3. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS3 .	78
3.2.4. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS4 .	81
3.2.5. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS5 .	84
3.2.6. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS6 .	87
3.2.7. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS7 .	90
3.2.8. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS8 .	93
3.2.9. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS9 .	96
3.2.10. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS10	99
3.2.11. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS11	103
3.2.12. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS12	106
3.2.13. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS13	109
3.2.14. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS14	113
3.2.14.1. VSK2-13	113
3.2.14.2. HHK1-1	116
3.2.15. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS15	118
3.2.16. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS16	121
3.2.17. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS17	124
3.2.18. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS18	127
3.2.18.1. Klonmix	127

3.2.18.2. Donor 1	130
3.2.18.3. Donor 2	132
3.2.19. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS19	134
3.2.20. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS20	137
3.2.21. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS21	142
3.2.22. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS22	145
3.2.23. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS23	148
3.2.24. Zusammenfassung der Ergebnisse	151
4. DISKUSSION	154
5. Literatur	160
A. Anhang	170

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
B-Zelle	Immunzelle die sich im Knochenmark entwickelt
B27	Serum-Supplement
bp	Basenpaare
c	Konzentration
c/mTECs	kortikale/medulläre thymische Epithelzellen
CD	Cluster der Differenzierung
cDNA	kopierte DNA-Moleküle aus reverser Transkription von RNA-Molekülen
CDR	komplementär-bestimmende Region
coatens	Beschichten einer Oberfläche
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	dendritische Zelle
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
F/U/V-bottom	flacher/gewölbter/kegelförmiger Boden der Zellkulturplatte
FACS	Fluoreszenz-basierte Zellsortierung/Durchflusszytometrie
FU	Fluoreszenzeinheit
g	Gramm
H₂O	Wasser
HS	hohe Empfindlichkeit
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1/CD54
IL-xR	Interleukin-x-Rezeptor
IL	Interleukin
Index	Nukleinsäure-Barcode
kbp	Kilo-Basenpaare
KGF	Keratinocyten-Wachstumsfaktor
m	milli
MACS	Magnet-basierte Zellsortierung
Mb	Megabasen
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäuren
mM	Konzentrationseinheit milli mol pro Liter
MMP	Matrix-metalloprotease
Mock	Kontrollprobe eines Experiments ohne zu untersuchendes Agens
MolBio-grade	DNase-, RNase-, Protease- und Nukleinsäure-frei
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
µM	mikro mol pro Liter
n	nano
NGS	Next-Generation-Sequencing

NK	Negativkontrolle
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nM	nano mol pro Liter
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor
PHA	Phytohaemagglutinin
Primer	kurzes Nukleinsäureoligomer für die PCR
(q)PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
RB27	RPMI-Zellkulturmedium mit RB27-Supplement
RANTES	entzündungsassoziiertes Zytokin (auch CCL5 genannt)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPL13A	Ribosomales Protein L13a
RPMI⁺	RPMI-Standardzellkulturmedium (inkl. FCS)
RSS	Rekombinations-Signalsequenz
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Setting	experimenteller Aufbau
Stk.	Stück
T-Zelle	Immunzelle, die sich im Thymus entwickelt
T	Temperatur
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Target	Zielmolekül
Template	Nukleinsäureblaupause für die PCR
TEMRA	terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszellen
TexMACS	T-Zell-Kulturmedium des Herstellers Miltenyi
TGF-α	transformierender Wachstumsfaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZR/TCR	T-Zell-Rezeptor
V	Volt
VEGF	vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
Well	Vertiefung einer Zellkulturplatte
x g	Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Zell-Mikroumgebungs-Interaktionen.	20
1.2.	Die zelluläre Mikroumgebung.	21
2.1.	Fragmentlängen des „Hyperladder 50 bp DNA ladder“.	40
3.1.	Vergleich der TZRV δ 1-CDR3 Sequenzen des peripheren panV δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Pools und von V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen eines Spenders.	47
3.2.	Analysen der TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen des peripheren panV δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Pools via NGS.	49
3.3.	TZRV δ 1-CDR3-Fragmentlängenanalysen der V δ 1 ⁺ DN und V δ 1 ⁺ CD8 ⁺ T-Zell-Pools dreier Spender.	49
3.4.	Nachweis der IL2-Rezeptoruntereinheiten auf V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	51
3.5.	Genexpression ausgewählter Transkriptionsfaktoren und Komponenten der frühen thymischen T-Zell-Entwicklung.	53
3.6.	<i>Rag</i> -Genexpression.	54
3.7.	<i>Notch</i> -Genexpression der V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klone.	55
3.8.	Genexpression der Notch-Liganden.	55
3.9.	Genexpression ausgewählter Notch-Targets und Notch-Antagonisten.	56
3.10.	CD40-Oberflächenexpression auf V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Progenitoren.	57
3.11.	Oberflächenexpression von CD1a/c/d auf zwei V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	58
3.12.	Genexpression repräsentativer Integrinuntereinheiten.	59
3.13.	Bubble-Plot der Genexpressionen ausgewählter Integrine.	60
3.14.	Integrine auf V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	61
3.15.	<i>ARAP</i> -Genexpression in V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Progenitoren relativ zu <i>rpl13a</i>	61
3.16.	Genexpression von <i>Lair-1</i> in V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	62
3.17.	Lair-1 auf peripheren panV δ 1 ⁺ T-Zellen und kultivierten V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	62
3.18.	Genexpression von <i>adam10</i> und <i>adam17</i> MMPs in V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	64
3.19.	CXCR4 auf sechs V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	64
3.20.	CD27, CD28 und IL17A auf V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	65
3.21.	FACS-Analyse von CD46, PD-1, CD28 und CTLA-4 auf V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen.	66
3.22.	MICA-Konzentration in Zellkulturüberständen von ruhenden $\alpha\beta$ T-Zellen und PBMCs in TexMACS und RPMI.	68
3.23.	Allgemeiner Überblick über den Aufbau der Transdifferenzierungsexperimente.	69
3.24.	Allgemeine Übersicht über die Analyseplots der Transdifferenzierungsexperimente.	70
3.25.	TSNE-Analyse des Experiments UeS1.	72
3.26.	Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS1.	73
3.27.	MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS1.	74
3.28.	TSNE-Analyse des Experiments UeS2.	76

3.29. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS2.	77
3.30. TSNE-Analyse des Experiments UeS3.	79
3.31. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS3.	79
3.32. MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS3.	80
3.33. TSNE-Analyse des Experiments UeS4.	81
3.34. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS4.	82
3.35. MICA-Konzentrationen der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS4.	83
3.36. TSNE-Analyse des Experiments UeS5.	85
3.37. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS5.	86
3.38. TSNE-Analyse des Experiments UeS6.	88
3.39. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS6.	89
3.40. MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS7.	91
3.41. TSNE-Analyse des Experiments UeS7.	91
3.42. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS7.	92
3.43. MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS8.	93
3.44. TSNE-Analyse des Experiments UeS8.	94
3.45. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS8.	95
3.46. TSNE-Analyse des Experiments UeS9.	97
3.47. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS9.	98
3.48. MICA-Konzentration der Zellkulturüberstände von PBMCs in RB27-Medium mit 0,5 oder 5 mM Glukose.	100
3.49. TSNE-Analyse des Experiments UeS10.	100
3.50. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS10.	101
3.51. TSNE-Analyse des Experiments UeS11.	103
3.52. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS11.	104
3.53. TSNE-Analyse des Experiments UeS12.	107
3.54. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS12.	108
3.55. Genexpression Ue13.	109
3.56. TSNE-Analyse des Experiments UeS13.	111
3.57. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS13.	112
3.58. TSNE-Analyse des Experiments UeS14 mit Klon VSK2-13.	114
3.59. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS14 mit Klon VSK2-13.	115
3.60. TSNE-Analyse des Experiments UeS14 mit Klon HHK1-1.	116
3.61. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS14 mit Klon HHK1-1.	117
3.62. TSNE-Analyse des Experiments UeS15.	119
3.63. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS15.	120
3.64. TSNE-Analyse des Experiments UeS16.	121

Abbildungsverzeichnis

3.65. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS16.	122
3.66. TSNE-Analyse des Experiments UeS17.	125
3.67. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS17.	126
3.68. TSNE-Analyse des Experiments UeS18 eines Klonmixes.	128
3.69. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS18 mit einem Klonmix. . .	129
3.70. TSNE-Analyse des Experiments UeS18 Donor 1.	130
3.71. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS18 Donor 1.	131
3.72. TSNE-Analyse des Experiments UeS18 Donor 2.	132
3.73. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS18 Donor 2.	133
3.74. TSNE-Analyse des Experiments UeS19.	134
3.75. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS19.	135
3.76. TSNE-Analyse des Experiments UeS20 Donor 1.	137
3.77. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS20 Donor 1.	138
3.78. TSNE-Analyse des Experiments UeS20 Donor 2.	139
3.79. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS20 Donor 2.	140
3.80. TSNE-Analyse des Experiments UeS21.	143
3.81. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS21.	144
3.82. TSNE-Analyse des Experiments UeS22.	146
3.83. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS22.	147
3.84. TSNE-Plot Analysis of Experiment UeS23.	149
3.85. Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS23.	150
A.1. Untersuchung auf Vorhandensein von membrangebundenem VLA4 und VLA5.	170
A.2. Dot-Plot der CD2- und CD58-Signale auf zwei V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen. . . .	170

Tabellenverzeichnis

1.1.	Funktionelle Segmente der TZR-Ketten.	16
2.1.	Geräte	28
2.2.	Software	29
2.3.	Verbrauchsmaterialien	30
2.4.	Reagenzien/Kits	30
2.5.	Chemikalien	31
2.6.	Zellkulturmedien und Supplemente	31
2.7.	Enzyme	32
2.8.	Zelllinien	32
2.9.	Medien	32
2.10.	Puffer	32
2.11.	Antikörper	33
2.12.	Primer	33
2.12.	Primer	34
2.13.	Übersicht der Gating-Strategie für die Analysen der CD-Marker.	37
2.14.	Standard PCR-MasterMix für 10 µl Reaktionsvolumen.	40
2.15.	Standard PCR-Programm.	40
2.16.	QPCR-MasterMix für 10 µl Reaktionsvolumen.	41
2.17.	QPCR-Standardprogramm.	41
2.18.	BigDye® PCR-MasterMix.	43
2.19.	BigDye® PCR-Programm.	43
2.20.	NGS AdapterPCR-MasterMix.	44
2.21.	Q5® Polymerase PCR-Programm der AdapterPCR.	44
2.22.	NGS IndexPCR-MasterMix.	44
2.23.	Q5® Polymerase PCR-Programm der Index-PCR.	45
3.1.	TZRVδ1-CDR3-Sequenzen von 29 <i>ex vivo</i> kultivierten Vδ1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Klonen eines Donors.	48
3.2.	Top-30 der über NGS-generierten TZRVδ1-CDR3-Sequenzen des Peripheren Vδ1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Pools eines Spenders.	50
3.3.	Analyse Aktivierungszustandes von panVδ1 ⁺ T-Zellen in der Standardkultur.	51
3.4.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS1.	71
3.5.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS2.	75
3.6.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS3.	78
3.7.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS4.	81
3.8.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS5.	84
3.9.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS6.	87
3.10.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS7.	90
3.11.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS8.	93
3.12.	Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS9.	96

Tabellenverzeichnis

3.13. MICA-Konzentrationen der Zellkulturüberstände von PBMCs in RB27-Medium mit 0,5 oder 5 mM Glukose.	99
3.14. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS10.	102
3.15. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS11.	103
3.16. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS12.	106
3.17. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS13.	110
3.18. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS14 für die beiden Klone VSK2-13 und HHK1-1.	113
3.19. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS15.	118
3.20. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS16.	121
3.21. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS17.	124
3.22. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS18 für beide Spender.	127
3.23. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS19.	134
3.24. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS20 für beide Spender.	137
3.25. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS21.	142
3.26. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS22.	145
3.27. Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS23.	148

1. EINLEITUNG

1.1. Das humane T-Zell-Kompartiment

1.1.1. Das T-Zell-Repertoire und $\alpha\beta$ T-Zellen

Der Gesundheitszustand des menschlichen Körpers wird jede Sekunde von den Zellen des Immunsystems überwacht und aufrechterhalten, indem sie Krankheitserreger und entartete Körperzellen erkennen und bekämpfen. Generell setzt sich das humane Immunsystem aus einem angeborenen und dem adaptiven Teil zusammen. Ersteres ermöglicht eine schnelle Immunaktivierung, die durch die Bindung von Immunzelltypspezifischen Mustererkennungsrezeptoren an relativ universelle Molekülklassen auf den Zielzellen eingeleitet wird. Charakteristische Zelltypen des angeborenen Immunsystems umfassen myeloische Dendriten (DC), Makrophagen und NK-Zellen. Sie sind für die First-Line-Abwehr und die Initiierung der Immunantwort sowie für die Clearance-Mechanismen während der Wundheilung verantwortlich (1). Ein prominentes Beispiel für eine angeborene Immunabwehrstrategie ist die Erkennung von Pathogenen über Toll-like-Rezeptoren, die extrazelluläre mikrobielle Lipide und Proteine, aber auch intrazelluläre pathogen-abgeleitete Nukleinsäuren, wahrnehmen können und über die Aktivierung von NF- κ B die Immunantwort einleiten (1, 2). Der andere Teil des Immunsystems wird hauptsächlich von lymphatischen B-Zellen und T-Zellen gebildet - die sogenannte adaptive Immunität. Im Gegensatz zu den Zellen der angeborenen Immunität zeichnen sich diese Zelltypen durch ihren individuellen B- bzw. T-Zell-Rezeptor aus, ein zellspezifisches Molekül, das eine gezielte Aktivierung nach Antigeninteraktion und eine antigenspezifische Gedächtnisbildung ermöglicht (3). Da dieser Rezeptor für jede einzelne B- und T-Zelle individuell ist, ermöglicht die klonale Expansion der antigenreaktiven adaptiven Immunzellen eine effektive gezielte Abwehr gegen viele Krankheitserreger.

Vor dem Hintergrund, dass die ungefähre Gesamtzahl der T-Zellen im menschlichen Körper in der Größenordnung von 10^{12} liegt, kann das gesamte T-Zell-Repertoire geschätzt bis zu 10^7 verschiedene Antigene erkennen (4–6). Die TZR der T-Zellen, als Aktivierungsstelle der adaptiven Immunantwort, ermöglichen deren Diversitätspotenzial was wiederum die Rolle des TZR als Schlüsselmolekül des extrem potenten gezielten Abwehrmechanismus gegen die Pleiotropie von Pathogenen hervorhebt (4, 6). Die große Anzahl unterschiedlicher TZRen wird durch den Prozess der V(D)J-Rekombination gebildet. Dabei wird jeder der vier genetischen Loci der TZR-Ketten, zufällig neu rekombiniert und dabei gleichzeitig individualisiert (siehe 1.1). Neben der Verknüpfung der verschiedenen variablen (V), verbindenden (J) und konstanten (C) Regionen aller vier TZR-Ketten-Loci, enthalten die genetischen Loci der TZR β und TZR δ -Kette eine zusätzliche Diversitäts-Region (D). Während der Rekombination können an den Rekombinationsbruchpunkten (RSS) zwischen den Segmenten zusätzliche Nukleotide eingeführt oder gelöscht werden, was den Grad der Variabilität zusätzlich deutlich erhöht (1). Durch Kombination einer rekombinierten TZR α mit einer TZR β oder einer TZR γ mit einer TZR δ -Kette wird der Individualisierungsprozess eines jeden zellspezifischen TZRs ab-

1. EINLEITUNG

geschlossen. Drei hypervariable Segmente entstehen bei der Rekombination jeder Rezeptorkette, die sogenannten CDR1, CDR2 (beide innerhalb des V-Segments) und eine CDR3-Region, bilden die einzigartige Antigen-Bindungsschnittstelle des TZR. Sie sind die Grundlage der hohen Diversität und Spezifität des T-Zell-Pools (1). Die CDR3-Region, die durch Rekombination an der V(D)J-Verbindungsstelle entsteht bildet das Zentrum der Antigenbindungsfurche und dominiert die Individualität jedes TZR (1). In T-Zellen ist der kritische Vorgang der V(D)J-Rekombination auf einen bestimmten Entwicklungsschritt limitiert und es wird davon ausgegangen, dass sie im Laufe der weiteren Entwicklung nicht reaktiviert wird (1).

Tabelle 1.1.: Funktionelle Segmente der TZR-Ketten. Abgeleitet von (7, 8) und Chien *et al.* (9). In Klammern steht die Anzahl der V-Segmente aus Kombination der TZR $V\alpha$ und TZR $V\delta$ -Loci.

Gene	Anzahl der funkt. Gensegmente			
	V	D	J	C
α-Kette	43-45 (46-48)		50	1
β-Kette	40-48	2	12-13	2
γ-Kette	4-6		5	2
δ-Kette	3 (7-8)	3	3	1
		$\alpha\beta$TZR		$\gamma\delta$TZR
max. Anzahl möglicher Kombinationen ^a		10^{16}		10^{18}

^ainkl. weiterer Diversifikationsmechanismen

Die Aktivierung einer $\alpha\beta$ T-Zell wird durch die Bindung des spezifischen MHC-restringierten Antigens über den TZR im Komplex mit Co-stimulatorischen Molekülen (z. B. dem CD3-Komplex mit seinen ITAM-Motiven), was einer Outside-In-Signaltransduktion entspricht (1). Insbesondere phosphorylierte Tyrosinreste innerhalb der ITAM-Motive des TZR-Komplexes dienen als Interaktionspartner der SH2-Domänen von Kinasen. Ein für T-Zellen charakteristisches Beispiel ist die CD4/8-assoziierte Src-Kinase Lck, deren Phosphorylierung von ITAM-Motiven die Etablierung einer intrazellulären Signalkaskade über die Aktivierung von ZAP-70 ermöglicht (1). In T-Zellen führt die ZAP-70-Aktivierung zur Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege: erhöhtem Stoffwechsel über Akt, aktivierten Transkriptionsfaktoren über PLC- γ , Zytoskelettlagerung über Vav und erhöhter Adhäsion durch Integrine über ADAP. Der Ca^{2+} -Efflux aus dem ER in das Zytosol ist ein Kennzeichen der PLC- γ -Signalkaskade über PIP₂ und IP₃, was zum Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol führt und die *IL-2*-Genexpression durch verschiedene Transkriptionsfaktoren induziert (1). Aufgrund der multifaktoriellen Natur der TZR-Signalkaskade kann die spezifische Antigen-Interaktion auch künstlich umgangen werden, zum Beispiel durch eine Kombination von CD3/28-Stimulation, IL-12/18-Stimulation oder durch Mitogene wie PHA (10–12). Die niedrige Targetaffinität des TZR (max. 1 μ M) ermöglicht eine erhöhte Spezifität der Antigenbindung, was aufgrund der dadurch re-

duzierten Kreuzreaktivität von Vorteil ist (13).

Etwa 84 - 99,5 % aller T-Zellen tragen einen TZR, der aus einer TZR α und einer TZR β -Kette besteht - die so genannten $\alpha\beta$ T-Zellen. Diese Zellen sind die klassische T-Zell-Population, die sich in MHC-Klasse-II-restringierte CD4⁺ T-Helferzellen und MHC-Klasse-I-restringierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilen lässt. Der Prozess der V(D)J-Rekombination als Schlüsselprozess der T-Zell-Entwicklung, wird traditionell im Thymus angesiedelt. Deshalb gilt dieses Organ als DER Ort der Generierung naiver T-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen, die aus dem Knochenmark einwandern (14, 15). Interessanterweise begrenzt die Thymusinvolution, die bereits im zweiten Lebensjahr beginnt, die Anzahl der neu generierten naiven T-Zellen mit zunehmendem Alter immer mehr (16). In Kombination mit dem altersbedingten Zelltod führt dieser Prozess zu einer reduzierten Gesamtzahl von T-Zellen, einer Schrumpfung der TZR-Pool-Diversität und damit zu einer abnehmenden Potenz der effizienten Pathogenerkennung und körpereigenen Krebsinteraktion (3, 17). Dies ist ein Grund, warum ältere und immunsupprimierte Menschen im Allgemeinen eine verminderte Immunkompetenz und eine altersabhängig dramatisch niedrigere Überlebensrate aufweisen (3, 17). Weil über die Rekonstruktion des T-Zell-Repertoires, also durch Generierung neuer naiver T-Zellen, wieder ein großer diversifizierter T-Zell-Pool ausgebildet werden kann, ist sie darüber hinaus auch für die schnelle und vollständige Immunrekonstitution junger Krebspatienten von herausragendem klinischen Interesse (3).

1.1.2. $\gamma\delta$ T-Zellen - ein Zelltyp der angeborenen Immunität?

Als Träger der charakteristischen TZR-Heteroduplexe aus TZR γ und TZR δ -Ketten vervollständigen $\gamma\delta$ T-Zellen den gesamten T-Zell-Pool, wobei ihr Anteil im Erwachsenenalter 0,5-16% beträgt (9). Interessanterweise sind $\gamma\delta$ T-Zellen die ersten T-Zellen, die während der menschlichen Entwicklung nachgewiesen werden können, ihre zahlenmäßige Dominanz wird jedoch im Verlauf der fötalen Entwicklung von $\alpha\beta$ T-Zellen abgelöst (9). Für den $\gamma\delta$ T-Zell-Pool der Peripherie wurde eine altersbedingte Verschiebung von V δ 1⁺ zu V δ 2⁺T-Zell-Dominanz berichtet (18), beim erwachsenen Menschen trägt die Mehrheit der $\gamma\delta$ T-Zellen im Blutkreislauf einen TZR der aus der V δ 2 und einer TZR γ 9-Kette besteht. Während V δ 1⁺T-Zellen den prominenten $\gamma\delta$ T-Zelltyp in Geweben und im Epithel darstellen (19), sind nur 1-5% der T-Zellen in der Blutbahn V δ 1⁺T-Zellen (20). Im Kolon und Dünndarm wurden spenderindividuell organspezifische TZR V δ 1-Ketten nachgewiesen (19). Basierend auf der Verwendung der verschiedenen TZR γ - und TZR- δ -Ketten können $\gamma\delta$ T-Zellen demnach verschiedenen Organen zugeordnet werden, was auf die Existenz von zielspezifischen Homing-Molekülen und die Entwicklung eines organspezifischen $\gamma\delta$ TZR-Pools hinweist (21).

Ein wesentlicher Unterschied der $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen, neben der geringeren Gesamtzellzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen, ist die dominante Wirkungsweise der $\gamma\delta$ T-Zell-Subtypen, die $\gamma\delta$ T-Zellen eher der angeborenen Immunität zuordnet (22). Als einer der

1. EINLEITUNG

ersten Immunzelltypen am Ort der Verletzung/Entzündung helfen $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Initiierung und Regulierung der Immunantwort (9). Sie sind zum Beispiel die wichtigsten epithelialen IL-17-Produzenten in chronischen, Psoriasis-assoziierten Läsionen, werden aber auch als Reaktion auf akute CMV-Infektionen schnell hoch reguliert (9). Das Vorhandensein von $\gamma\delta$ T-Zellen neben $\alpha\beta$ T-Zellen in verschiedenen Spezies deutet darauf hin, dass dieser T-Zelltyp eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Immunkompetenz hat (9). Ein weiterer interessanter Aspekt ist die große potentielle TZR-Pool-Diversität. Insbesondere aufgrund der großen TZR δ -Ketten-Diversität haben $\gamma\delta$ T-Zellen mit ca. 10^{18} möglichen Kombinationen das höchste Diversitätspotenzial (9); siehe Tab. 1.1). Diese riesige Anzahl möglicher CDR3-Sequenzen ermöglicht in der Theorie ein extrem breites Spektrum der Antigenerkennung. Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen sind $\gamma\delta$ T-Zellen nicht auf die Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle angewiesen, sondern binden beim Menschen eher an Autoantigene wie nicht-polymorphe CD1c/d-Sulfatidmoleküle oder hoch-polymorphe (individuelle) Zellstressmoleküle wie MICA/B, aber auch mikrobielle Phosphoantigene (9, 23–25). Diese Unterschiede deuten auf eine konservierte und vielleicht evolutionär früher entwickelte Art der Immunität hin, die ein alternatives Immunkompartiment zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem aufbaut - die sogenannte Übergangsimmunität („transitionale Immunität“) - die auf der Überwachung autologer Moleküle beruht (1, 9, 22).

1.1.3. $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen als $\alpha\beta$ T-Zell-Progenitoren

Eine kürzlich erschienene Arbeit von Darvey und Kollegen zeigt die hochdiverse Natur des menschlichen embryonalen $V\delta 1^+$ TZR-Pools im Gegensatz zum viel fokussierteren CDR3-Pool der $V\delta 1^+$ TZR-Ketten gesunder adulter Individuen (26). Bei Erwachsenen erscheint das $V\delta 1^+$ T-Zell-Kompartiment klonal, aber privat zu sein, was die Wahrscheinlichkeit eines potenten Selektionsprozesses basierend auf individuellen Liganden erhöht (26). Basierend auf den Erkenntnissen unserer Gruppe hat ein Subtyp von $V\delta 1^+$ T-Zellen, die den CD4 Co-Rezeptor tragen, einen Progenitor-Charakter mit dem Potenzial, die T-Zell-Klasse zu wechseln und während der *in vitro* Kultur spontan in funktionelle $\alpha\beta$ T-Zellen zu transdifferenzieren (20). Genetisch ist eine Transdifferenzierung von $\gamma\delta$ zu $\alpha\beta$ T-Zellen möglich, da der δ -Ketten-Locus innerhalb des α -Ketten-Locus liegt und in $\gamma\delta$ T-Zellen funktional ist (1). Im Gegensatz dazu ist eine Transdifferenzierung von $\alpha\beta$ zu $\gamma\delta$ T-Zellen nicht mehr möglich, weil der TZR δ -Locus während der Rekombination der TZR α -Ketten-Lokus ausgeschnitten wird (1). Das Vorhandensein des CD4-Co-Rezeptor-Moleküls auf $V\delta 1^+CD4^+$ -Progenitor-T-Zellen ist ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion mit einer MHC-Klasse-II-tragenden Zelle. MHC-Klasse-II-Moleküle sind charakteristisch für APCs und können auf lymphatischen Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Thymusepithelzellen (z. B. cTEC und mTECs) nachgewiesen werden (1, 27). Kontraintuitiv sind Liganden von $\gamma\delta$ T-Zellen bisher allerdings nicht als MHC-restringiert beschrieben, sondern als nicht-klassische MHC-Klasse-I-Moleküle (z. B. CD1 und MICA/B, s. o.) (9, 23,

24, 28).

Zu einem frühen Zeitpunkt nach der positiven Isolierung exprimieren $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellklone nur geringe Mengen von $V\delta 1^+$ auf ihrer Oberfläche, die mit der Kulturzeit zunehmen (unveröffentlichte Daten). Die bisherigen molekularen Charakterisierungen der AG Schilbach zeigten, dass $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellklone geringe Mengen des Markers für unreife hämatopoetische Stammzellen/Progenitoren CD34 sowie FLT3 und $c-kit^{lo}$ tragen und damit multipotenten hämatopoetischen Progenitoren (MPP), CLPs (*common lymphoid progenitor*), linlo ETPs und kanonischen DN1-eingestuftes Thymozyten ähneln (20). Ähnlich wie T-Zell-Vorläufer im DN1-Stadium sind $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellklone $CD34^+ CD38^+$ Zellen die im Laufe der *ex vivo* Kultur CD2 positiv werden (20). Transkriptomanalysen zeigten dominante Expressionsniveaus des Transkriptionsfaktors *gata-3* im Vergleich zu niedrigeren bzw. negativen Transkriptionsniveaus von *T-bet*, *rosc* und *foxp3*. Nach *in vitro* T-Zell-Stimulation durch Aktivierung von PKC über PMA/Ionomycin-Behandlung war in $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klonen auf Proteinebene eine breite Palette von T_{H1} , T_{H2} , regulatorischen und pro-inflammatorischen Zytokinen wie z. B. TGF- β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ und TNF- α nachweisbar (20). Aufgrund der fehlenden Oberflächenexpression von CD45RA (charakteristisch für naive, thymische Emigranten), CD62L und CCR7 (Homing zu sekundären lymphoiden Organen) und CD27 (Generierung und Langzeitimmunität), während sie CD45RO-positiv sind, wurde berichtet, dass $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellklone Effektor-Gedächtniszellen ähneln (20, 29). Interessanterweise wurde auch nachgewiesen, dass $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen positiv für die Chemokinrezeptoren CCR4, CXCR1/2, CCR6 und CXCR4 sind, welche T-Zellen zu Entzündungsherden leiten (20). Nach der Stimulation von pan $V\delta 1^+$ -T-Zellen mit Zytokinen, die milde und akute Entzündungen imitieren, konnte die Rekombination des TZR α -Lokus mittels Fragmentlängenanalyse nachgewiesen werden (20).

Zusammenfassend weist die molekularbiologische Charakterisierung von $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen auf einen $\alpha\beta$ T-Zell-Vorläuferzelltyp hin, der die Fähigkeit hat, in entzündliche Milieus einzuwandern, während der Kontext der Transdifferenzierung selbst noch unbekannt ist.

1.2. Mikroumgebungen

1.2.1. Zellen in Mikroumgebungen - Konsumieren, Wahrnehmen, Anpassen, Präsentieren, Sekretieren

Jede Zelle steht in ständigem Austausch mit ihrer jeweiligen Mikroumgebung. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen sind als Immunzellen hochspezialisiert auf die Überwachung und spezifische Reaktion auf bestimmte zelluläre Trigger. Um fein abgestimmte Interaktionen mit dem extrazellulären Raum zu ermöglichen, gibt es hochspezialisierte Moleküle auf der Zelloberfläche, die eine OUTSIDE-IN-Signalweiterleitung ermöglichen (Abb. 1.1). Bei $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen ermöglichen ne-

1. EINLEITUNG

ben dem charakteristischen TZR-Komplex, der aus den beiden einzelnen TZR-Ketten und dem CD4-Co-Rezeptormolekül besteht, zusätzlich verschiedene andere Moleküle (wie z. B. Integrine, Lair-1, Notch-Moleküle) die Interaktion mit und damit die Reaktion auf externe Signale (INSIDE-OUT-Signalweiterleitung, siehe Abb. 1.2 und V δ 1⁺CD4⁺-Charakterisierung, beschrieben in 1.1.3).



Abbildung 1.1.: Zell-Mikroumgebungs-Interaktionen. Jede Zelle hat die Fähigkeit, den Zustand ihrer Mikroumgebung über OUTSIDE-IN-Signalweiterleitung durch Substrataufnahme (Osmose, Endozytose, Transportkanäle) und die Bindung von extrazellulären Liganden zu erfassen. Auf diese Weise wird das zelluläre Verhalten beeinflusst und in Bezug auf den Zustand der Mikroumgebung umprogrammiert/angepasst. In der Folge werden der Stoffwechsel, das Sekretom und die Oberflächenmolekülexpression der Zelle verändert, was zu einer veränderten Mikroumgebung führt (INSIDE-OUT-Signaltransduktion).

1.2.2. Extrazelluläre Komponenten und der Einfluss des Zellsekretoms

Jede physiologische Mikroumgebung ist durch ihre zelluläre und nicht-zelluläre Zusammensetzung gekennzeichnet, die beide miteinander interagieren und voneinander abhängen. Wie oben beschrieben, ist jede Zelle in der Lage, Umweltveränderungen zu überwachen und sich anschließend an die gegebenen Umstände anzupassen, indem sie ihr aktives genetisches Programm (Transkriptom) ändert. Dabei passt sich auch der „zelluläre Output“ - das sogenannte Sekretom - den Reizen an. Im Allgemeinen können Liganden von Oberflächenrezeptoren lösliche oder oberflächengebundene Moleküle auf Zellen oder der ECM sein.

Aufgrund der permanenten Anwesenheit vieler Interaktionspartner und der Tatsache, dass derselbe Ligand oberflächengebunden oder in löslicher Form inverse Effekte der Zielzellen induzieren kann (z. B. MICA/B-Shedding von Tumorzellen, (30, 31)) sowie in Abhängigkeit vom Kontext anderer Interaktionspartner, sind hochdimensionale Kommunikationsprozesse zwischen jeder Zelle und ihrer Mikroumgebung vorherrschend (auch beschrieben für die thymische Mikroumgebung in 1.3.1).

Interessanterweise zeigten funktionelle Untersuchungen der Sekretome von nicht bestrahlten und bestrahlten PBMCs, dass die Sekretome dieser beiden Proben in Abhängigkeit von der *ex vivo*-Behandlung entweder pro-inflammatorische (nicht bestrahlt)

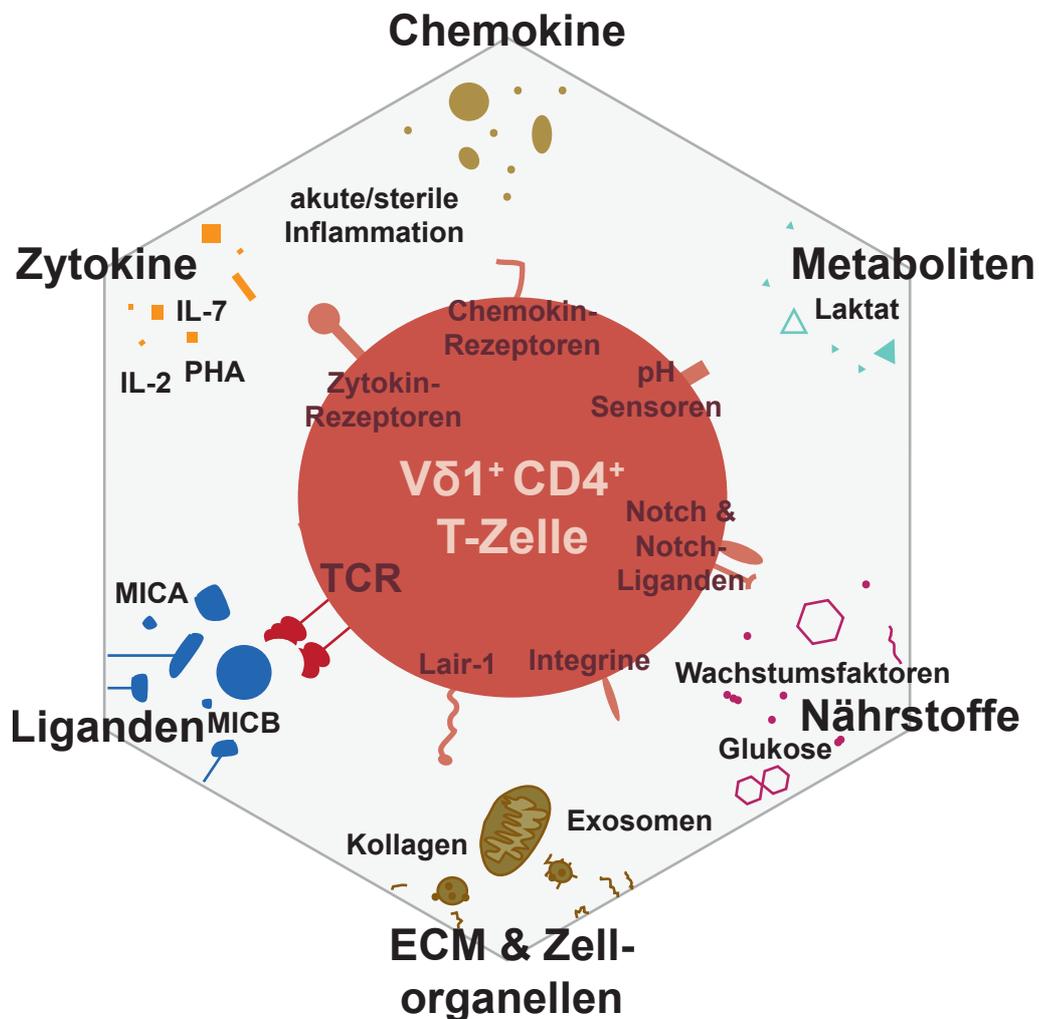


Abbildung 1.2.: Die zelluläre Mikroumgebung. Diese Grafik gibt einen vereinfachten Überblick über die Komponenten der Mikroumgebung, die das Verhalten jeder Vδ1⁺CD4⁺-T-Zelle durch Interaktion mit einer zellulären Komponente (z. B. über einen Rezeptor) oder ihrem Metabolismus beeinflussen können. Zelluläre Signale/Reaktionen sind abhängig von der Art der Interaktion mit einer bestimmten Komponente, also z. B. löslichen oder oberflächengebundenen Substraten. Dies ist besonders wichtig für die Analyse von Interaktionen mit Liganden, Zellorganellen und ECM-Komponenten.

1. EINLEITUNG

oder wundheilende (bestrahlt) Effekte haben (32–34). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Exosomen- und Proteinfractionen der konditionierten Überstände die relevanten Komponenten enthalten. Außerdem berichteten Wagner und Kollegen, dass das unfraktionierte Sekretom selbst und nicht die isolierten Komponenten die günstigste Wirkung im Wundheilungskontext haben (34). Zusätzlich wurde eine Altersabhängigkeit des Lymphozytensekretoms, durch Untersuchungen ihres Potenzials zur Steigerung der Muskelzellproliferation und -migration, identifiziert (35).

1.3. Mögliche Kontexte der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Transdifferenzierung

1.3.1. Analogie zur thymischen T-Zell-Entwicklung

Wie oben beschrieben sind T-Zellen nach dem Thymus benannt, als dem Organ, das auf die Entwicklung reifer naiver T-Zellen spezifiziert ist. Dieses Organ setzt sich aus drei Hauptzelltypen zusammen: Stromazellen, Epithelzellen und hämatopoetische Zellen (36). Jeder T-Zell-Vorläufer durchläuft spezifische Entwicklungsstadien innerhalb von sieben verschiedenen intra-thymischen Mikroumgebungen, die hauptsächlich von nicht-hämatopoetischen Stromazellen gebildet werden (für die Maus im Review von (37, 38)). $CD34^+CD38^-$ hämatopoetische Stammzellen verlassen dabei das Knochenmark und treten an der CMJ in den Thymus ein, wo sie zu frühen Thymus-besiedelnden Progenitoren (TSPs *thymus seeding progenitors*) werden. Diese heterogene Population reift zu *early thymic progenitors* (ETPs) heran. ETPs sind noch multipotente Vorläufer und verbleiben etwa 10 Tage an der CMJ, bevor sie zu $CD34^+CD38^+$ DN1-Zellen werden (z. B. (37–41)). Die Hochregulierung von CD1a charakterisiert den Abschluss des „T-lineage commitment“ im thymischen DN2-Stadium. In diesem Stadium wird von einer $\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$ Divergenz der T-Linien über Notch-Signale und die Rekombination der TZR γ - und TZR δ -Loci berichtet (37).

Charakteristisch für das DN3-Stadium ist die Initiierung des V(D)J-Rearrangements des β -Locus und die Expression von CD1a bei gleichzeitiger vollständiger Herunterregulation von CD34 (39, 41). Anschließend wird die Funktionalität der TZR β -Kette im Komplex mit der präT α -Kette (β -Selektion) im so genannten präTZR-Komplex getestet, die CD38-Expression stoppt, wenn ein funktioneller präTZR identifiziert wird und die Zellen werden $CD4^+$ (DN4 Stadium) (37, 38). Während dieser Prozesse wandert eine Zelle von der CMJ durch den inneren Kortex in den äußeren Kortex, wobei sich DN3-Zellen in der subkapsulären Zone ansammeln (im Review von (37, 38)). Wenn die präTZR-MHC-Interaktion fehlschlägt, kann die TZR β -Kette ein weiteres Mal rekombiniert werden, wenn diese funktionell ist wird im humanen Thymus auf den ISPs die $CD4^+$ sind CD8 auch hochreguliert, was zum DP-Stadium und anschließend zur TZR α -Kettenumlagerung führt (37, 38). Auf dem Weg zurück in die Medulla, aber immer noch innerhalb des Kortex, interagiert der TZR der Thymozyte mit MHC-Molekülen auf cTECs (kortikale Epithelzellen) in einem Prozess, der „positive Selektion“ genannt wird, um den TZR auf seine MHC-

1.3. Mögliche Kontexte der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Transdifferenzierung

Bindungsfähigkeit zu überprüfen (1, 37). Durch Interaktion mit MHC-Molekülen auf Stromazellen und/oder deren Sekretom (z. B. über IL-7-Signalisierung) wird eines der beiden Co-Rezeptormoleküle CD4 oder CD8 herunterreguliert, was zur Bildung von SP-Zellen führt (37). In der äußeren Medulla werden diese SP-Zellen, die in der Lage sind, an MHC-Moleküle zu binden, negativ auf DCs selektiert (die von mTECs exprimierte Selbstantigene präsentieren), um Selbsttoleranz zu gewährleisten. Dies geschieht indem die Apoptose derjenigen SP-Zellen induziert wird, die TZR mit hoher Affinität für MHC-gebundene Selbstantigene tragen (1, 37, 38).

Ein Signalweg mit herausragender Bedeutung für die Thymozytenentwicklung ist der Notch-Signalweg. Er wurde als essentiell für Proliferation und Überleben während der T-Zellentwicklung bis zum Stadium DN3a (welches mit der β -Selektion endet), dem T-Zell-Commitment und der $\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$ T-Zell-Linienentscheidung berichtet (auch präT α -Kettenexpression) (38, 42, 43). Eine hohe Notch-Aktivität wurde dabei als förderlich für die T-Zell-Entwicklung im Allgemeinen beschrieben, verschiebt aber das „ $\alpha\beta$ lineage commitment“ zugunsten der $\gamma\delta$ T-Zell-Entwicklung (43). Bei Säugetieren gibt es vier Notch-Moleküle (Notch 1-4), die mit Jagged- und Delta-like Liganden interagieren. Innerhalb des Thymus werden vier Notch-Liganden, nämlich Dll1, Dll4, Jag1 und Jag2, mit einem individuellen Raum-Zeit-Muster exprimiert (44). Notch-Liganden binden an die extrazelluläre Domäne (ECD) der Notch-Rezeptoren (1, 5). Die Ligandenbindung führt zu zwei Protease-vermittelten Spaltungsschritten (über ADAMs und γ -Sekretase), die den zytoplasmatischen Notch-Anteil (NICD) abschneiden, der wiederum in den Zellkern wandert und dadurch die Transkription von Zielgenen über den CSL-Transkriptionskomplex moduliert (5, 43, 45–47). Das Potenzial der Notch-vermittelten Induktion der T-Zell-Entwicklung wurde durch *ex vivo*-Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) auf transgenen hDLL1/4-exprimierenden murinen Stromazellen (OP9-hDLL1/-hDLL4) oder DLL-4-exprimierenden humanen Fibroblasten gezeigt, wobei humane Fibroblasten interessanterweise als weniger effizient als die transgene murine Zelllinie berichtet wurden (48, 49). Zusätzlich konnten in extrem vereinfachten *in vitro* Assays mit plattengebundenem Dll4 proT-Zellen (50) und DP-Thymozyten (51) aus HSCs und DN3-Thymozyten generiert werden. Erstaunlicherweise wurde in peripheren CD4-T-Zellen eine um einige Stunden verzögerte Bypass-Aktivierung der Notch-Signalkaskade durch vorhergehende TZR-Stimulation alleine beobachtet (52).

Neben dem räumlich klar definierten intrathymischen zellulären Kontext, der Zell-Zell-Kontakte ermöglicht, sind thymische Mikroumgebungen auch durch ihr individuelles Set an sezernierten Molekülen und Organellen (z. B. Zytokine, Chemokine, Hormone und Exosomen) charakterisiert (53). In (36) berichteten Yarilin und Kollegen von Zytokinen als parakrine und autokrine Mediatoren der Interaktion zwischen Stromazellen und/oder Thymozyten. Im Gegensatz zu ihrer Wirkungsweise in der Peripherie ermöglichen entzündungsassoziierte Zytokine im Thymus konstitutive Vorgänge wie Migration und T-Zell-Entwicklung (36): Stromazell-abgeleitetes IL-7, das maximal in der subkapsulären Zone vorkommt, ist verantwortlich für Zellwachstum, Überleben und Differenzie-

1. EINLEITUNG

rung von DN-Thymozyten, während $\text{IFN-}\gamma$ ein beispielhafter Thymozyten-abgeleiteter TEC-Aktivierungsmediator ist. Ein weiteres Beispiel ist IL-2, das einen Selbststimulations-Kreislauf der Thymozyten ermöglicht (36). Interessanterweise wurde für Thymozyten in der DP-Phase (einschließlich TZR-Rearrangement und Selektionsprozesse) berichtet, dass zytokinvermittelte Interaktionen entbehrlich sind und die Zytokinsekretion (z. B. $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 und $\text{TNF}\alpha$) ausbleibt, weil die Zytokin-induzierte Signalweiterleitung in diesem T-Zell-Stadium vollständig blockiert ist (36). Insbesondere die in der subkapsulären Zone gelegenen TECs sowie mTECs, wurden als Hauptproduzenten von Hämopoietinen (z. B. IL-7, GM-CSF, SCF und IL-15), proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 α , IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$), Zytokinen der IL-6-Familie und supressiven Zytokinen (TGF β) beschrieben (36). IL-7, IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ seien an der Differenzierung von präT-Zellen und am V(D)J-Rearrangement kritisch beteiligt (36).

1.3.2. Transdifferenzierung als TZR-Revision

Nach Pamela Fink und Kollegen löst der Verlust der permanenten Interaktion eines TZR mit seinem spezifischen Liganden die Rag-Reinduktion und damit die TZR-Revision aus (54, 55). Sie zeigten, dass murine CD4-T-Zellen, die transgen für Mtv8-spezifische TZR sind, als Reaktion auf permanente Mtv-8-Superantigen-Stimulation den TZR ändern können. Dies sei ein Toleranzprozess der in den Germinalzentren, dem Ort des B-Zell Ig-Klassenwechsels, bei manchen folliculären T_H -Zellen stattfindet (56, 57).

Die gezielte, kontrollierte Aktivierung von Immunzellen kann auf unterschiedliche Weise induziert werden. Einerseits können z. B. $\alpha\beta$ T-Zellen durch Erkennung ihres spezifischen MHC-präsentierten Antigens aktiviert werden, wobei die Signalstärke von der Ligandenmenge bestimmt wird (1). Andererseits kann die Immunreaktion, wie z. B. im Fall einer NK-Zelle, auch durch den Verlust der permanenten Inhibition ausgelöst werden (in (1) als „missing self“ beschrieben). Da $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen charakteristische Merkmale von angeborenen und adaptiven Immunzellen tragen, sind theoretisch beide Mechanismen möglich.

Im Kontext der $V\delta 1^+CD4^+$ TZR-Transdifferenzierung könnte die Generierung, oder der Verlust einer Interaktion zu ihrem autologen, stressinduzierten Liganden MICA/B als Auslöser der Transdifferenzierung dienen (MICA als potentieller $V\delta 1^+$ T-Zell-Ligand s. (23)). Daher wurden Interaktionsanalysen von MICA/B - dem potentiellen TZR-Liganden von $V\delta 1^+$ T-Zellen - und $V\delta 1^+CD4^+$ TZR in einer Master- und einer medizinischen Doktorarbeit auch unter meiner Betreuung durchgeführt (58, 59). In der Masterarbeit von Kiona Lim untersuchten wir verschiedene Bedingungen einschließlich der MICA/B-Expression auf verschiedenen Zelltypen und beurteilten den Einfluss von löslichen oder zell-/oberflächengebundenen MICA/B-Molekülen auf $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen über Ca^+ -Signalmuster mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie (58). Da MICA und MICB beide hoch polymorphe Proteine sind, konzentrierte sich die Dissertation von David Heister auf die Identifizierung von Donor-individuellen SNPs für *in silico* Analysen der $V\delta 1^+CD4^+$ -TZR-MICA-Bindungs-

1.3. Mögliche Kontexte der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Transdifferenzierung

stärke (Energieniveaus) im autologen und allogenen Setting (59). Interessanterweise führen ADAM-MMPs als Reaktion auf die T-Zell-Aktivierung zur Akkumulation von löslichen MICA/B-Molekülen, die kompetitiv und damit als Antagonisten der Rezeptor-Liganden-Bindung von oberflächengebundenem MICA/B wirken (30, 31).

Als möglicher Auslöser der Transdifferenzierung vor dem Hintergrund der TZR-Revision und in Vergleich zu dem für die NK-Zell-Aktivierung beschriebenen Verlust der Hemmung, wurde der Einfluss des inhibitorischen Moleküls Lair-1 untersucht. Lair-1 wurde in der Literatur als potenter Inhibitor des TZR-Signaling beschrieben, der auf fast allen Leukozytenzellen vorhanden ist und im gesunden Zustand über die ECM-Interaktion unkontrollierte Autoimmunreaktionen verhindert (60, 61). Potentiell bestünde die Möglichkeit, dass über die Lair-1-ECM-Interaktion das TZR-Signal der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen reduziert/ausgelöscht werden könnte und damit, ähnlich der TZR-Revision, die Reinduktion von RAG induziert werden könnte (siehe (55)). Dafür spräche die Analogie der Targets: sowohl Mtv8 als auch MICA sind niedrig affine Liganden mit sehr geringen Bindungsenergien.

$\gamma\delta$ T-Zellen, als ein Zelltyp der angeborenen Immunität, reagieren auf phylogenetisch konservierte Moleküle wie z. B. Stressproteine und können folglich infizierte Zellen lysieren, Zytokine und Chemokine produzieren, B-Zell-Antworten unterstützen, $\alpha\beta$ T-Zellen stimulieren, die Reifung von DCs ermöglichen und Stromazellen über Wachstumsfaktoren regulieren (s. Abschnitt 1.1.2 und (22)). Somit wäre es denkbar, dass auch andere klassische Sensoren der Mikroumgebung als Transdifferenzierungsauslöser dienen. Da Integrine sowohl an interzellulären als auch an Zell-ECM-Interaktionen und an der TZR-Signalkaskade beteiligt sind, könnten auch Integrin-Signale an der Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen beteiligt sein (62, 63).

1.3.3. Entzündung/Wundheilung als Trigger der Transdifferenzierung

Da unsere Gruppe fünf Homing-Rezeptoren für entzündetes Gewebe auf $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen identifiziert hat, nahmen wir an, dass Inflammation eine Rolle bei der Transdifferenzierung spielen könnte (wie in (20) 1.1.3 beschrieben). Allerdings war die Inflammation, wie publiziert, eher kontraproduktiv für die Transdifferenzierung. Im physiologischen Kontext wäre die logische Konsequenz die, dass eine der auf die akute entzündliche Phase folgenden Phase die Transdifferenzierung triggert.

Eming und Kollegen beschrieben die drei Phasen des Wundheilungsprozesses als Entzündungs-, Gewebebildungs- und Remodellierungsphase (64). Es spielen in allen Phasen sowohl Zell-zu-Zell-, Zell-zu-ECM-Interaktionen und die Kommunikation über lösliche Faktoren eine Rolle (64). Die Entzündung nach einer Verletzung wird durch Invasion von Zellen des angeborenen Immunsystems (Neutrophile und Makrophagen) und pro-inflammatorische Zytokine wie z. B. IL-1 β , TNF α und IFN- γ initiiert, die die Expression von adhäsiven Molekülen auf Leukozyten (z. B. ICAM-1) induzieren. Während der Inflammation wirken Chemokine wie RANTES, Wachstumsfaktoren, ROS und Stickoxide

1. EINLEITUNG

sowie ECM-Komponenten (z. B. Fibronectin, Kollagen) (64). Die Resolution der Entzündung wird über anti-inflammatorische Zytokine (wie IL-1RA/-10, löslicher TNF-Rezeptor, TGF β 1), Apoptosemediatoren (CD44), Herunterregulation pro-inflammatorischer Mediatoren, Rekonstitution der Gefäßpermeabilität und Chemokinproteolyse (MMPs) ermöglicht (64). In der Remodellierungsphase spielen T-Zellen über ihre spezifische Zytokinsekretion (IFN- γ , IL-2 und TNF α sowie IL-4/-5/-10) und CD40-medierte Interaktion mit Keratinozyten, Fibroblasten, Thrombozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle (64). In diesem Zusammenhang wurden epidermale $\gamma\delta$ T-Zellen als Regulatoren von Fibroblasten und Keratinozyten (über FGF-7/-70 und IGF-1) berichtet (64).

1.3.4. Metabolismus

Interessanterweise verwenden Stammzellen, adulte Vorläuferzellen und differenzierte Zellen in Abhängigkeit ihrer Aktivität und Mikroumgebung unterschiedliche Stoffwechselprogramme (65). Außerdem wurde berichtet, dass Veränderungen in Stoffwechselprozessen mit vielen Differenzierungsprozessen einhergehen (65). Auch die Mikroumgebung ist entscheidend. In hämatopoetischen Stammzellen wird das Vorherrschen der Glykolyse beispielsweise durch die hypoxische Nische über HIF-1 α reguliert (65). V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone sind *ex vivo* unter Standardbedingungen über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr kultivierbar sind, was ihren Stammzell-/Progenitorcharakter unterstreicht. Der Wechsel des Kulturbedingungen inkl. geringerem Nährstoffangebot (auch Glukose), Zytokinen und Mitogenen könnte die V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen zwingen sich analog zur Differenzierung von Stammzellen der neuen Mikroumgebung auf metabolischer Ebene (Glykolyse, OXPHOS, ROS) anzupassen (65). So stellten wir die Hypothese auf, dass möglicherweise auch ein Abfall des pro-proliferativen Zytokinmilieus der Standardkultur und das Wegfallen des TZR-Bypasses durch Mitogene das Transdifferenzierungsprogramm unserer Vorläuferzellen auslösen könnte.

1.4. Ziele dieser Arbeit

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zielten auf die Identifizierung möglicher Auslöser der V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Transdifferenzierung zu $\alpha\beta$ T-Zellen ab, um die gezielte Induktion dieses Prozesses für die T-Zell-Rekonstitution von T-Zell-deprivierten Patienten zu ermöglichen.

1. Dazu sollten zunächst V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone von gesunden Personen generiert und unter Standardkulturbedingungen kultiviert werden. Die vorausgehenden Arbeiten zeigten, dass V δ 1⁺CD4⁺Klone unter Standard-T-Zell-Kulturbedingungen sowohl expandierbar, als auch phänotypisch sehr stabil sind und nur eine sehr geringe spontane Transdifferenzierungsrate aufweisen.

2. Um mögliche Ansatzpunkte für eine Transdifferenzierung zu identifizieren, sollten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen anhand von Oberflächenmolekülen, ihrem Transkriptom und Proteom phänotypisiert werden. Der Fokus sollte dabei auf der Analyse von Oberflächenrezeptorklassen (wie Integrinen, Notch-Liganden und -Rezeptoren) liegen und die Genexpressionen T-Zell-Entwicklungs-spezifischer Transkriptionsfaktorprofile als auch zelluläre Mikroumgebungssensoren einschließen.
3. Durch Schaffung unterschiedlicher zellulärer Mikroumgebungen, welche denen der thymischen T-Zellentwicklung, TZR-Revision und Inflammation ähneln, soll eine systematische funktionelle Analyse potentieller Transdifferenzierungs-Trigger erfolgen.

Im Detail sollte der Fokus besonders berücksichtigen:

- das Zytokinmilieu
- MICA/B als potentielle $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Liganden
- Lair-1 als möglicher Antagonist der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Signalkaskade
- Nährstoffe, Wachstumsfaktoren und Metaboliten (Glukose, IL-2, IL-7 und Mitogenen sowie Milchsäure)
- die 3D-Struktur des experimentellen Setups
- den Kontext von akzessorischen Zellen, wie zum Beispiel aktivierten und ruhenden Immunzellen oder $panV\delta 1^+$ T-Zellen, inklusive ihres Sekretoms

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Tabelle 2.1.: Geräte

Name	Hersteller	Firmensitz, Land
ABI PRISM 3130xl Genetic analyzer	Applied Biosystems	Waltham, US
Agilent 2100 Bioanalyzer System	Agilent Technologies	Waldbronn, DE
Gelelektrophoresekammer	Preqlab by VWR	Erlangen, DE
Zählkammer (Neubauer)	Karl Hecht GmbH & Co KG	Sondheim, DE
Fluoreszenz-Imaging System (Odyssey®Fc)	Licor	Lincoln, US
Zentrifuge Rotana 46	Andreach Hettich	Tuttlingen, DE
Heraeus Pico und Biofuge Fresco Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
MiSeq	Illumina	San Diego, US
Tischzentrifuge 5424 R	Eppendorf	Hamburg, DE
Inkubator (Heraeus B12 Function Line)	Kendro Laboratory Products	Langenselbold, DE
GeneAmp™ PCR System 9700	Applied Biosystems	Waltham, US
Biorad CFX 96	Biorad	Hercules, US
Mikrowelle	De' Longhi	Treviso, IT
Invertiertes Mikroskop (IX50)	Olympus	Hamburg, DE
Pipettensatz (Transferpette)	Brand	Wertheim, DE
Pipettensatz P2-1000	Gilson	Villers-le Bel, FR
Pipette (accu-jet pro)	Brand	Wertheim, DE
Stromquelle (Consort Mini Electrophoresis E132)	Sigma Aldrich	Munich, DE
QUBIT 2.0	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
ELx800 absorbance reader	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall, DE
Spektrophotometer (NanoDrop 2000)	Fisher Scientific	Schwerte, DE
BD FACS Canto™II	BD	San Jose, US
Sterilbank (Heraeus HS18)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Vortexer (VM-300)	Gemmy Industrial	Taipeh, TWN
Wasserbad (WNB 14)	Memmert GmbH	Schwabach, DE
LSM 710 mit Zeiss AxioObserver (inkl. Software)	Carl Zeiss	Jena, DE

Tabelle 2.2.: Software

Name	Hersteller/Autor	Firmensitz, Land
Agilent 2100 expert software (ver B.02.08.SI648)	Agilent Technologies	Waldbronn, DE
macOS Mojave (Version 10.14.6)	Apple Inc.	Cupertino, US
Windows 7	Microsoft	Redmont, US
Texmaker 5.0.3 (compiled with Qt 5.9.6)	Free Software Foundation, Inc.	Boston, US
Microsoft Office 365	Microsoft	Redmont, US
FlowJo v10	FlowJo	Oregon, US
BD FACSDiva™	BD	San Jose, US
EndNote™ X8 und Version 16.43	Clarivate Analytics	Philadelphia, US
GraphPad Prism 7	Graphpad Software, Inc.	California, US
MATLAB	MathWorks, Inc.	Massachusetts, US
MiXCR Version 3.0.12	Bolotin Dmitry et al.	
JabRef 5.2	JabRef Development Team	https://www.jabref.org
R Studio (Version 1.2.5033)	1999 Free Software Foundation, Inc.	Boston, US
R (Version 3.6.3)	R Foundation for Statistical Computing	Wien, AT
ggpubr (Version 0.4.0)	(66)	
gtools (Version 3.8.2)	(67)	
data.table (Version 1.12.8)	(68)	
xtable (Version 1.8-4)	(69)	
plyr (Version 1.8.6)	(70)	
scales (Version 1.1.1)	(71)	
pheatmap (Version 1.0.12)	(72)	
writexl (Version 1.3)	(73)	
ggforce (Version 0.3.1)	(74)	
wesanderson (Version 0.3.6)	(75)	
readxl (Version 1.3.1)	(76)	
RColorBrewer (Version 1.1-2)	(77)	
forcats (Version 0.5.0)	(78)	
stringr (Version 1.4.0)	(79)	
dplyr (Version 0.8.5)	(80)	
purrr (Version 0.3.4)	(81)	
readr (Version 1.3.1)	(82)	
tidyr (Version 1.0.3)	(83)	
tibble (Version 3.0.1)	(84)	
ggplot2 (Version 3.3.0)	(85)	
tidyverse (Version 1.3.0)	(86)	

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.3.: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Firmensitz, Land
FACS tube (5 ml)	Becton Dickinson	Heidelberg, DE
96-well plate white	Brand	Wertheim, DE
DNA LoBind Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, DE
Protein LoBind Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, DE
96/48/24/12/6-Well-Zellkulturplatten	greiner bio-one	Frickenhausen, DE
Zellkulturflaschen	greiner bio-one	Frickenhausen, DE
50 ml Reaktionsgefäße	greiner bio-one	Frickenhausen, DE
15 ml Reaktionsgefäße	greiner bio-one	Frickenhausen, DE
Filterspitzen SurPhob (DNase/RNase free)	Biozym	Hessisch Oldendorf, DE
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems	Minneapolis, US
tube strips 8-well tube strips (thin walled)	VWR International	Darmstadt, DE
Qubit Assay tubes	Fisher Scientific	Schwerte, DE
Safe-Lock Reaktionsgefäße (versch. Größen)	Eppendorf	Hamburg, DE
sealing foil (Microseal 'B' Film)	Bio-Rad Laboratories	München, DE
Serologische Pipeetten (Stripetten)	VWR International	Darmstadt, DE
96-well PCR-TW-MT-plate universal, semi-skirted, transparent	Biozym	Hessisch Oldendorf, DE
96-well PCR-plate transparent für ABI Sequencer 3100/30	Biozym	Hessisch Oldendorf, DE
perforated seal für Kappilarsequenziergeräte	Biozym	Hessisch Oldendorf, DE
Reagenzienreservoirs sterile, weiß, einzeln, 50 ml	VWR International	Darmstadt, DE

Tabelle 2.4.: Reagenzien/Kits

Name	Hersteller	Firmensitz, Land
Agencourt AMPure XP beads	BeckmanCoulter	Brea, US
Agilent DNA High Sensitivity Kit	Agilent Technologies	Waldbronn, DE
DNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research	Irvine, US
DNA Clean & Concentrator-15	Zymo Research	Irvine, US
Quick-RNA Microprep Kit	Zymo Research	Irvine, US
Quick-RNA Miniprep Kit	Zymo Research	Irvine, US
NXTR® XT IDX Kit (24 IDXS, 96 SMP)	illumina	San Diego, US
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen	Hilden, DE
QUBIT dsDNA HS	life technologies	Darmstadt, DE
Human MICA DuoSet ELISA	R&D Systems	Minneapolis, US
Dynabead® CD4 Positive Isolation kit	gibco by life technologies	Darmstadt, DE
Anti-FITC Multi-Sort Kit	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, DE
autoMACS rinsing solution (MACS buffer)	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, DE
Dynabead® Human T-Activator CD3/CD28	gibco by life technologies	Darmstadt, DE
MiSeq® Reagent Nano Kit v2 (500 Cycles)	illumina	San Diego, US
FIX&PERM® Cell Fixation & Permeabilization Kit	An Der Grub Bio Research	Vienna, AT
Total Exosome Isolation Kit	invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, US

Tabelle 2.5.: Chemikalien

name	Hersteller	Firmensitz, Land
HyperLadder™ 50bp	Bioline	London, UK
Biozym LE agarose	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, DE
5x DNA Loading Buffer Blue	Bioline	London, UK
Deoxyribonukleotide (250 mM each)	Roche Diagnostics	Mannheim, DE
DNA-ExitusPlus	AppliChem	Darmstadt, DE
EDTA (250 mM)	Universitätsapotheke UKT	Tübingen, DE
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe, DE
GelRed® dye	Biotinum	Landing Parkway, US
GoTaq® qPCR MasterMix	Promega GmbH	Walldorf, DE
Heparin-Natrium-2500-ratiopharm	ratiopharm	Ulm, DE
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe, DE
MolBio-grade Wasser	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
PCR-grade Wasser	Promega GmbH	Walldorf, DE
Hi-Di™Formamid	Applied Biosystems	Foster City, US
GeneScan™600 LIZ	Applied Biosystems	Foster City, US
Wasser - Molecular Biology Reagent	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
CyoSure-DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH	Steinbach, DE
phiX control V3	illumina	San Diego, US
GeneScan™ 600LIZ™ dye Size Standard	Applied Biosystems	Foster City, US

Tabelle 2.6.: Zellkulturmedien und Supplemente

Name	Hersteller	Firmensitz, Land
Dulbecco's PBS, ohne MgCl ₂ und CaCl ₂	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
Water Double-Processed Cell Culture	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
B27 Reagenz	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
RPMI	Biochrom	Berlin, DE
RPMI	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
RPMI without D-glucose	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
TexMACS	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, DE
DMEM with Glutamax	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
L-Glutamin	Biochrom	Berlin, DE
PenStrep	Biochrom	Berlin, DE
D-Glucose stock (c=200 g/ml)	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
L-(+) Milchsäure	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
Glutamax	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
HBSS	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
FBS	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
Trypanblau	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
Zombie Aqua™ Fixable Viability dye	Biolegend	London, UK
Bicoll mit 10mM HEPES	Biochrom	Berlin, DE
BD Pharm Lyse™ lysing solution (10x)	BD Biosciences	SanJose, US

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.7.: Enzyme

Name	Hersteller	Firmensitz, Land
Q5 [®] high-fidelity DNA Polymerase	NEB	Schwerte, DE
JumpStart™ Taq ReadyMix™ (2x)	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
DNAse I	Zymo Research	Irvine, US
First-Strand SuperScript III Reverse Transcriptase	Lifetechnologies	Darmstadt, DE
Trypsin	Biochrom	Berlin, DE

Tabelle 2.8.: Zelllinien

Organismus	Zelllinie	Referenz
<i>Mus musculus</i>	MS-5	ACC 441

Tabelle 2.9.: Medien

Name	Komponente	Endkonzentration
RPMI+ (Standardmedium)	RPMI	
	FBS	10%
	PenStrep	1%
	L-Glutamin	1%
RB27	RPMI ohne Glukose	
	B27	2–4%
	Glukose	5 mM (wenn nicht anders angegeben)

Tabelle 2.10.: Puffer

Name	Komponente	Endkonzentration
FACS Puffer	PBS (ohne Mg ²⁺ and Ca ²⁺)	
	EDTA (250 mM)	2,1 mM
	hitzeinaktiviertes FBS (1 h bei 56 °C)	2%

Tabelle 2.11.: Antikörper. Diese Tabelle beinhaltet alle verwendeten Isotypkontrollen, sowie primäre (Fluorophor-markierte) und sekundäre Antikörper.

Name	Klon	Farbstoff	Volumen pro FACS (µl)	Artikelnr.	Hersteller
anti-HLA-DR APC	L243	APC	5	347403	BD
anti-Human TCR Vγ9, FITC labeled Mab	7A5	FITC	2	TCR2720	Thermo Scientific
anti-Human γδTCR PE	5A6.E9	PE	1	MHGD04	life technologies
anti-MICA/B-PE	6D4	PE	2	130-100-886	MACS - Miltenyi Biotech
anti-TCR Vβ20-FITC	ELL1.4	FITC	2	IM 1562	Beckman Coulter
anti-TCR-Vδ1*1-FITC, Human	REA173	FITC	0.5	130-100-532	MACS - Miltenyi Biotech
anti-TCR-Vδ1*1-FITC, Human	REA173	FITC	0.5	130-118-362	MACS - Miltenyi Biotech
anti-TCR-αβ FITC	WT31 (CE/IVD)	FITC	1	333140	BD Pharmigen
anti-TCR-γδPE	11F2 (CE/IVD)	PE	1-3	333141	BD Pharmigen
anti-TCRα/b-APC Human	BW242/412 (BMA031)	APC	1	130-113-527	MACS - Miltenyi Biotech
anti-TCR-γδFITC	11F2	FITC	1	130-096-884	MACS - Miltenyi Biotech
anti-TCRα/β-APC Human	BW242/412	APC	2	130-091-237	MACS - Miltenyi Biotech
APC anti-Human CD1d	51.1	APC	2	350308	Biolegend
APC Mouse Anti-Human CD122	Mik-β3	APC	14	566620	BD
APC anti-Human Delta-like protein 4 (DLL4)	MHD4-46	APC	1	346508	Biolegend
APC anti-Human IgGfC	HP6017	APC	1.5	409306	Biolegend
APC Rat anti-Human IL-2	MQ1-17H12(RUO)	APC	2	564567	BD Pharmigen
APC-H7 Mouse anti-Human CD8	SK1 (RUO)	APCH7	0.25-0.5	560179	BD Pharmigen
BB515 Mouse anti-Human LAIR-1 (CD305)	DX26	FITC	5	565153	BD
CD14 FITC	Mω9	FITC		345784	BD
CD1a	BL6	PE	5	A07742	Beckman Coulter
CD1c Monoclonal antibody	L161	FITC	5	11-0015-42	ebioscience
CD1d	51.1	APC	5	350307	Biolegend
CD2	S5.2	PE	5	347405	BD
CD25	2A3	FITC	14	345796	BD
CD28 APCH7 IgG1Kappa	CD28.2	APC-H7	1	561368	BD
CD29-FITC	K20	FITC	5	0791	immunotech
CD3-PerCP	SK7	PerCP	2	345766	BD Pharmigen
CD3 PerCp anti-Human	SK7	PerCP	1	344814	Biolegend
CD4 (VIT 4)-VioBlue®, Human	VIT 4	VioBlue	0.5	130-094-153	MACS - Miltenyi Biotech
CD45RO APC	UCHL1	APC	5	17-0457-41	ebioscience
CD49d	BU49	PE	5	21488494	immunotools
CD58	1C3	FITC	5	555920	BD
CD8 FITC	SK1	FITC	2	345772	BD
CD95 FITC	DX2	FITC	2	340479	BD
FcR Blocking Reagent, Human			2	130-059-901	MACS - Miltenyi Biotech
FITC Mouse anti-Human TCR αβ	T10B9.1A-31/T10B9(RUO)	FITC	3	555547	BD Pharmigen
FITC Mouse anti-Human TCRγδ	11F2	FITC	2	347904	BD
FITC Mouse IgG1 κisotype Control	MOPC-21	FITC		551954	BD
Goat anti-Mouse	polyclonal	FITC	5	349031	BD
Human VH31		2 (1:10)		no longer available	
IsoType IgG2a	713	PE		21335024S	immunotools
MICB anti-Human Mouse	236511			MAB1599	R&D σ
Mouse anti-Human CD28 biotinyliert					
Mouse anti-Human TCR-γδ FITC	11F2 (CE/IVD)	FITC	1	347903	BD Pharmigen
Mouse IgG1 PerCP	X40	PerCP		345817	BD σ
OKT-3					
PE anti-Human IFN-γ antibody	B27	PE	2	506506	Biolegend
PE anti-Human MICA/MICB antibody	6D4	PE	2	320906	Biolegend
PE Mouse anti-Human CD132	AG184	PE	14	561699	BD Pharmigen
PE Mouse anti-Human CD86 (FUN-1)	2331	PE	5	555658	BD
PE Mouse anti-Human TCRαβ	T10B9.1A-31/T10B9(RUO)	PE	3	555548	BD Pharmigen
PE Mouse anti-Human Vδ2 TCR	B6	PE	2	555739	BD
Platelet Control -γ1 PE	X40	PE		340013	BD

^abereitgestellt von Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović

Tabelle 2.12.: Primer

Target/Primer Name	Sequenz forward Primer 5'→ 3'	Sequenz reverse Primer 5'→ 3'	Ref./Hersteller
adam10	TCCACAGCCCAATCAGCAA	GCGTCTCATGTGCCAATTG	PMID: 27076628
adam17	GACTCTAGGGTCTAGCCAC	GGAGACTGCAAACGTGAAACAT	PrimerBank ID: 73747888c2
arap	ATGCTTCAGCCCTTCCT	CTGGGCTCCITTTGTTCC	PrimerBlast self-made
b2mg	TCCATCCGACATTGAAGTTG	CGGCAGGCATACTCATCTT	PMID: 20565758
bcl11b	TCCAGCTACATTGCACAACA	GCTCCAGGTAGATCGGGAAG	PrimerBank ID: 12597634c2
bmi	AATCCCCACCTGATGTGTGT	GCTGGTCTCCAGGTAACGAA	PMID: 27518564
ctcf	GAGCCTGCCGTAGAAATTGA	TGATAGCTGTGGCTGGTTC	PrimerBlast self-made
Cδ1	GACAGCATTGTACTCCCACTGG		PMID: 1310453

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.12.: Primer

Target/Primer Name	Sequenz forward Primer 5'→ 3'	Sequenz reverse Primer 5'→ 3'	Ref./Hersteller
Cs2(-FAM)	(FAM)TTCACCAGACAAGCGACA		PMID: 16328383
dlg4	CAAGATCATTCTGGTGGGG	CATAGAGGGCAACGATGGAG	PrimerBlast self-made
dfx1	GGGTCCTGATTTTGTCTG	TTAAAATACATCGGCCCAA	biomol
e2a	AAAGCGGAGAAATGGAACAT	GCAGAAATAGCGAGAGACAG	biomol
egr3			VHPS-2892 - biomol
ep300	ACGAAGGACCAGACTACAGA	CACACTGCCACGGATCATA	PrimerBlast self-made
ets1	GATAGITGTATCGCCTCACC	GTCTCTGAGTGAAGCTGTC	PrimerBank ID: 219689117c1
ezh2	CTACATCCTTTTCATGCAACACCC	GAGAGCAGCAGCAAACTCCT	1
gata3	GCGGGCTCTATCACAATAATGA	GCCTTCGCTGGGCTTAAT	PMID: 23354167
gfi1	CCAGCCTCGGAGAAGTCAATG	TGAGTACGGTTTGAAGGCAG	PrimerBank ID: 187761350c2
dll1	ATGTGATGAGCAGCATGGATT	GGTGTGTGCGAGTGTGAGGTC	PMID: 25734817
dll3	TGAGCATGGCTTCTGTGAAC	AAAGGACCTGGGTGTCTCACTAC	PMID: 25734817
dll4	GTGACCAAGATCTCAACTACTGC	CAGGGGTGTGTCTCACACTC	PMID: 25734817
heb	AAGCCACAACCAGATATGTT	TGGTAAACTGAGTGTGGAG	biomol
hes1	AAGTCTGAGCCAGCTGAAAA	GTACTTCCCAGCACACTTG	biomol
hey1	ACGAGACCAGATCAATAACA	ATCCCAAACCTCCGATAGTCC	biomol
hif1a	TGACCCTGCACTCAATCAAG	TGTCTAGTGTCTCCATCGGA	PrimerBlast self-made
jag1	CTGCTCAAAGGTCTGGTGTG	GGAGACTGGAAGACCGACAC	PMID: 25734817
jag2	AGGTTCTGCGATGAGTGTGTC	GTGCTCAGCCTTCTCACAGTT	PMID: 25734817
id2	GACCCGATGAGCCTGTATAC	AATAGTGGGATGCGAGTCCAG	PrimerBank ID: 31982933a1
id2	GACCCGATGAGCCTGTATAC	AATAGTGGGATGCGAGTCCAG	PrimerBank ID: 31982933a1
id3	CAGGCTCTATAAGTGACCCGC	GGTGCCCCAAAGAGAAAGAA	PrimerBlast self-made
itga1	GGTTCCTACTTTGGCAGTATT	AACTTGTCTGATTGAGAGCA	PMID: 20565758
itga11	GGAGGAAGACTTGCCTCG	CACAGGTTCCCAGTAGATG	PMID: 20565758
itga2	GGAAACGGGACTTTCGCAT	GGTACTCGGCTTCTCATCA	PMID: 20565758
itga3	AAGGGACCTTCAGGTGCA	TGTAGCCGGTGAATTACCAT	PMID: 20565758
itga4	GCTTCTCAGATCTGCTCGTG	GTCACTTCCAACGAGGTTTG	PMID: 20565758
itga5	TGCAGTGTGAGGCTGTGTACA	GTGGCCACCTGACGCTCT	PMID: 20565758
itga6	TTGAATATACTGCTAACCCCG	TCGAAACTGAACCTTGAGGATAG	PMID: 20565758
itga7	CTGTTTACAGCTACATTGCAATC	GCCTGGTGTGGTGGTCT	PMID: 20565758
itgaL	TGCTATCATCATCACGGATGG	CITCTCCTGGTCTGAAAATGCT	PrimerBank ID: 167466216c1
itgaM	GCCTTGACCTTATGTATGGG	CCTGTGCTGTAGTCGCACT	PrimerBank ID: 224831238c1
itgaV	AATCTTCCAATTGAGGATATCAC	AAAACAGCCAGTAGCAACAAT	PMID: 20565758
itgB1	GAAGGGTTGCCCTCCAGA	GCCTGAGCTTCTCTGCTGTT	PMID: 20565758
itgB2	TGCGTCTCTCTCAGGAGTG	GGTCCATGATGTCGTCAGCC	PrimerBank ID: 188595673c1
itgB3	CCGTGACGAGATTGAGTCA	AGGATGACATTTCCACTAGAA	PMID: 20565758
itgB4	AGACGAGATGTCAGGGACC	GGTCTCCTCTGTGATTGGAA	PMID: 20565758
itgB5	GGAGCCAGAGTGTGAAACA	GAAACTTTCGCAAACTCCCTC	PMID: 20565758
itgB6	TCAGCGTACTGTGAATATCC	GTGACATTTGGAGCTGTTAC	PMID: 20565758
itgB7	AGAATGCGGAAATCCTCACCT	TGAAGTTCAGTTGCTGCACC	PrimerBank ID: 4504776c1
itgB8	AATTTGGTAGTGGAAAGCCTATC	GTCACTTTTCTGCATCTTC	PMID: 20565758
lair-1	GGAGCCATGTGACTTTCTGT	ACTCAGATGGACTAGCTTGAGA	PrimerBlast self-made
lef1	ATCTCTTTTCCACCCATCC	ATGTCTGGACATGCCTTGT	biomol
lfrg	GTCCGGCAGGAAGTGGTT	CCGCAGGTTGACGTAGTTGT	PrimerBlast self-made
mica	TGAAGACAACAGCACCCAGGA	CCTGACGTTTCATGCCCCAAG	PrimerBank ID: 20986527c2
micb	ACGTCAAAAATTTCTGGAAGGA	GGGGCACTGTTCTCTGTA	PrimerBlast self-made
myc	GCAGCAGACCTTCATCAAAA	TGCTGTCTGTGAGAGGGTAG	biomol
notch1	GCACCTTCTGTGAGGAGGACAT	AGCAGGAGCTCTCTGTGAGT	PMID: 25734817
notch2	GAACACTGGGTCGATGATGAAG	CACATCTAACACATCCACCTCCT	PMID: 25734817
notch3	GGGTTCCGCTGTGTGTGT	GGAGAGGAGTTCACACTGACG	PMID: 25734817
notch4	CCAGAGATCCTCATGTGTGT	GTGGTCTCTGTAGCCTGTAG	PMID: 25734817
nrarp	CTGCAGAACATGACCAACTG	AACTTGACCCAGACTTCAC	PrimerBank ID: 194578904c2
numb	GCGGCAGATTTGAGGCTTA	CTGGCCCCAATAATCCAA	TIB molbiol
rag1	GCTGAGAACCTGGAACGTTATGA	AGTGGAGTGCATATGGAAGG	PrimerBank ID: 187761350c2
rag2	AGACTTGGTAGGAGATGTTCTCTG	TGTATGAGCGTCTCCAAAGAG	PrimerBank ID: 344925929c1
rpl13a	GGATAAGAAACCCTGCGACA	GCCCAGCAGTACTGTTAG	PrimerBlast self-made
runx1	ACAGAGACATGCCAACCAT	CAGGACATTTGAGTGAACC	biomol
runx3	ATGTCTTCTCACCCTATC	AAACGTCTTCTTCTCTCTG	biomol
sharp			VHPS-8358 - biomol
tcf7	GGTCCAGACCCTGAAGATT	ATAGATGCAGGCACCCATAG	biomol
vδ1_ NGS	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAG- AGACAGTCAAGAAAAGCAGCGAAAATCC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATA- AGAGACAGGACAAAACCGATGGTTTG	PMID: 28218745
vδ1	GCCTGTATGAAAACAAGTTGGTGGTCA		PMID: 25709606
zbtb16	GAGATCCTCTTCCACCCTCAAT	CCGCATACAGCAGGTCAATC	PrimerBank ID: 66932931c1
zbtb7a	CGACACTTACACAGACCTCG	GCGGGTAGTGAAGGCCAAAGT	PrimerBank ID: 205277344c1

¹ bereitgestellt von Dr. Sabine Schleicher

2.2. Methoden

2.2.1. PBMC-Isolation aus Vollblut und Zellzählung

PBMCs wurden routinemäßig aus dem Blut gesunder Spender durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde ein Volumen frisches heparinisertes Blut im Verhältnis 1:1 mit PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) verdünnt. 12/35 ml des verdünnten Blutes wurden vorsichtig auf 3/15ml Bicolll geschichtet und für 15 min bei 800 x g (RT) bei ungedämpftem Abbremsmodus zentrifugiert. Der größte Teil der oberen Flüssigkeitsschicht, die Blutplasma und Thrombozyten enthält, wurde abgesaugt, ohne den Buffy Coat auf der Bicolll-Lösung zu zerstören. Mit einer 5-ml-Stripette wurden die Leukozyten vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt und zweimal gewaschen, indem sie auf 15/50 ml Gesamtvolumen in PBS verdünnt und bei 400 x g bei RT für 12 min zentrifugiert wurden. Alle Resuspensionsschritte des Zellpellets wurden mit einer 1000 μ l Pipettenspitze durchgeführt, um Zellaggregate vorzubeugen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen, je nach Stärke der Rotfärbung des Pellets, in 1-3 ml eines 1x-Lysepuffers (10x-Stammlösung mit Wasser verdünnt) resuspendiert und bei RT für 2-3 min zur Erythrozytenlyse inkubiert. Nach Verdünnung mit PBS wurden die Zellen anschließend bei 250 x g für 10 min zentrifugiert (RT) und je nach weiterer Verwendung in PBS oder Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden routinemäßig auf einer *improved* Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau gezählt, um simultan zur Zählung auch die Menge der toten Zellen abzuschätzen.

2.2.2. Zellkultur

Die Zellen wurden in geeignetem Zellkulturmedium (wenn nicht anders angegeben RPMI+, siehe 2.6) mit variablen Zytokin-Zusätzen bei 37 °C, 5% CO₂ und feuchter Luft kultiviert. V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone und V δ 1⁺T-Zell-Isolate wurden in U-bottom 96-Well-Platten bei einer Dichte von 0,5-1 · 10⁶ Zellen/ml, ergänzt durch 5 · 10⁵ Feederzellen/Well einmal und halbem Mediumwechsel zweimal pro Woche, kultiviert.

Neben dem Standardzellkulturmedium RPMI+ wurden TexMACS und RB27 für die Kultivierung der Zellen und die Herstellung der Zellkulturüberstände verwendet. Zellkulturüberstände wurden routinemäßig durch Inkubation eines definierten Zelltyps in Medium für ca. 3-7 Tage erzeugt.

Für die T-Zell-Stimulation mit α CD3/CD28-Beads wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

2.2.3. Isolation von V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen

V δ 1⁺-Zellen wurden mithilfe von MACS-Isolierung über FITC-markierte antiV δ 1-Antikörper positiv isoliert. Die Reinheit der positiven Fraktion nach zwei Runden Isolation über MS-Säulen betrug typischerweise 99,8%. CD4-positive Zellen wurden aus der V δ 1-positiven

2. MATERIAL UND METHODEN

Fraktion mit dem Dynabead® CD4-Positiv-Isolierungskit gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert.

2.2.3.1. Magnet Assisted Cell Sorting (MACS)

V δ 1⁺T-Zellen wurden aus PBMCs gemäß dem Herstellerprotokoll des FITC-Multisort-Kits und der Einstellung „dim epitope“ isoliert. Routinemäßig wurden etwa 10⁸ Zellen aus 50-60 ml Blut isoliert und für die V δ 1⁺T-Zell-Isolierung verwendet. Die Volumina der Probe, des MACS-Puffers (autoMACS-Spüllösung) und des Antikörpers wurden basierend auf den Daten für 10⁷-Zellen auf den tatsächlichen Zellinput extrapoliert. Kurz gesagt wurden 10⁷-Zellen durch Zentrifugation pelletiert und im entsprechenden Volumen des MACS-Puffers resuspendiert, um eine Endkonzentration von 10⁸-Zellen in 100 μ l für die erste Antikörperinkubation zu erreichen ($V=10 \mu$ l pro 10⁷ Zellen). Alle Zentrifugationsschritte während des MACS-Verfahrens wurden bei 450 x g für 10 min bei 4 °C durchgeführt. Für die Isolierung und Klonierung von V δ 1⁺T-Zellen wurde die Isolierung von falsch-positiven Zellen mit 20 μ l Fc-Blockierungsreagenz pro 10⁷-Zellen und einer anfänglichen Inkubation von 5 min bei 4 °C verhindert. Die Primärfärbung mit 10 μ l des epitopspezifischen Antikörpers wurde für 10 min bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 100 μ l pro 10⁷ Zellen durchgeführt. Nach einem ersten Waschschrift mit 2 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen und einer anschließenden Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden in MACS-Puffer resuspendiert, mit 20 μ l magnetischen Beads pro 10⁷ Zellen gemischt und bei 4 °C für 15 min inkubiert. Ein zweiter Waschschrift wurde durchgeführt und bis zu 10⁸ Zellen wurden in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert und auf eine gekühlte, vorkonditionierte MACS-Säule aufgetragen, die in einen entsprechenden MACS-Magneten eingesetzt war. Unmarkierte Zellen, die nicht durch das Magnetfeld zurückgehalten werden, bilden die negative Fraktion und wurden, ebenso wie die drei Volumina Waschpuffer die verwendet wurden, um eine Kontamination der Zellen innerhalb der positiven Fraktion zu verhindern, in einem separaten Röhrchen gesammelt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule in ein neues Röhrchen eingesetzt und die Zellen wurden mit Druck von der Säule in 1 ml MACS-Puffer eluiert, um die (Antikörper-gebundene) positive Zellfraktion von der Säulen-Matrix freizusetzen.

2.2.4. FACS-Messungen

Für die FACS-Färbung wurden die Zellen zunächst in FACS-Puffer resuspendiert, bei 660 x g, RT für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen (Färbevolumen von ca. 50 μ l). Bei einer dualen Antikörpermarkierungsstrategie wurde dann zuerst der unmarkierte Epitop-spezifische primäre Antikörper zugesetzt, gefolgt von drei einzelnen Waschschriften (Verdünnung in 500 μ l FACS-Puffer und einer Zentrifugation bei 2 min bei 600 x g, RT mit anschließendem Verwerfen des Überstandes) und einer abschließenden Färbung mit dem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper. Für alle FACS-Panels bzw. die rest-

lichen Panel-Komponenten, die ausschließlich Fluorochrom-konjugierte Antikörper enthalten, wurde ein Master-Mix hergestellt, um gleiche Antikörper-Konzentrationen innerhalb eines Experiments zu ermöglichen. Ein entsprechendes Volumen dieses Mastermixes und 2 µl einer 1:10 verdünnten Aqua-Zombie-Lösung wurden jeder Probe zugesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Proben auf einem BD FACS Canto II Gerät analysiert. Ein Durchbluten von Farbstoffsignalen in andere Fluoreszenzkanäle wurde durch Kompensation der Daten aus einem beispielhaften 8-Kanal-FACS-Panel verhindert. Die FACS-Daten wurden mit FlowJo (tSNE, FlowSOM) und unter Hilfe einiger R-Pakete ausgewertet.

Zur intrazellulären FACS-Färbung, unter Verwendung des „FIX&PERM[®] Cell Fixation & Permeabilization Kits“, wurde die Zellprobe mit 1 µl Bref-A Lösung (1:100) für 1–2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend gewaschen (s. o.). Danach wurden die Fc-Blockierung, extrazelluläre und Viabilitätsfärbung wie oben beschrieben durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS (I) wurden die Zellen mit 100 µl 'Reagenz A' für 10 min bei RT im Dunkeln behandelt. Danach wurde ein weiterer Waschschrift mit PBS durchgeführt. Die intrazelluläre Färbung mit 100 µl 'Reagenz B' und dem intrazellulären Antikörper-Mastermix (15 min bei RT, dunkel) gefolgt von Waschen in FACS-Puffer und einer Zentrifugation bei 5 min (300 xg, RT) finalisiert die Färbestrategie.

Tabelle 2.13.: Übersicht der Gating-Strategie für die Analysen der CD-Marker. *Pre-gating* aller Proben geschah mittels AquaZombie/SSC-A (lebende Zellen) und dem Lymphozyten-Gate (FSC-A/SSC-A).

Marker	dargestelltes Gate
CD11a ⁺	Lymphozyten
CD18 ⁺	Lymphozyten
CD29 ⁺	Lymphozyten
CD49d ⁺	Lymphozyten
CD49e ⁺	Lymphozyten
CD1a ⁺	Lymphozyten
CD1c ⁺	Lymphozyten
CD1d ⁺	Lymphozyten
CD58 ⁺	Lymphozyten/CD4 ⁺
CD2 ⁺ /54 ⁺	Lymphozyten/CD4 ⁺
CD25 ⁺	Lymphozyten
CD122 ⁺	Lymphozyten
CD132 ⁺	Lymphozyten
CD127 ⁺	Lymphozyten

Bei den UeS-Experimenten wurden alle Proben, die zu einem Experiment gehören, zunächst folgendermaßen „gated“: Zeitrahmen (Zeit/SSC-A) > Einzelzellen (FSC-A/FSC-H) > Lymphozyten - (FSC-A/SSC-A) > lebende Zellen (V500-A/SSC-A). Die lebenden Zellen wurden dann probenübergreifend zusammengefasst und in einer tSNE-Analyse gemeinsam analysiert. Die Generierung von fünf Clustern wurde beim FlowSOM-Clustering

2. MATERIAL UND METHODEN

festgelegt, wobei die einzelnen Cluster in den tSNE-Plots farbkodiert dargestellt wurden. Heatmap-Darstellungen der einzelnen Proben in den Clustern über die Zeit wurden mit Hilfe der Software R und den in Tab. 2.2 angegebenen Softwarepaketen durchgeführt. Für jedes Experiment wurden die Mediane der Markersignale (FU) auf die experimentenspezifische maximale Expression (FU) jedes Rezeptors normalisiert.

2.2.5. ELISA zur MICA-Quantifizierung

„Human MICA DuoSet® ELISA-Assay“ (R& D Systems) und „DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2“ (R& D Systems) wurden verwendet, um die Konzentration an MICA-Molekülen in den Zellkulturüberständen zu bestimmen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde Blutserum von Ziegen (Normal Goat Serum, R&S Systems) verwendet. Alle Vorgänge wurden wie im Herstellerprotokoll des „Human MICA DuoSet® ELISA“ (R& D Systems für DY1300 10/16) beschrieben durchgeführt. Die Puffer wurden mit Millipore-gefiltertem Wasser verdünnt. 100 µl jedes Standards, eine Negativkontrolle ohne MICA (Nullstandard) zur Normalisierung der Verdünnungsreihen, die Zellkulturüberstands-Probe(n) und eine Zellkulturmediums-Probe zur Probennormalisierung wurden in die entsprechenden Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Um Pipettierfehler zu reduzieren, wurde jeder Ansatz in Duplikaten durchgeführt. Die optische Dichte aller Proben wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen, wobei die Wellenlängenkorrektur auf 570 nm eingestellt wurde. Zur Berechnung der entsprechenden MICA-Konzentration jeder Probe wurde der Wert bei 570 nm vom Wert bei 450 nm subtrahiert. Für die Kalibrierung jedes Assays wurde eine Standardkurve aus einer 1:2-Verdünnungsreihe mit rekombinantem MICA-Standard von 2 ng/ml bis 31,25 pg/ml verwendet. Aufgrund der zu erwartenden niedrigen MICA-Konzentrationen wurde die Standardreihe um eine Verdünnung weiter verdünnt als in der Anleitung des Herstellers beschrieben. Die Normalisierung der Werte der normalisierten Standardkurve OD_{450} erfolgte durch Subtraktion der Negativkontrolle (Nullstandard), während die Probenwerte mit reinem Zellkulturmedium als Blindprobe zu Normalisierung auf das Medium dienten. Alle Berechnungen wurden mit Graph Pad Prism (Version 8) durchgeführt. Die Standardwerte wurden normalisiert und über den \log_{10} der MICA-Konzentration aufgetragen. Theoretisch wurde erwartet, dass die Kurve sigmoidal verläuft, weshalb ein *sigmoidal fit* (4PL, X ist $\log(\text{Konzentration})$) gewählt wurde. Die Genauigkeit der sigmoidalen Annäherung an die Standardkurvenwerte wurde mittels R^2 -Werte getestet ($R^2=1$ wäre optimal), welcher routinemäßig bei $\geq 0,9959$ lag.

2.2.6. Detektion von TZR-Signalen über konfokale Laserscanningmikroskopie und die MAAACS-Methode

Die konfokale Mikroskopie zum Nachweis von TZR-Signalen bei $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen wurde in einer von mir betreuten Masterarbeit durchgeführt und beschrieben (siehe (58)).

Zur Bestimmung der räumlich-zeitlichen Anregung von T-Zellen wurde die MAAACS-Methode, wie in (87) beschrieben, verwendet. Dabei wurden konfokale Mikroskopievideos mit einem MATLAB-Skript von (87) analysiert das an die in (58) beschriebenen Bildeinstellungen angepasst wurde.

2.3. Molekularbiologie

2.3.1. Nukleinsäureisolationsstrategien

DNA wurde aus zuvor in PBS gewaschenen Zellen mit dem passenden „Zymo DNA Clean and Concentrator-5/-25“ Kit in Abhängigkeit von der Eingangszellzahl isoliert. Nach den Angaben im Protokoll des Herstellers wurde die aufgereinigte DNA in MolBio-grade Wasser eluiert. Für die optimale/höchstmögliche DNA-Konzentration wurde das geringste im Protokoll beschriebene Elutionsvolumen gewählt.

RNA wurde mittels optimalem „Zymo RNA-Quick“-Kit für den angegebenen zellulären Input isoliert. Die RNA wurde durch Anwendung einer DNase I-Behandlung (wie im Protokoll des Herstellers beschrieben) DNA-depletiert. Die abschließende Elution der RNA wurde im geringstmöglichen Volumen an MolBio-grade Wasser durchgeführt.

2.3.2. Reverse Transkription

Routinemäßig wurden 3 oder 6 µl Gesamt-RNA mittels „SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix“ von Invitrogen gemäß dem Herstellerprotokoll revers in cDNA transkribiert. Die Transkriptionseffizienz wurde mit 100% angenommen, nachfolgende Berechnungen zur Normalisierung des cDNA-Inputs für Downstream-Assays, z. B. qPCR, wurden folglich mit einer cDNA-Konzentration von einem Drittel der ursprünglichen Gesamt-RNA-Konzentration durchgeführt.

2.3.3. Quantifikation und Qualitätskontrolle der Nukleinsäuren

2.3.3.1. Nukleinsäurequantifikation

Die Nukleinsäurekonzentration wurde mittels Spektralphotometrie (NanoDrop 2000) und entsprechender Filtereinstellung für den Nachweis von RNA oder DNA bestimmt.

2.3.3.2. Gelelektrophorese

PCR-Fragmente wurden auf 1 – 1,8% TBE-Agarosegelen analysiert und bei 80 – 150 V in 1x TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde 1 µl GelRed-Farbstoff pro 100 ml Agarosegel vor der Polymerisation des Gels zugefügt. 1 – 5 µl dsDNA PCR-Produkte wurden in 1x DNA-Ladepuffer vorgemischt und in die Taschen des Agarosegels geladen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Zur Größenbestimmung der PCR-Fragmente (dsDNA) wurden 2 µl einer gebrauchsfertigen DNA-Leiter 2.1 in eine Tasche jedes Gels geladen.

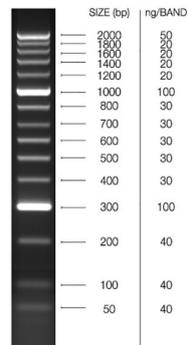


Abbildung 2.1.: Fragmentlängen des „Hyperladder 50 bp DNA ladder“.

2.3.4. PCR

2.3.4.1. Standard PCR-Einstellungen

PCR-Reaktionen wurden routinemäßig mit einem 2-fach konzentrierten Hot Start-Taq-Polymerase-Mastermix (JumpStart) in einem Endvolumen von 10–50 µl durchgeführt.

Tabelle 2.14.: Standard PCR-MasterMix für 10 µl Reaktionsvolumen. Normalerweise wurden 10 ng (c)DNA-Template amplifiziert.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
DNA-Template	norm. 1 µl	variabel
JumpStart (2x) MasterMix	5 µl	
forward Primer (2 µM)	1 µl	0,2 µM
reverse Primer (2 µM)	1 µl	0,2 µM
MolBio-grade Wasser	aufgefüllt auf 10 µl	

Tabelle 2.15.: Standard PCR-Programm. Dieses Programm ist nach dem „JumpStart polymerase master mix“-Protokoll aufgebaut und an Amplikongrößen < 1 kb angepasst.

Schritt Nr.	Schritt	T (°C)	t	
1	initiale Denaturierung	94	2 min	
2	Denaturierung	94	30sec	
3	Primer-Anlagerung	Amplifikation 30-40x	58	30sec
4	Verlängerung		72	30sec
5	finale Verlängerung		72	5 min
6	Kühlen	4	∞	

2.3.4.2. QPCR-Einstellungen

Zur Bestimmung des Genexpressionsstatus ausgewählter Zielgene wurde die mRNA-Konzentration indirekt über einen SYBR Green qPCR-Assay (GoTaq® qPCR Master Mix) ermittelt. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen, die Normalisierung erfolgte mit *rpl13a* oder, falls angegeben, mit *gapdh* als Housekeeping-Gen, während eine Wasserprobe als negative Kontrolle diente (88, 89). Um die Analyse der hohen Anzahl an Targets zu ermöglichen, wurden routinemäßig 5 ng der Gesamt-RNA als Input pro Well quantifiziert.

Tabelle 2.16.: QPCR-MasterMix für 10 µl Reaktionsvolumen. Der cDNA-Input wurde quantifiziert und dazu, wenn nicht anders angegeben, zunächst auf 5 ng pro Probe in MolBio-grade Wasser eingestellt.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
cDNA-Template (5 ng)	2 µl	variabel
GoTaq® qPCR-MasterMix (2x)	5 µl	1x
Primermix (2 µM)	1 µl	0,2 µM
MolBio-grade Wasser	2 µl	

Tabelle 2.17.: QPCR-Standardprogramm. Dieses Programm wurde nach dem Protokoll des Herstellers des „GoTaq® master mix (2x)“ erstellt.

Schritt Nr.	Schritt	T (°C)	t
1	initiale Denaturierung	95	2 min
2	Denaturierung	95	15 sec
3	Primeranlagerung und Verlängerung	60	1 min
4	Schmelzkurven-Analyse	60 to 95	

Um einen Vergleich der Genexpression der Proben zu ermöglichen, wurde eine relative Genexpression auf der Grundlage der markerspezifischen und *rpl13a*-spezifischen C_q -Werte jeder Probe, die in Triplikaten ($n=3$) gemessen wurden, nach den Gleichungen 2.1-2.5, berechnet. Unter Einbeziehung des statistischen Fehlers (Δ) der Messungen wurde das Intervall der relativen Genexpression nach der Gleichung 2.6) berechnet.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.1)$$

$$\Delta \bar{x} = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.2)$$

$$\Delta C_q = \bar{x}_{target} - \bar{x}_{rpl13a} \quad (2.3)$$

$$\Delta \Delta C_q = \sqrt{\Delta \bar{x}_{target}^2 + \Delta \bar{x}_{rpl13a}^2} \quad (2.4)$$

2. MATERIAL UND METHODEN

$$\text{rel. Genexpression} = 2^{-\Delta C_q} \quad (2.5)$$

$$\text{Fehlerintervall} = \begin{cases} \text{min} = 2^{-\Delta C_q - \Delta \Delta C_q} \\ \text{max} = 2^{-\Delta C_q + \Delta \Delta C_q} \end{cases} \quad (2.6)$$

2.3.5. Sequenzierung und Fragmentlängenanalysen

2.3.5.1. Sanger-Sequenzierung und Fragmentlängenanalyse

Sanger-Sequenzierung selektierter Region z. B. der TZRV δ 1⁺CDR3-Region von V δ 1⁺CD4⁺-T-Zellklonen, wurde mittels PCR-basierter Voramplifikation von 10 μ l unverdünnter cDNA (min. 10 ng) durchgeführt, um genügend Amplikon-Templates für die anschließende Sanger-Sequenzierung zu erhalten (PCR siehe 2.14). Im Falle des V δ 1-CDR3-Locus folgte auf eine erste PCR mit V δ 1 forward ($c_{\text{end}}=1 \mu\text{M}$) und C δ 1 ($c_{\text{end}}=0,5 \mu\text{M}$) reverse Primern, eine zweite „nested-PCR“, die 1 μ l PCR-Produkt mit V δ 1 forward ($c_{\text{end}}=1 \mu\text{M}$) und C δ 2 reverse ($c_{\text{end}}=0,5 \mu\text{M}$) Primern amplifizierte (siehe Tab. 2.12). Für die Spektraltypisierung der TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen wurde die zweite/„nested PCR“ unter Verwendung eines FAM-markierten C δ 2 reverse Primers durchgeführt. 10 μ l jeder PCR-Amplikonprobe wurde mit dem „ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit“ aufgereinigt (Proben wurden mit 50 μ l Bindungspuffer vorgemischt) und in 10 μ l MolBio-grade Wasser eluiert. Jede Probe wurde über Spektralphotometrie quantifiziert und auf 3 ng Input für die BigDye-Reaktion eingestellt (siehe Handbuch des „BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“). Um mögliche Sequenzierfehler (Artefakte) auszuschließen, wurde jedes Amplikon in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung, d. h. beide DNA-Einzelstränge, sequenziert. Dazu wurden dieselben Primer wie bei der Amplifikation verwendet. CDR3-Sequenzanalysen einzelner Klone wurden auf der IMGT-Website (90, 91) durchgeführt.

Für die Spektraltypisierung wurden die FAM-markierten, PCR-Produkte 1:10 in MolBio-Wasser verdünnt. 1 μ l Probe wurde anschließend mit 14 μ l Formamid-Standardlösung (13,5 μ l Formamid + 0,5 μ l GeneScan[™] 600LIZ[™] Größenstandard) gemischt und in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Nach kurzer Denaturierung bei 95 °C für 2 min wurden die Proben auf Eis gelegt, mit einer perforierten Verschlussfolie versiegelt und kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu vermeiden. Alle Sanger-Sequenzierungen und Fragmentlängenanalysen wurden auf einem ABI Sequencer „3130xl Genetic analyzer“ durchgeführt.

Tabelle 2.18.: BigDye® PCR-MasterMix. BigDye® PCR-MasterMix für 10 µl Gesamtvolumen.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
PCR-Amplikon (3 ng)	1 µl	variabel
BigDye® Ready Reaction Mix (5x)	2 µl	
forward/reverse Primer (3,2 µM)	1 µl	0,32 µM
BigDye®	0,5 µl	
MolBio-grade Wasser	aufgefüllt auf 10 µl	

Tabelle 2.19.: BigDye® PCR-Programm. Dieses Programm ist gemäß dem „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ Handbuch und < 1000 bp Fragmentlänge erstellt worden.

Schritt Nr.	Schritt	T (°C)	t	
1	initiale Denaturierung	96	1 min	
2	Denaturierung	96	10 sec	
3	Primeranlagerung	Amplifikation 25x	5 sec	
4	Verlängerung		60	30 sec
5	Kühlen		4	∞

2.3.5.2. NGS auf der MiSeq-Plattform

Die targetspezifische *NGS library preparation* erfolgte über zwei PCR-Schritte und eine anschließende Quantifizierung der Probe. Aus 60 ml Vollblut wurden panVδ1⁺CD4⁺T-Zellen durch: PBMC-Isolation (2.2.1), MACS-basierte αβT-Zell-Depletion und positive Isolierung der Vδ1⁺T-Zellen (2.2.3.1) sowie Isolation CD4-positiver Zellen mittels Dynabead-Technologie gemäß den Protokollen der Hersteller gewonnen (s. oben). Die isolierten Vδ1⁺CD4⁺T-Zellen wurden anschließend in 100 µl RNA-Lysepuffer lysiert, die Gesamt-RNA wie in 2.3.1 beschrieben isoliert, in 10 µl MolBio-grade Wasser eluiert und auf einem Spektralphotometer quantifiziert. 6 µl der Gesamt-RNA wurden revers zu 20 µl cDNA transkribiert (siehe 2.3.2).

In der ersten PCR (Adapter-PCR) wurden 20 ng cDNA durch Q5® Polymerase amplifiziert, wie in 2.20 und 2.21 beschrieben. Adapter-ligierte PCR-Produkte wurden unter Verwendung von 1,8x Agencourt AMPure XP Beads (45 µl) und 80% Ethanol aufgereinigt und in einem Elutionsvolumen von 40 µl MolBio-grade Wasser gelöst. Dieses Eluat wurde mittels Nanodrop quantifiziert ($c=4,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $A = 2,03$) und die Qualität durch Spektralphotometrie und Fragmentanalyse mittels DNA-HS-Chip auf der Bioanalyzer-Plattform von Agilent überprüft.

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.20.: NGS AdapterPCR-MasterMix. Adapter PCR-MasterMix für 25 µl Reaktionsvolumen mittels Q5® Polymerase.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
cDNA template	2 µl	20 ng
Q5® reaction buffer (5x)	5 µl	
vδ1_ NGS forward Primer (20 µM)	0,625 µl	0,2 µM
vδ1_ NGS reverse Primer (20 µM)	0,625 µl	0,2 µM
dNTPs 10mM	0,5 µl	200 µM
Q5® Polymerase	0,25 µl	
MolBio-grade Wasser	aufgefüllt auf 25 µl	

Tabelle 2.21.: Q5® Polymerase PCR-Programm der AdapterPCR. Dieses Programm wurde nach (92) designiert und an das Herstellerprotokoll der Q5® Polymerase angepasst.

Schritt Nr.	Schritt	T (°C)	t
1	initiale Denaturierung	98	30sec
2	Denaturierung	98	10sec
3	Primeranlagerung	63	20sec
4	Verlängerung	72	30sec
5	Denaturierung und Primerbindung	98	10sec
6	Verlängerung	72	35sec
7	finale Verlängerung	72	5 min
8	Kühlen	4	15 min

An beide Enden der aufgereinigten, mit Adaptoren ligierten Amplikons wurden mit Hilfe von NXTR® Index-Primern Indizes hinzugefügt. Hierfür wurden die PCR-Produkte (330 nt) über 1,8x Agencourt AMPure XP Beads (45 µl), 80 % Ethanol aufgereinigt und in einem Elutionsvolumen von 40 µl MolBio-grade Wasser gelöst. Dieses Eluat wurde quantifiziert ($c=2,27$ ng/µl) und die Qualität mit dem Qubit DNA HS-Kit und der Fragmentanalyse auf einem DNA-HS-Chip (1:20 verdünnt) auf der Bioanalyzer-Plattform von Agilent überprüft. Die Molarität betrug 10,42 nM und wurde in Illumina-Sequenzierpuffer auf 4 nM eingestellt.

Tabelle 2.22.: NGS IndexPCR-MasterMix. Index PCR-MasterMix für 25 µl Reaktionsvolumen und Verwendung der Q5® Polymerase.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
cDNA-Template	10 µl	approx. 44 ng
Q5® reaction buffer (5x)	5 µl	
NXTR® index Primer N701	2,5 µl	
NXTR® index Primer N502	2,5 µl	
dNTPs (10mM)	0,5 µl	200 µM
Q5® Polymerase	0,25 µl	
MolBio-grade Wasser	aufgefüllt auf 25 µl	

Tabelle 2.23.: Q5® Polymerase PCR-Programm der Index-PCR. Dieses Programm ist nach (92) entworfen und an das Q5® Polymerase-Protokoll angepasst.

Schritt Nr.	Schritt	T (°C)	t
1	initiale Denaturierung	98	30sec
2	Denaturierung	98	30sec
3	Primeranlagerung	55	30sec
4	Verlängerung	72	30sec
5	finale Verlängerung	72	5 min
6	Kühlen	4	∞

Durch Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration c_{Qubit} und basierend auf der erwarteten Amplikonlänge von ca. 340 bp wurde die Molarität der NGS-Bibliothek bestimmt. Für die NGS-basierte Analyse über die MiSeq-Plattform wurde die Ready-to-Sequence-Probe auf eine Endkonzentration von 4 pM mit 30 % phiX-Kontroll-Spike-in zur optimalen Vielfalt der *sequencing library* verdünnt und auf eine Nano-Flowcell mit 500 bp-Chemie geladen, welche 2x251 Reads (Paired-End) ermöglicht. Zum Demultiplexen der Proben wurde ein *sample sheet* bereitgestellt.

$$MF_{Agilent} = \frac{Mol_{Agilent}}{c_{Agilent}} \quad (2.7)$$

$$Mol_{Qubit} = MF_{Agilent} \cdot c_{Qubit} \quad (2.8)$$

2.3.5.3. NGS-Datenanalyse

Die rohen, demultiplexierten Paired-End-NGS-Daten wurden als Input für die MiXCR-Pipeline (Version 3.0.12) mit Einstellungen für humane mRNA-Amplikons genutzt. Die Darstellungen der Klonotypdaten daraus wurden in R mit einer Auswahl der oben beschriebenen Pakete erstellt (2.2).

3. ERGEBNISSE

Um spenderunabhängige und damit universelle, reproduzierbare Einblicke in die Biologie der $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellvorläufer zu erhalten, wurden $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklone von verschiedenen Spendern durch „limitierende Verdünnung“ und *in vitro*-Kultur etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurden $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen von fünf Spendern mittels einer zweistufigen MACS-Strategie generiert (siehe Abschnitt 2.2). Dabei wurden $V\delta 1^+$ -Zellen zunächst positiv aus PBMCs isoliert, woraus anschließend $CD4^+$ -Zellen durch positive Selektion isoliert werden konnten. Zur Qualitätskontrolle wurde jede Zellfraktion auf das Vorhandensein einiger charakteristischer Oberflächenmarker (z. B. $CD3^-$, $CD4^-$ und $CD8^-$ -Korezeptormoleküle sowie $TZRV\delta 1$ und $TZRV\gamma 9$, Daten nicht gezeigt) mittels FACS untersucht. Die Reinheit der so generierten pan $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen vor dem Klonieren lag jeweils im Bereich von 99,7–99,9%. Zur weiteren molekularbiologischen Charakterisierung aller $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklone wurden $V\delta 1$ -CDR3-Sequenzanalysen mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich vollständig charakterisierte $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklone wurden für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet.

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen

3.1.1. $TZRV\delta 1$ -CDR3 Sequenzanalysen

Die Frequenz von $V\delta 1^+$ -Zellen der Peripherie beträgt zwischen 0,5–6%, weshalb die weitere Co-Rezeptor-basierte Subklassifizierung zu minimalen Gesamtzellzahlen, innerhalb jeder einzelnen $V\delta 1^+$ -Zell-Subklasse, führt. Da wir an der genauen Funktion von $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen mit Progenitorcharakter interessiert sind ist es entscheidend zu wissen, ob der Progenitor-Pool selbst klonal oder eher polyklonaler Natur ist. Bisher gibt es keine Informationen darüber, ob die durch *in vitro*-Klonierung gewonnenen $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklone die am häufigsten vorkommenden Zellen innerhalb des $V\delta 1^+CD4^+$ -Pools darstellen (höchste Frequenz) oder ob es eine Verzerrung gibt, die durch das unterschiedliche Verhalten jedes einzelnen $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklons während der *in vitro*-Kultur verursacht wird. Weil klassische Kapillarsequenzierung nur die Fragmentlängenanalyse der CDR3-Sequenzen von pan $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen oder aber die $TZRV\delta 1$ -CDR3-Sequenzierung eines einzelnen aufgereinigten/kultivierten $V\delta 1^+CD4^+$ -Klons erlaubt, ist durch diese Art der CDR3-Analyse nicht die Gesamtheit der Eigenschaften des peripheren $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellpools abbildbar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein NGS-basierter Ansatz zur gezielten Sequenzierung von $TZRV\delta 1$ -CDR3-Sequenzen etabliert, der die parallele Sequenzierung der $TZRV\delta 1$ -CDR3s aus mRNA des peripheren pan $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellpools ermöglicht.

Zur Analyse des peripheren $TZRV\delta 1$ -CDR3-Sequenzpools wurden 20 ng RNA einer repräsentativen Probe von peripheren pan $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen, die aus 60 ml Vollblut isoliert

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen

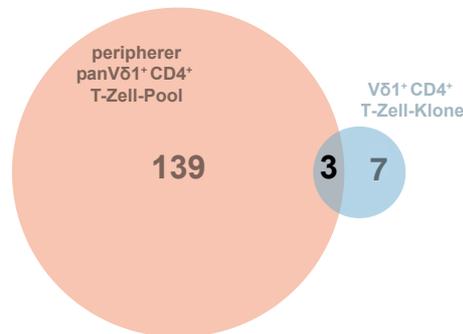


Abbildung 3.1.: Vergleich der TZRVD δ 1-CDR3 Sequenzen des peripheren panV δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Pools und von V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klonen eines Spenders Venn-Diagramm der TZRVD δ 1-CDR3-Sequenzen des V δ 1⁺CD4⁺T-Zellpools der Peripherie (rot) und *in vitro* kultivierten V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klonen (blau).

worden waren, untersucht. Insgesamt wurden 119015 Reads generiert, wobei bioinformatisch 93,44 % der Reads CDR3-Sequenzen zugeordnet werden konnten, die zu 100 % TZRVD δ 1-spezifisch waren (109380 Reads). Die weitere Analyse deutet auf die Heterogenität des V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Pools hin, die sich durch Vorhandensein von 142 einzigartigen TZRVD δ 1-CDR3-Sequenzen abzeichnet.

Die Sanger-Daten der TZRVD δ 1-CDR3-Sequenzen *ex vivo* kultivierter V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone zeigten, dass zwei hochfrequente Klone zusammen ca. 70 % aller *ex vivo* kultivierbaren Klone ausmachen (siehe Tab. 3.1). Unter der Annahme der Unverzerrtheit lässt dies auch eine klare Dominanz dieser beiden TZRVD δ 1-CDR3-Sequenzen in der Peripherie erwarten (s. Tab. 3.1, ID: 1 + 2). Die NGS-Daten des peripheren V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Pools bestätigten einerseits einen hohen Anteil dieser Klone/CDR3s am gesamten Pool, andererseits wurde die erwartete klare Dominanz der Sequenzen in der Peripherie (V δ 1⁺CD4⁺Klone: IDs 1 und 2 in Tab. 3.1, IDs 1 und 6 in Tab. 3.2) jedoch durch Vorhandensein zusätzlicher Sequenzen mit hohen Gesamtreadanteilen relativiert. Die meisten der durch NGS-detektierten Sequenzen wurden in kultivierten V δ 1⁺CD4⁺T-Zellklonen bisher nicht nachgewiesen (s. Tab. 3.2). Die dritthäufigste CDR3-Sequenz (ID 3), die ca. 8,9 % der Gesamtreadanzahl beiträgt, kodiert für eine nicht-funktionale TZRVD δ 1-Kette. Nicht-funktionale CDR3-Sequenzen werden aufgrund einer *out-of-frame*-Veränderung höchstwahrscheinlich nicht komplett translatiert und kodieren somit nicht für eine funktionelle Rezeptorkette. Die hohe Prävalenz der nicht-funktionellen CDR3-Sequenz im Pool aller detektierten TZRVD δ 1-Ketten kann ein Zeichen der parallel aktiven Transkripti-

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.1.: TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen von 29 ex vivo kultivierten V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klonen eines Donors. TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen der ex vivo kultivierbaren Klone wurden mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Der Gesamtanteil entspricht dem Anteil des Klons in Bezug auf alle bis dato ex vivo kultivierbaren Klone dieses Donors. Grau hervorgehobene Sequenzen wurden auch bei der NGS-basierten Analyse des TZRV δ 1-CDR3-Sequenzrepertoires des peripheren V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Pools nachgewiesen. ¹ - nachgewiesen mit Kiona Lim; ² - nachgewiesen von Dr. Marco Sterk

ID	CDR3-Sequenz	Anzahl Klone	Gesamtanteil (%)
1	CALGELVDPAGGYPSTYTDKLIF	15	51,72
2	CALGETALKASTDKLIF	6	20,69
3	CALGEAFLRPGDRADKLIF ¹	1	3,45
4	CALGELRSLESPLIF	1	3,45
5	CALGELRTGEYTDKLIF ¹	1	3,45
6	CALGELSQNKLIF ¹	1	3,45
7	CALGERGRFQTGGPDTDKLIF ²	1	3,45
8	CALGETAALKASTDKLIF ²	1	3,45
9	CALVGTGGDKLIF ¹	1	3,45
10	CALGETAFARWGIRGYTDKLIF ²	1	3,45

on beider Allele eines V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klons mit einer weiteren funktionellen TZR δ -Kette sein. Bei der Analyse des peripheren V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Pools zeigt sich, dass die Längenverteilung der TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen keiner Gauß-Verteilung entspricht und sie ein breites Spektrum von 33 bis 88 bp mit zwei Hauptpeaks bei 60 und 69 bp Länge umfasst. Dieses Muster war bereits in der Fragmentanalyse nach der Adapter-PCR nachweisbar (Daten nicht gezeigt, dominante Amplikonlängen: 250, 267 und 272 bp). In Tab. 3.2 ist die bevorzugte Verwendung von D- und J-Segmenten der 30 häufigsten TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen aus V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen in der Peripherie dokumentiert: es wurden TRDD2- und TRDD3- und überwiegend TRDJ1-Segmente detektiert. Durch Dominanz einiger TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen in den unverzerrten NGS-Daten ist der panV δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Pool der Peripherie des untersuchten Spenders als fokussiert, aber dennoch heterogen charakterisiert worden (s. Abb. 3.2).

Zum Vergleich der Längenverteilungen von TZRV δ 1-CDR3-Sequenzen der V δ 1⁺T-Zell-Subpopulationen, wurden ebenfalls DN und CD8⁺ panV δ 1⁺T-Zellen isoliert und mittels Fragmentlängenanalyse („*spectratype analysis*“) analysiert (siehe Abb. 3.3). Im Gegensatz zur Längenverteilung der panV δ 1⁺CD4⁺T-Zellen sind die TZRV δ 1-CDR3-Längen von DN und CD8⁺ panV δ 1⁺T-Zellen Gauß-verteilt, was einer hohen Diversität dieser Zellentitäten und damit ein nicht selektioniertes Rezeptorrepertoire hindeutet (vgl. Abb. 3.2 und Abb. 3.3).

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen

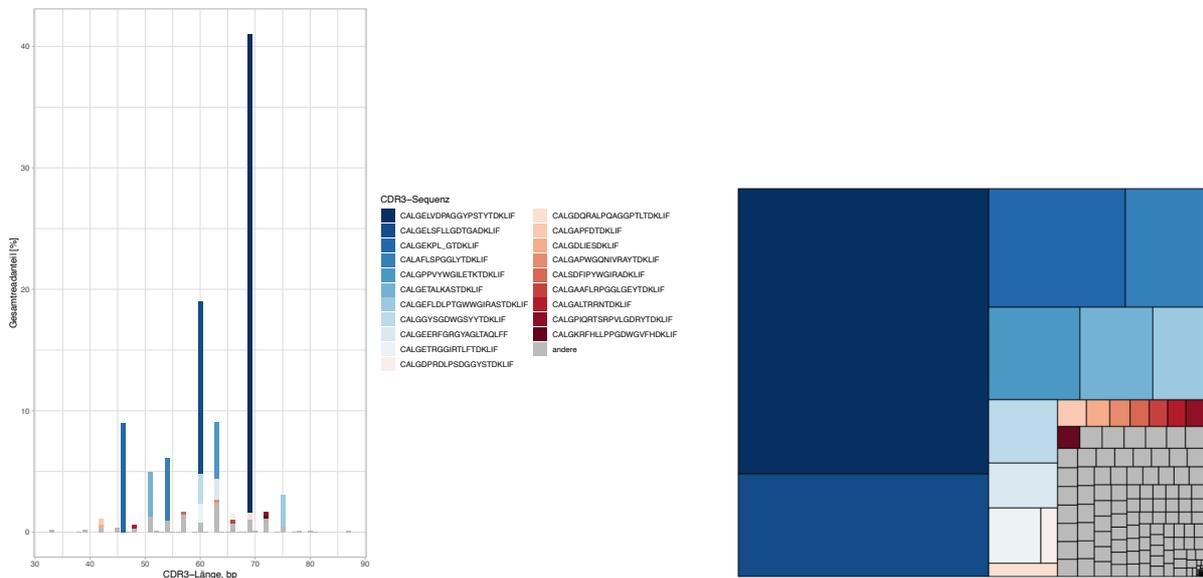


Abbildung 3.2.: Analysen der TZRVS1-CDR3-Sequenzen des peripheren pan $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Pools via NGS. Links - Längenanalyse aller $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell TZRVS1-CDR3-Sequenzen. Rechts - Treepplot-Darstellung des $V\delta 1^+CD4^+$ TZRVS1-CDR3 Sequenzpools.

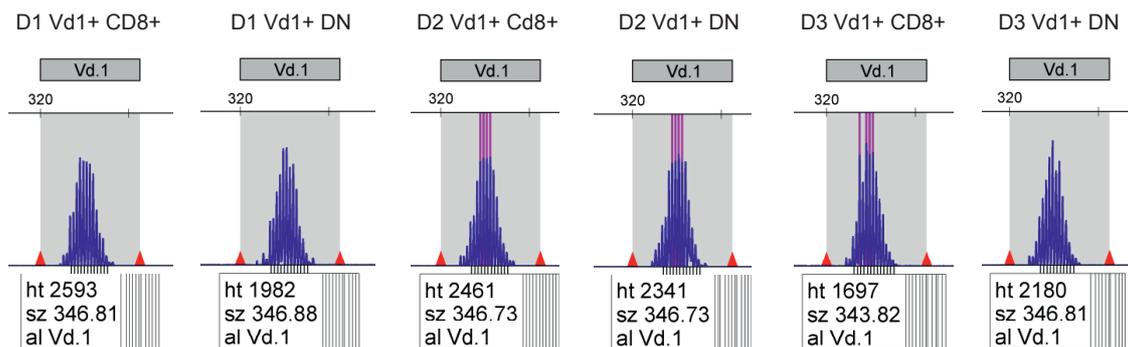


Abbildung 3.3.: TZRVS1-CDR3-Fragmentlängenanalysen der $V\delta 1^+DN$ und $V\delta 1^+CD8^+$ T-Cell Pools dreier Spender. Periphere pan $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen dreier Spender (D1-3) wurden über MACS isoliert. Nach ungefähr 14 Tagen Kultur wurden die TZRVS1-CDR3-Fragmentlängen mittels Kapillarsequenzierung analysiert.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.2.: Top-30 der über NGS-generierten TZR δ 1-CDR3-Sequenzen des Peripheren V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Pools eines Spenders. Grau hervorgehobene Sequenzen wurden auch bei *ex vivo* kultivierten V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klonen nachgewiesen.

ID	CDR3-Sequenz	Anteil aller Reads	D-Segment	J-Segment
1	CALGELVDPAGGYPSTYTDKLI F	0,3948	TRDD3*00	TRDJ1*00
2	CALGELSFLGDTGADKLI F	0,1422	TRDD3*00	TRDJ1*00
3	CALGEKPL_GTDKLI F	0,0896	TRDD2*00	TRDJ1*00
4	CALAFSPGGLYTDKLI F	0,0518	TRDD3*00	TRDJ1*00
5	CALGPPVYWGILETKTDKLI F	0,0468	TRDD3*00	TRDJ1*00
6	CALGETALKASTDKLI F	0,0373	TRDD2*00	TRDJ1*00
7	CALGEFLDLPTGWWGIRASTDKLI F	0,0264	TRDD3*00	TRDJ1*00
8	CALGGYSGDWGSYYTDKLI F	0,0241	TRDD3*00	TRDJ1*00
9	CALGEERFGRGYAGLTAQL FF	0,0171	TRDD3*00	TRDJ2*00
10	CALGETRGGIRLFTDKLI F	0,0160	TRDD3*00	TRDJ1*00
11	CALGDPRLPSDGGYSTDKLI F	0,0051	TRDD3*00	TRDJ1*00
12	CALGDQRALPQAGGPTLTDKLI F	0,0050	TRDD3*00, TRDD2*00	TRDJ1*00
13	CALGAPFDTDKLI F	0,0043		TRDJ1*00
14	CALGDLIESDKLI F	0,0035		TRDJ1*00
15	CALGAPWGQNI ^R RAYTDKLI F	0,0030	TRDD3*00	TRDJ1*00
16	CALSDFIPYWGIRADKLI F	0,0028	TRDD3*00	TRDJ1*00
17	CALGA ^A FLRPGGLGEYTDKLI F	0,0027	TRDD2*00	TRDJ1*00
18	CALGALTRRNTDKLI F	0,0027		TRDJ1*00
19	CALGPIQRTSRPVLGDRYTDKLI F	0,0027	TRDD3*00	TRDJ1*00
20	CALGKRFHLLPPGDWGVFHDKLI F	0,0027	TRDD3*00	TRDJ1*00
21	CALGELFALSPRTDLYTDKLI F	0,0027	TRDD3*00	TRDJ1*00
22	CALGEPFPRKGQGVYTDKLI F	0,0027		TRDJ1*00
23	CALGELGFYDQGLLGVKARPLI F	0,0026	TRDD3*00	TRDJ4*00
24	CALGDYYASGDTRGDTDKLI F	0,0025	TRDD3*00	TRDJ1*00
25	CALGDGLPTYWGDKGGR ^L TAQL FF	0,0023	TRDD2*00	TRDJ2*00
26	CALGDGRGWGAALTAQL FF	0,0023	TRDD3*00	TRDJ2*00
27	CALGVPLKPLGLGARYTDKLI F	0,0022	TRDD3*00	TRDJ1*00
28	CALVGTGGDKLI F	0,0021	TRDD3*00	TRDJ1*00
29	CALGEQLPPPSVWGGARWGDKLI F	0,0021	TRDD3*00	TRDJ1*00
30	CALGDHYAVLGDITDKLI F	0,0020	TRDD3*00	TRDJ1*00

3.1.2. Transkriptom- und Proteomanalysen mehrerer V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone

Im letzten Jahrzehnt wurde herausgefunden, dass eine Kombination der Zytokine IL-2, IL-7 und des Mitogens PHA eine *ex vivo* Kultur von T-Zellklonen ermöglicht (z. B. (20)). T-Zellen benötigen demnach ein gewisses Maß an Stimulation zur Proliferation. Physiologisch wird IL-2 von aktivierten T-Zellen sezerniert, es ist an der B- und NK-Zell-Stimulation beteiligt und führt zur T-Zellproliferation (1). Im Gegensatz dazu wird IL-7 von nicht-lymphatischen Zellen wie thymischen Stromazellen, Keratinozyten und Milzzellen sekretiert und ist essentiell für die Thymozytenentwicklung und -proliferation sowie für die Proliferation von reifen T-Zellen und Prä-/Pro-B-Zellen und die Homöostase naiver T-Zellen (93–95).

Um zu untersuchen, ob V δ 1⁺T-Zellen in der *ex vivo* Standardkultur (auto- oder parakrin stimulierendes) IL-2 produzieren und sezernieren können, wurden intrazelluläres IL-2 und IFN- γ in panV δ 1⁺T-Zellen von zwei Spendern nach 16 Tagen der *ex vivo* Kultur untersucht. Als Voraussetzungen der Stimulierbarkeit durch die Zytokine IL-2 und IL-7 wur-

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen

den die Oberflächenexpressionen des IL-2-Rezeptors (bestehend aus den drei Ketten CD25, CD122, CD132) sowie die der IL-7 α -Kette (CD127) bestimmt (Abb. 3.4). 77,46 % (SD=29,25%) der untersuchten Klone waren CD25-positiv, 5,83 % (SD=0,85 %) CD122-positiv und 26,10 % (SD=5,69 % CD132-positiv (siehe Abb. 3.4). CD132 ist die so genannte „ γ -chain“ und dient als Co-Rezeptorkomponente für fünf verschiedene Zytokinrezeptoren, nämlich die von IL-2, IL-4, IL -7, IL-9, IL-15 und Interleukin-21. Die IL-7 α -Kette CD127 wurde, da bereits auf $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellklonen nachgewiesen (20), nur bei einem Klon (JK11) untersucht und hier auf 99,8% der Zellen detektiert (Daten nicht gezeigt).

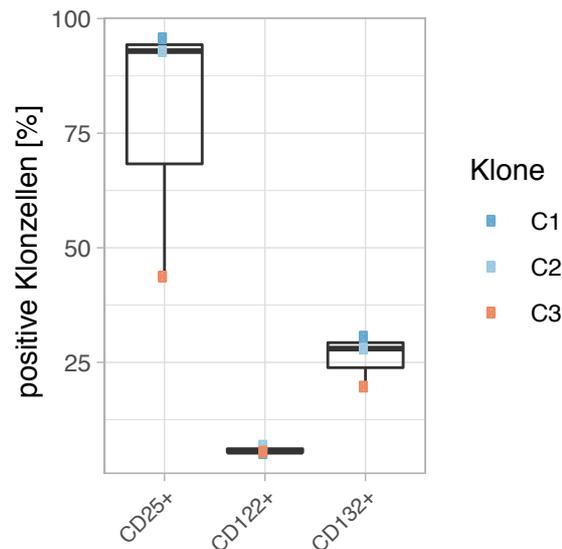


Abbildung 3.4.: Nachweis der IL2-Rezeptoruntereinheiten auf $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klonen. In dieser Abbildung sind die, durchflusszytometrisch generierten, prozentualen Anteile CD25, CD122 und CD132-positiver Klone (Gate: lebende Lymphozyten, s. Tab. 2.13) dargestellt (n=3).

Tabelle 3.3.: Analyse des Aktivierungszustandes von pan $V\delta 1^+$ T-Zellen in der Standardkultur. Die FACS-Analyse des intrazellulären IL-2 und IFN- γ wurde bei pan $V\delta 1^+$ T-Zellen zweier Spender nach 16-tägiger Kultur unter Standardkultur in RPMI⁺ durchgeführt. Die FACS-Messewerte wurden auf lebende T-Zellen beschränkt (Aqua-Zombie⁻, CD3⁺).

T-Zell-Fraktion	Donor 1 (%) positiver Zellen aller lebender T-Zellen	Donor 2
$V\delta 1^+$	97,9	99,9
$V\delta 1^+CD4^+$	1,6	0,5
$\alpha\beta^+$	0,3	0,2
IFN- γ^+ IL-2 ⁺	1,2	0,1

Die Datenanalyse der beiden pan $V\delta 1^+$ T-Zell-Proben zeigte, dass nur 1,2% der Zellen nach kurzzeitiger *ex vivo* Kultur unter Standardbedingungen IFN- γ^+ IL-2⁺ (Tab. 3.3) sind. In beiden Proben wurde jedoch auch ein geringer Anteil an $\alpha\beta$ T-Zellen nachgewiesen, die höchstwahrscheinlich durch Zugabe von bestrahlten allogenen PBMCs (Feeder-Zellen) an Kulturtag 11 eingeführt wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1.3. Untersuchungen einer möglichen Analogie zur thymischen T-Zell-Entwicklung

Die Einteilung der Thymozyten während der thymischen Entwicklung erfolgt auf Grundlage des molekularen Profils jeder Zelle, einschließlich Transkriptom- und Proteomanalysen sowie Studien der Proteinlokalisierung. Die meisten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone waren unter Standardbedingungen, welche einem milden Entzündungsmilieu ähnelt, bis zu einem Jahr kultivierbar. Die Analogie der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone zu den thymischen T-Zell-Entwicklungsstadien DN1-3 ist bekannt (20). Nun wurden weitere Untersuchungen der Genexpression von Schlüsselkomponenten (Transkriptionsfaktoren und Targets) der frühen thymischen T-Zell-Entwicklung analog zu (38) mittels relativer qRT-PCR untersucht. Der Vergleich verschiedener $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellklone auf Transkriptom- und Proteomeebene erlaubt Diskrepanzen im allgemeinen molekularen Muster der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone aufzudecken, um dadurch mögliche Unterschiede in Hinblick auf ihr Transdifferenzierungsverhalten retrospektiv erklären zu können. Zusätzlich kann über Charakterisierung mehrerer Klone der Grad der Heterogenität des $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitor-Pools aufgedeckt werden. Um die relative Genexpression zu bestimmen und damit einen Vergleich mit der Literatur zu ermöglichen, wurde basierend auf dem Bericht von Mane und Kollegen, der die modulationsresistente Expressionsrate dieses Gens in $CD4^+$ T-Zellen hervorhob, *rpl13a* als Housekeeping-Gen gewählt (88, 96).

Die untersuchten *in vitro* kultivierten $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitoren zeigten sich heterogen in ihren relativen Genexpressionen, die sich in Gesamtheit von der in Thymozyten (3.5) unterschied. Die höchsten relativen Expressionsniveaus wurden für *runx3*, einem Marker für $\gamma\delta$ T-Zellen (43) und *id2*, dessen Überexpression als Zeichen einer blockierten frühen thymischen Entwicklung von $\gamma\delta$ T-Zellen berichtet wurde (97, 98), festgestellt. Im Vergleich zu Thymozyten im Stadium DN3a (vor der β -Selektion) wurden minimale relative Expressionsniveaus von *e2a*, *heb*, *lef1*, *tcf7* und *myc* festgestellt, was auf ein frühes thymisches Entwicklungsstadium (DN1-2) hindeutet (38). Allerdings muss dazu gesagt werden, dass a) die Analyse des Transkriptoms nicht zwingend dem des Proteoms entspricht, b) der Vergleich mit Thymozyten nur als Anhalt maximaler Expressionsniveaus unterschiedlicher Gene angesehen werden soll und dafür eingesetzt wurde, weil c) die Thymozyten nicht selektiert waren und damit alle Entwicklungsstadien die in Cortex und Medulla vorhanden sind umfassten.

Ein Zeichen für den ISP-zu-DP-Übergang der Thymozyten ist die Reinduktion der Gene *rag1* und *rag2*, die für zwei Schlüsselenzyme der V(D)J-Rekombination von TZR-Genloci kodieren und für die Rekombination des TZR α -Lokus unerlässlich sind (55). Bezogen auf die Transdifferenzierung ist die *Rag*-Reinduktion eine Voraussetzung für die Reaktivierung der V(D)J-Rekombination des TZR β -Lokus im Verlauf der Transdifferenzierung. Um die Expressionsniveaus von *rag* in unter Standardbedingungen kultivierten Klonen (beschrieben in M & M) im Vergleich zu Thymozyten bewerten zu können, wurden die mRNA-Niveaus von vier Klonen und einer Thymozyten-Kontrollprobe mit-

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen

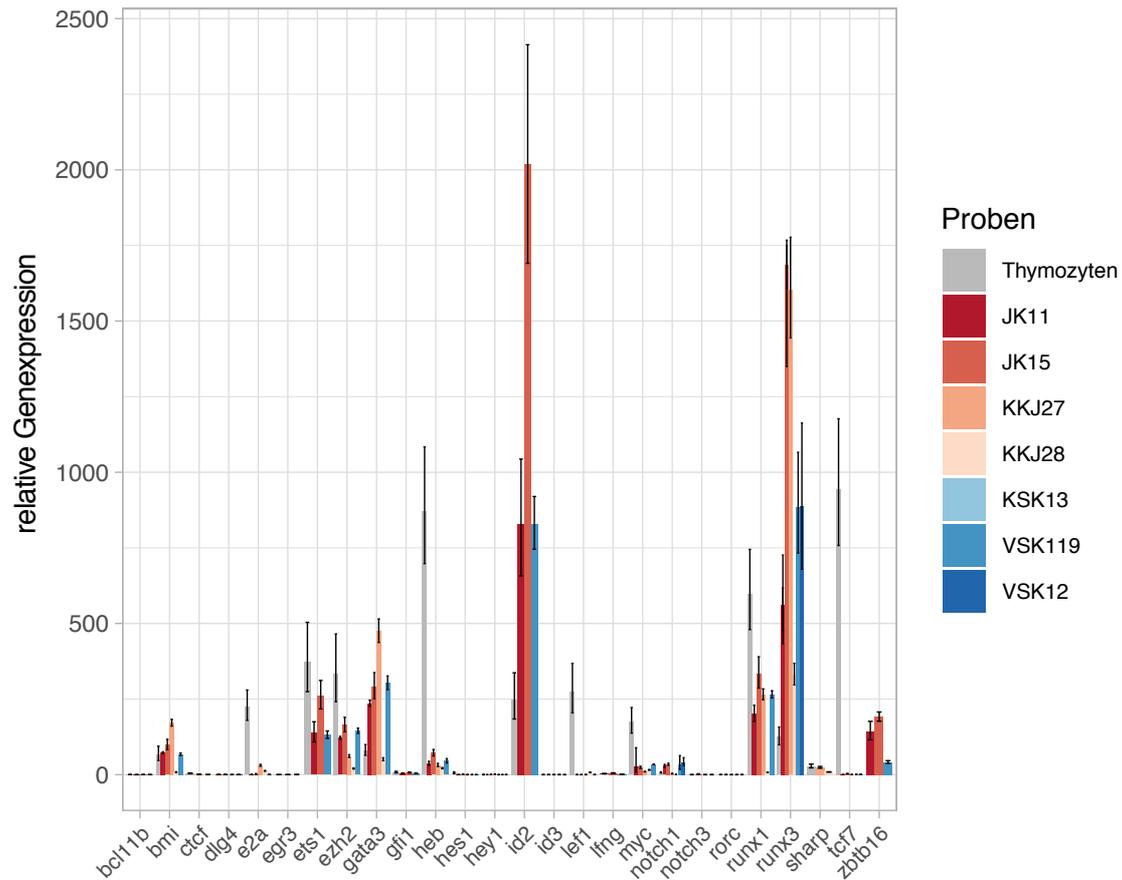


Abbildung 3.5.: Genexpression ausgewählter Transkriptionsfaktoren und Komponenten der frühen thymischen T-Zell-Entwicklung. Dargestellt sind die Analysen der Genexpressionsmuster essentieller Transkriptionsfaktoren und Komponenten der frühen thymischen T-Zell Entwicklung aus mRNA Proben von sieben V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klonen (farblich markiert) und einer Probe primärer humaner Thymozyten (grau). Die Daten der einzelnen Marker wurden jeweils auf *rp113a* normalisiert.

3. ERGEBNISSE

tels qRT-PCR relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.6). Obwohl *rag1* und *rag2* mRNAs in allen Proben nachgewiesen werden konnten, zeigten $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klone im Vergleich zu Thymozyten nur marginale mRNA-Spiegel, was auf einen nicht-differenzierenden Zustand der $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klone unter Standardkulturbedingungen hinweist. Zusätzlich unterschied sich die Probe KKJ28 von den anderen untersuchten $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klonen und zeigte eine höhere relative *rag1/2* Genexpression, was die Heterogenität des Progenitor-Pools in Bezug auf ihre Transdifferenzierung-Schwellenwerte zeigt.

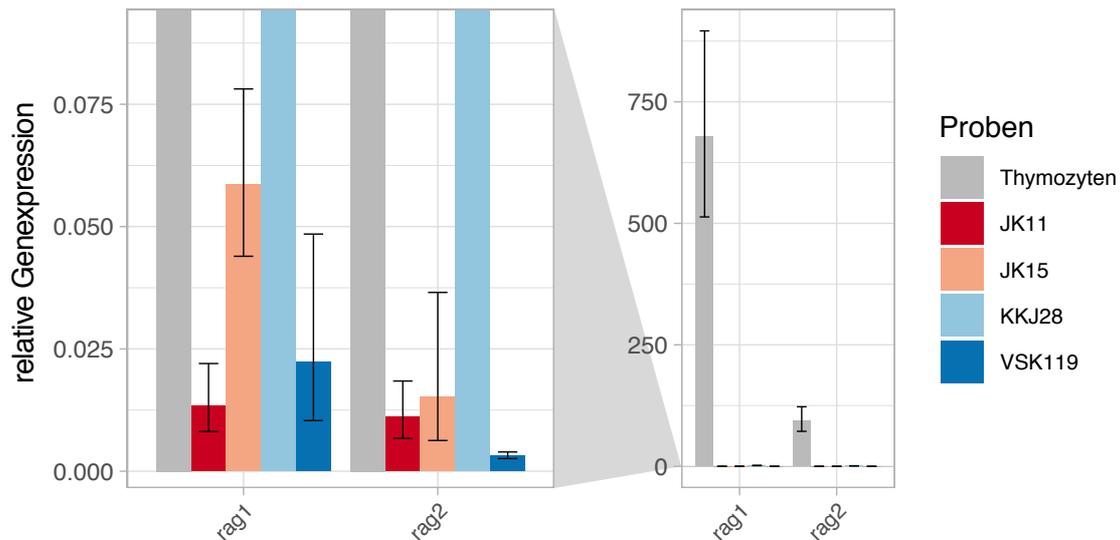


Abbildung 3.6.: Rag-Genexpression. Auf *rpl13a* normalisierte relative Expression der *rag1* und *rag2* mRNA-Levels von Thymozyten (grau, n=1) und vier $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klonen (gefärbt).

3.1.3.1. Der Notch-Signalweg in $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell Klonen

Dass Notch-medierte Signale essentiell für die T-Zell-Entwicklung und Lineage-Entscheidung ist wurde bereits vielfach berichtet (z. B. (38, 42, 44)). Daher wurde der Genexpressionsstatus von *notch*, Notch-Liganden, Notch-Targets und Notch-Antagonisten auf Progenitorclonen und Thymozyten mittels relativer RT-qPCR untersucht (Abb. 3.7). Die acht untersuchten Klone zeigten heterogene relative *notch 1*-Expressionen, wobei die Werte sich um den Wert von Thymozyten verteilten (Abb. 3.7). Die *notch2*-Expression aller untersuchten Klone war vergleichbar mit seiner *notch1*-Expression und konstant höher in Progenitorzellen als in Thymozyten. Im Gegensatz dazu hatten *notch3* und *notch4* ähnliche minimale Expressionsraten in Klonen wie in Thymozyten (vgl. (52)).

Wie in Abb. 3.8 dargestellt zeigten die untersuchten $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klone in Bezug auf Notch-Liganden ein ähnliches Genexpressionsmuster. Die untersuchten Progenitor-Klone wiesen übereinstimmend eine geringe *jag1*-Expression und transkribierten *dll3* nicht, während sie ähnliche, leicht erhöhte Raten an *jag2*-, *dll1*- und *dll4*-mRNA im Vergleich zu Thymozyten aufweisen. Ein Klon hatte erhöhte *jag1* (VSK12), ein anderer Klon erhöhte *dll1*-Transkriptspiegel (KKJ28), während für *dll4* ein weiterer Klon ei-

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellen

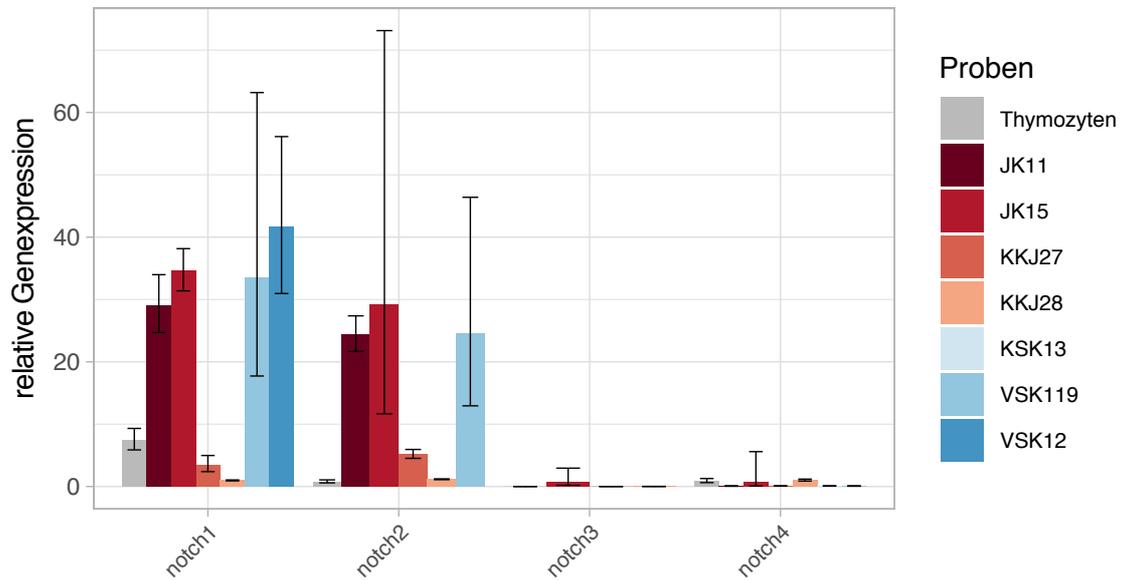


Abbildung 3.7.: Notch-Genexpression der $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zell-Klone. Expression der *notch*-Gene relativ zu *rpl13a* aus $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zell-Klon mRNA.

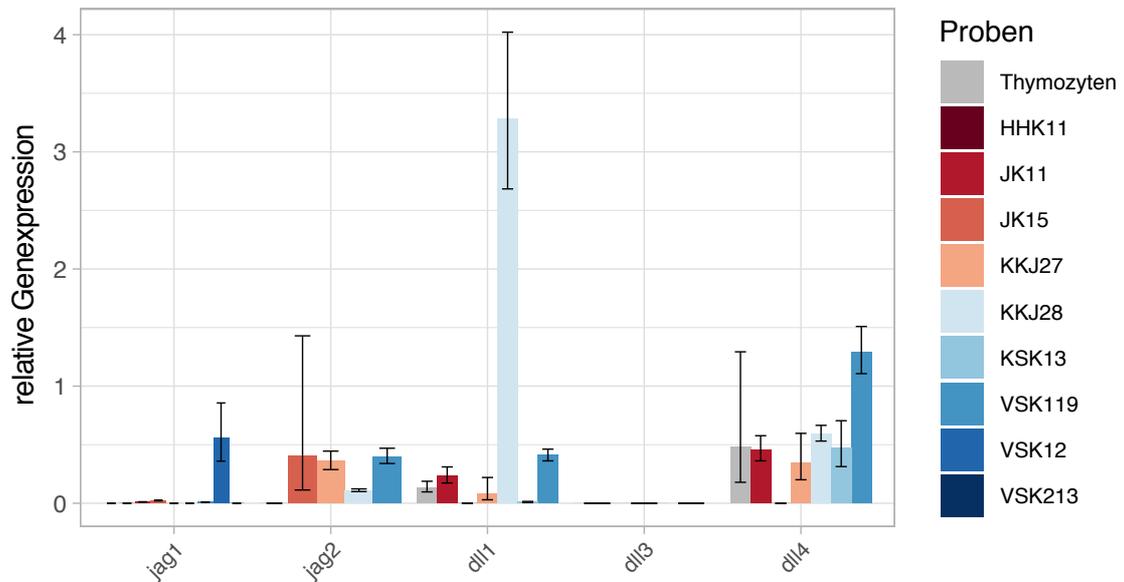


Abbildung 3.8.: Genexpression der Notch-Liganden. Zu *rpl13a* normalisierte Genexpression der Notch-Liganden von $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Klonen (farblich markiert) und Thymozyten (grau).

3. ERGEBNISSE

ne verminderte Genexpression zeigte (JK15). Progenitor-Klone zeigten somit ähnliche relative Transkriptionsraten der Notch-Liganden wie Thymozyten. $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klone zeigten insgesamt jedoch mehr *jag2*-Expression als Thymozyten bei vergleichbarer *dll4*-Genexpression. Wie in (44) beschrieben, ist Jag2 der dominante Notch-Ligand des thymischen Kortex und wird hauptsächlich auf cTECs, mit höchstem Level an der CMJ und Abnahme in Richtung subkapsulärer Zone, exprimiert. Falls die Translation von *jag2* nicht negativ reguliert ist, könnte die Präsenz von Jag2 auf $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klonen in der Standardkultur auch eine autologe Stimulation über Notch durch die $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen selbst ermöglichen, die dem "priming" der DN1-Zellen an der CMJ entspricht (homotypische Aggregation). Bei unselektionierten Thymozyten, die mehr als 80 % DP-Zellen enthalten, ist eine Stimulation über Jag2 basierend auf unseren Daten nur in geringem Umfang möglich.

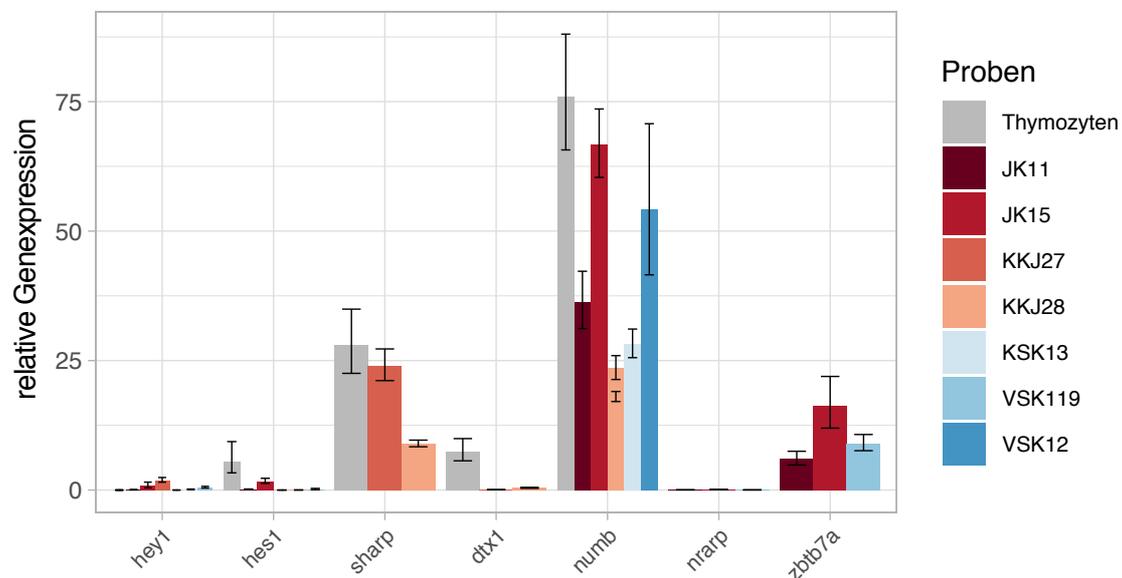


Abbildung 3.9.: Genexpression ausgewählter Notch-Targets und Notch-Antagonisten. Zu *rpl13a* normalisierte Genexpressionen der Notch-Targets (*hey1*, *hes1*, *dtx1* und *nrarp*) und Notch-Antagonisten (*sharp*, *numb*, *zbtb7a*) von $V\delta 1^+CD4^+$ -Klonen (farblich markiert) und Thymozyten (grau).

Insgesamt lag die relative Genexpression der Notch-Targetgene, außer *hey1*, bei $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitor-Klonen unter derjenigen von Thymozyten (siehe Abb. 3.9). Die relative Expression der klassischen Notch-Targets *hey1*, *hes1*, *dtx1* und *nrarp* in $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klonen war heterogen und lag im Mittel unter 1 (z. T. am unteren Detektionslimit der qPCR), während höhere relative Genexpressionen für *sharp* (MW = 16,49, 37,4–85,5% vgl. zu Thymozyten), *numb* (MW = 41,78) und *zbtb7a* (MW = 10,41) detektiert wurden. Diese Gene kodieren für drei Notch-Signaling-Antagonisten: den Transkriptionsrepressor Sharp, der die Transkription der Notch-Zielgene bei inaktivem Notch unterdrückt (99), Notch-Inaktivator Numb (100) und Zbtb7a, einen Repressor des moderaten Notch-Signalings (101).

3.1.4. TZR-Revision als Mechanismus der Transdifferenzierung

Wie von Fink und Kollegen berichtet könnte die *Rag*-Reinduktion möglicherweise durch den Verlust eines tonischen Signals provoziert werden, wobei Germinalzentren als Ort der TZR-Revision berichtet wurden (siehe 1.3.2). Daher wurde die Ähnlichkeit der Transdifferenzierung zur TZR-Revision von $CD40^+$ -T-Zellen in Keimzentren sowie die Präsenz möglicher (auto-stimulatorischer) Liganden von $V\delta 1^+ CD4^+$ -T-Zellen in Hinblick auf eine TZR-Revision untersucht (CD1a/b/d, Integrine, MICA/B).

CD40 ist ein co-stimulatorisches Molekül, das normalerweise auf aktivierten APCs, aber auch auf wenigen auto-immunen T-Zellen, vorhanden ist und die T-Zell-Aktivierung, den Ig-Klassenwechsel von B-Zellen und die Rekombinationsmaschinerie (*Rag1/2*) für die TZR-Revision autoimmuner $CD4^{low}$ T-Zellen induzieren kann (57, 102, 103). Cerutti und Kollegen berichteten für die humane monoklonale B-Zell-Linie „CL-01“, dass *in vitro* eine CD40-Stimulation unter minimaler Zytokinsupplementierung (IL-4, IL-10 und IL-6) ausreicht, um einen Ig-Klassenwechsel mit der für Keimzentren beschriebenen Abfolge sowie eine Differenzierung in Gedächtnis- und Plasmazellen zu induzieren (57). Um zu bestimmen ob $V\delta 1^+ CD4^+$ -Progenitoren CD40 tragen wurden zwei $V\delta 1^+ CD4^+$ -Progenitor-Klone untersucht (siehe Abb. 3.10). Dabei unterschied sich das Signal nicht von den Isotyp-Kontrollen (IgG1-Antikörper), was bedeutet, dass unter Standardkulturbedingungen auf *ex vivo* kultivierten $V\delta 1^+ CD4^+$ -Zellklonen kein CD40 detektierbar ist.

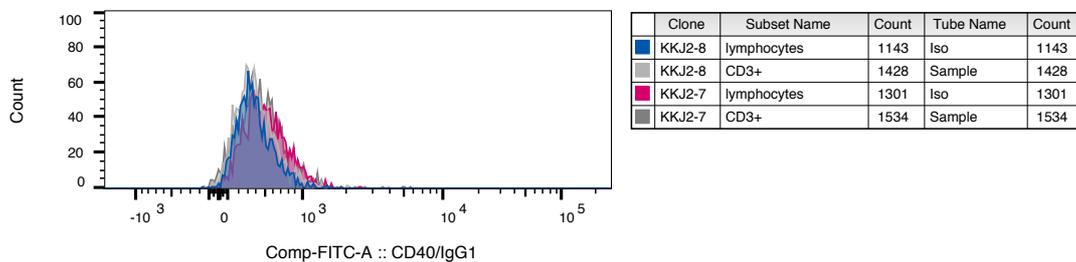


Abbildung 3.10.: CD40-Oberflächenexpression auf $V\delta 1^+ CD4^+$ -T-Zell-Progenitoren. Durchflusszytometrische Analyse der CD40-Oberflächenexpression zweier $V\delta 1^+ CD4^+$ -T-Zell-Progenitoren (blau und pink). Grau - Isotyp-Kontrollen beider Klone.

3.1.4.1. $V\delta 1^+ CD4^+$ -T-Zell Liganden-Analysen

Da nicht-konventionelle MHC-ähnliche Moleküle potenzielle Liganden von $V\delta 1^+$ -T-Zellen sind (s. 1.1.2), sollte die Möglichkeit der autologen Stimulation von $V\delta 1^+ CD4^+$ -T-Zellen durch CD1a-, CD1c- und CD1d-Moleküle mittels Durchflusszytometrie untersucht werden (Abb. 3.11). Durch permanente TZR-Stimulation könnte folglich die Transdifferenzierung der Progenitoren in Analogie zur TZR-Revision, durch Ausbleiben der *Rag*-Reinduktion, verhindert sein. Auf beiden untersuchten Klonen war keine signifikante CD1a-, CD1c- oder CD1d-Expression nachweisbar (siehe Abb. 3.11).

3. ERGEBNISSE

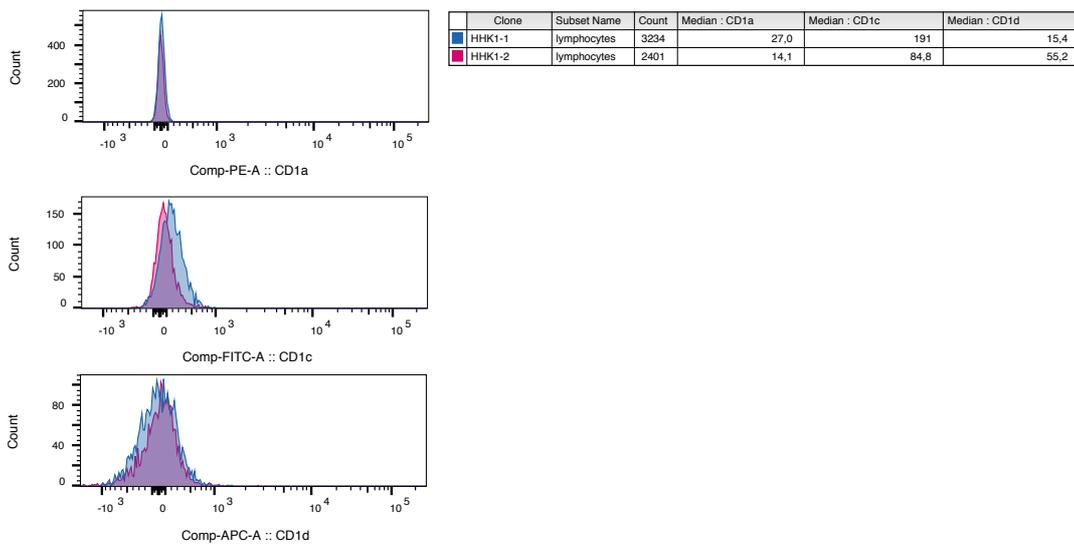


Abbildung 3.11.: Oberflächenexpression von CD1a/c/d auf zwei Vδ1⁺CD4⁺T-Zell-Klonen. Durchflusszytometrische Analyse zweier Vδ1⁺CD4⁺T-Zell-Klone (viabel/Lymphozyten s. 2.13).

3.1.4.2. Integrine

Wie bereits beschrieben (siehe 1.3.2) wirken Integrine bei T-Zellen in vielfältiger Weise an kritischen Schritten der Immunantwort, z. B. einer stabilen APC-T-Zell-Interaktion, oder auch als Co-Stimulatoren der TZR-induzierten Aktivierung über LFA-1 und Modulation der IL-2 Produktion (z. B. (62)). Daher wurden mehrere Vδ1⁺CD4⁺Progenitor-Klone auf das Vorhandensein von Integrin-Untereinheiten auf Transkriptom- und Proteomebene untersucht.

Wie in Abb. 3.12 gezeigt, wurden die höchsten Genexpressionsniveaus für *itgaL*, *itga4*, *itgb2*, *itgb1* und *itga1*, *itgb7* und *itga5* in abnehmender Reihenfolge nachgewiesen. Sehr geringe Konzentrationen von *itgaM*, *itgaV* sowie noch geringere Konzentrationen von *itga2*, *itga3*, *itga6*, *itga7*, *itga11*, *itgb3*, *itgb4*, *itgb5*, *itgb6* und *itgb8* Transkripte waren nachweisbar (Abb. 3.12). Generell unterschied sich die Integrin-Genexpression des Klons KKJ28 am stärksten von den anderen fünf untersuchten Klonen (Abb. 3.12). Kombiniert man die Integrin-Untereinheiten wie in Abb. 3.13 dargestellt, würde man die Expression von **LFA-1** (ITGaL/CD11a + ITGb2/CD18), **VLA-4** (ITGa4/CD49d + ITGb1/CD29) und **VLA-1** (ITGb1/CD29 und ITGa1/CD49a) und **VLA-5** (ITGa5/CD49e + ITGb1/CD29) erwarten.

Übereinstimmend zeigte sich auf Proteinebene (s. Abb. 3.14), dass LFA-1 auf 97,42% (SD=1,19%, n=6) der Zellen detektierbar ist. Auf den untersuchten Progenitorklonen wurde VLA-5 auf 97,75% der Zellen identifiziert (SD=2,47%, n=6). Zusätzlich waren 99,6% der Klonzellen LFA-3-positiv (CD58, SD=0,14%, n=2; siehe auch Abb. A.2), während sein Ligand CD2 auf 41,5% der Zellen exprimiert wurde (SD=14,85%, n=2). VLA-4 wurde auf einem niedrigeren Niveau und mit großer Differenz auf den beiden untersuchten Klonen nachgewiesen (20,25%, SD=23,10%, n=2), was auf die geringe Anzahl von CD49d⁺

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellen

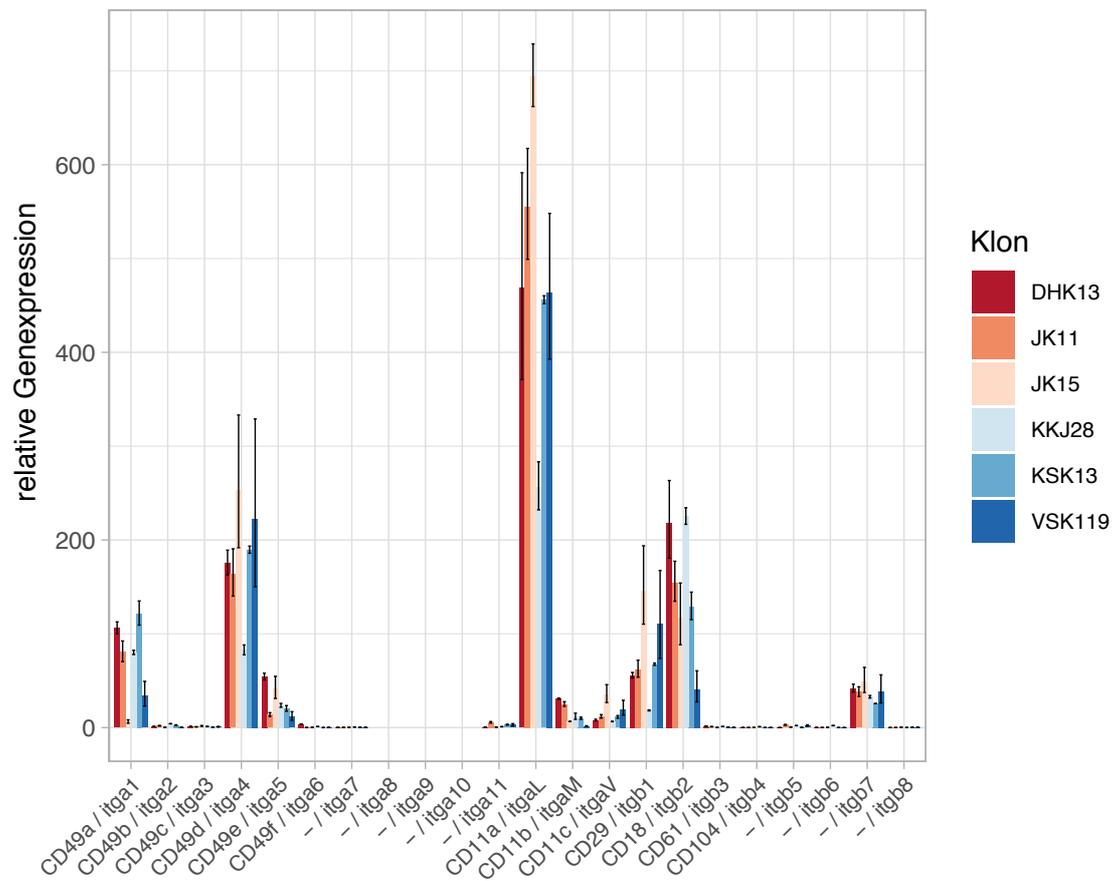


Abbildung 3.12.: Genexpression repräsentativer Integrinuntereinheiten. Genexpression ausgewählter Integrinuntereinheiten in $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zell-Klonen (relativ zu *rpl13a*, n=6).

3. ERGEBNISSE

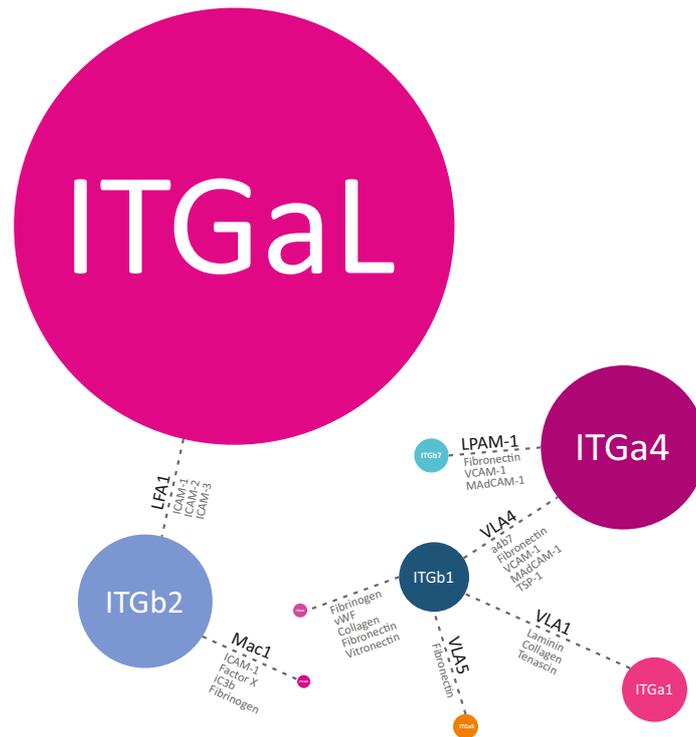


Abbildung 3.13.: Bubble-Plot der Genexpressionen ausgewählter Integrine. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der sechs untersuchten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone (siehe Abb. 3.12, $n=6$).

Zellen zurückzuführen ist (siehe Abb. A.1).

Jung und Kollegen berichteten 2016, dass ARAP für die Aktivierung der TZR-vermittelten Signaltransduktion (Outside-In-Signale) und die Integrin-vermittelte Adhäsion (Inside-Out-Signale z. B. über LFA-1) aktivierter T-Zellen erforderlich ist (104). Übereinstimmend finden sich hohe Konzentrationen von ARAP im Thymus und in sekundären lymphatischen Geweben wie den Tonsillen (104). Die beiden untersuchten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone wiesen nur minimale *arap*-Genexpressionsniveaus auf (mittlere relative Expression=0,05, siehe Abb. 3.15), was den Schluss zulässt, dass in der Standardkultur der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone keine ARAP-vermittelte TZR-Stimulation und/oder Integrin-Signaling erfolgt.

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellen

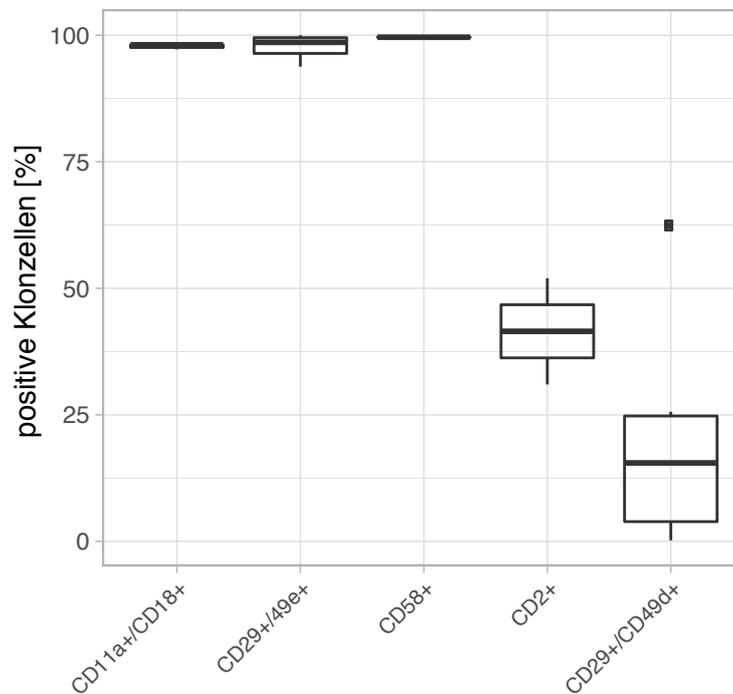


Abbildung 3.14.: Integrine auf $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zell-Klonen FACS-Analyse von **LFA-1** (ITGaL/CD11a + ITGb2/CD18, n=6), **VLA-5** (ITGa5/CD49e + ITGb1/CD29, n=6), **LFA-3** (CD58, n=2) sowie dessen Liganden CD2 (n=2) und **VLA-4** (CD29 + CD49d, n=6).

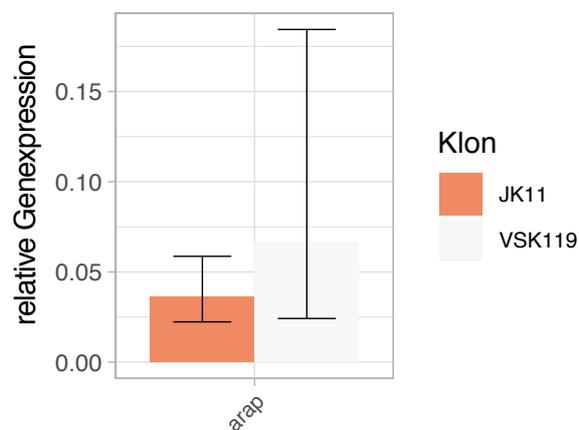


Abbildung 3.15.: ARAP-Genexpression in $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zell-Progenitoren relativ zu *rp13a*.

3. ERGEBNISSE

3.1.4.3. Lair-1 - ein Antagonist des TZR-Signalings

Die Analyse der *lair-1* mRNA-Spiegel der $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitorklone zeigte, dass alle Klone eindeutig *lair-1* transkribieren (mittlere relative Genexpression = 94,89, SD = 27,0, n = 6, siehe Abb. 3.16).

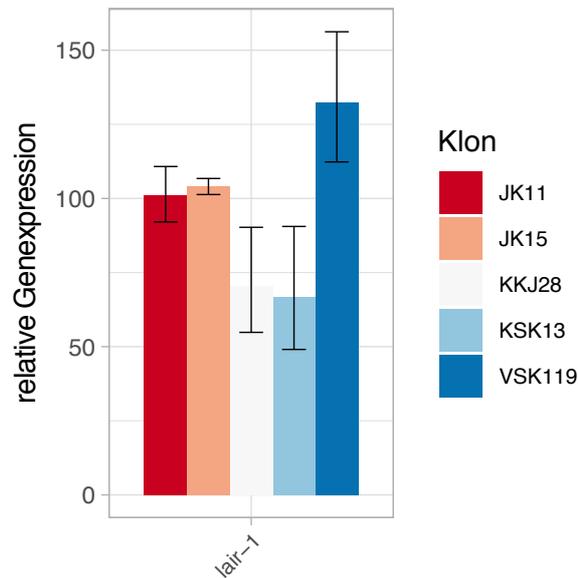


Abbildung 3.16.: Genexpression von *Lair-1* in $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klonen. *Lair-1* Genexpression relativ zu *rpl13a* in *ex vivo* kultivierten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klonen (n=5).

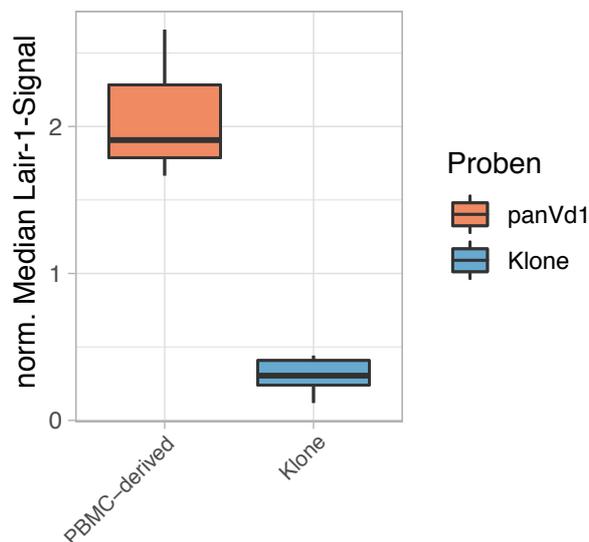


Abbildung 3.17.: *Lair-1* auf peripheren pan $V\delta 1^+$ T-Zellen und kultivierten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klonen. Der Median des *Lair-1*-Signals peripherer pan $V\delta 1^+$ T-Zellen wurde auf die *Lair-1*-Levels der zugehörigen $CD3^+$ PBMC-Frakturen normalisiert (PBMC-derived, n = 3). Für die kultivierten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone (n=6) wurde der entsprechende *Lair-1*-Median unter Verwendung des Mittelwertes aller *Lair-1*-Mediane peripherer pan $V\delta 1^+$ T-Zellen normalisiert.

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellen

Da Lair-1 auf den meisten PMBC-Subtypen konstitutiv exprimiert wird, können PMBC-Subtypen nicht als Negativkontrolle zur Bestimmung der Baseline-Fluoreszenzintensität von Lair-1⁻ Zellen, herangezogen werden (105). Zur Beurteilung der Höhe des Lair-1-Spiegels peripherer $V\delta 1^+$ T-Zellen wurde der Wert der entsprechenden $CD3^+$ PMBC-Fraktion verwendet (Abb. 3.17, PMBC-derived). Zur Analyse des Einflusses der *ex vivo*-Kultur auf die Lair-1-Oberflächenexpression der $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zell-Klone wurde auf den Mittelwert der peripheren nicht-kultivierten $V\delta 1^+$ T-Zellen („PMBC-derived“) normalisiert (Abb. 3.17, Klone). Diese Analysen zeigen, dass periphere $V\delta 1^+$ T-Zellen *ex vivo* 1,91-fach (SD=0,52, n=3) mehr Lair-1, im Vergleich zur mittleren $CD3^+$ PMBC-Fraktion, aufweisen, während Lair-1 auf kultivierten $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zell-Klonen um 77% niedriger liegt (0,23, SD=0,08, n=6, Abb. 3.17).

3.1.4.4. Analyse von MMPs als bekannte Komponenten der T-Zell-Entwicklung und der TZR-Signaltransduktion

Die Matrix-Metalloproteasen Adam10 und Adam7 sind entscheidend für das Abtrennen vieler Zielmoleküle, wie Notch-Moleküle, Notch-Liganden, ECM oder z. B. MICA/B (47, 106). Außerdem konnte für T-Zellen gezeigt werden, dass Adam10 und Adam17 bei der Notch-vermittelten $CD4$ vs. $CD8$ „*cell fate decision*“, aber auch für die Proliferation unverzichtbar sind und sie ihren Liganden LAG-3 ($CD223$), einen negativen Regulator der T-Zell-Effektor-Funktion, der nach T-Zell-Aktivierung exprimiert wird, abspalten (47, 107). Sie können deshalb als wichtige Regulatoren von T-Zellen während der Entwicklung und Funktion angesehen werden (47).

Um sicherzustellen, dass Adam-regulierte Prozesse in $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellen, die *ex vivo* kultiviert wurden, nicht grundsätzlich durch Fehlen dieser MMPs verhindert sind, wurde die mRNA von vier Progenitorclonen einer Genexpressionsanalyse unterzogen (siehe Abb. 3.18). Dabei zeigte sich, dass auf der Transkriptionsebene Adam-MMPs in allen vier Klonen in einem ähnlichen Bereich nachweisbar sind.

3. ERGEBNISSE

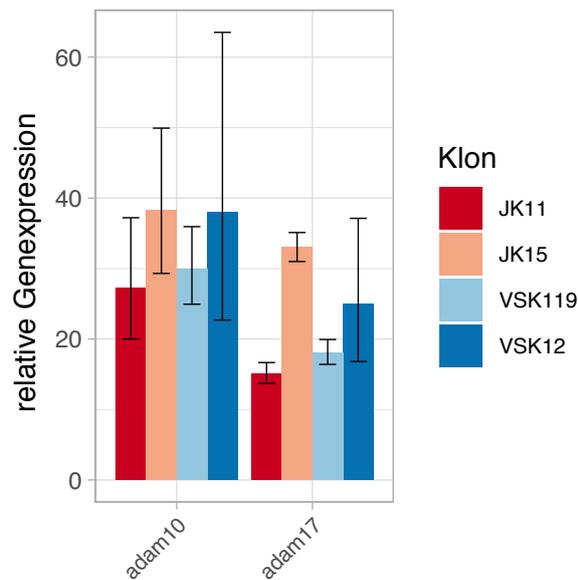


Abbildung 3.18.: Genexpression von *adam10* and *adam17* MMPs in $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klonen. Zur Analyse der *adam10* und *adam17* Expression *ex vivo* kultivierter $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klone wurde mRNA von insgesamt vier Klonen (zweier Spender) mittels *rpl13a* normalisiert und analysiert.

3.1.5. $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen im Inflammationskontext

CXCR4 ist ein Chemokinrezeptor, der die Migration zu Entzündungsherden, während der Thymusentwicklung sowie unter homeostatischen Bedingungen zur Haut induziert (20, 37). Wie bereits im Paper der AG Schilbach beschrieben, wurde CXCR4 (SDF-1R) auf *ex vivo* kultivierten $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklonen auch hier auf einem niedrigen Niveau nachgewiesen (Abb. 3.19), während bei einem der untersuchten Klone (VS K1-8, rot) eine erhöhte Anzahl von CXCR4-positiven Zellen erkennbar ist (Abb. 3.19 und (20)).

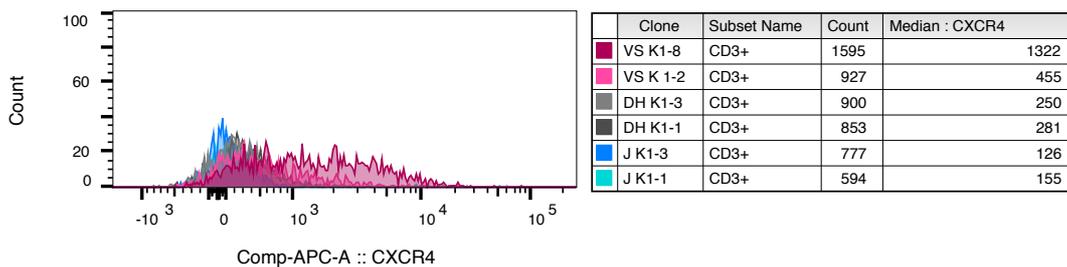


Abbildung 3.19.: CXCR4 auf sechs $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klonen. Histogramme der CXCR4-Signale von *ex vivo* kultivierten $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Progenitoren über Durchflusszytometrie (n=6).

In FACS-Analysen ließen sich auf $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klonen weder die T-Zell-Aktivierungsmarker CD27 und CD28 nachweisen, noch produzierten sie das pro-inflammatorische Zytokin IL17A und das inhibitorische CTLA4. Anstelle dessen trugen Klone jedoch inhibitorische Rezeptoren PD-1 und in heterogene Mengen CD46, einen negativen Regulator des Komplementsystems der direkt und indirekt die Aktivierung (IFN- γ -Sekretion)

3.1. Molekularbiologische Charakterisierung der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen

von $\gamma\delta$ T-Zellen inhibiert (Abb. 3.20 und Abb. 3.21, (108, 109)). Nach Larbi und Kollegen, können $CD27^+CD28^+PD-1^{+/-}$ T-Zellen TEMRA-Zellen aus dem Effektor-Gedächtnis-Kompartiment zugeordnet werden (gereviewed in (109)).

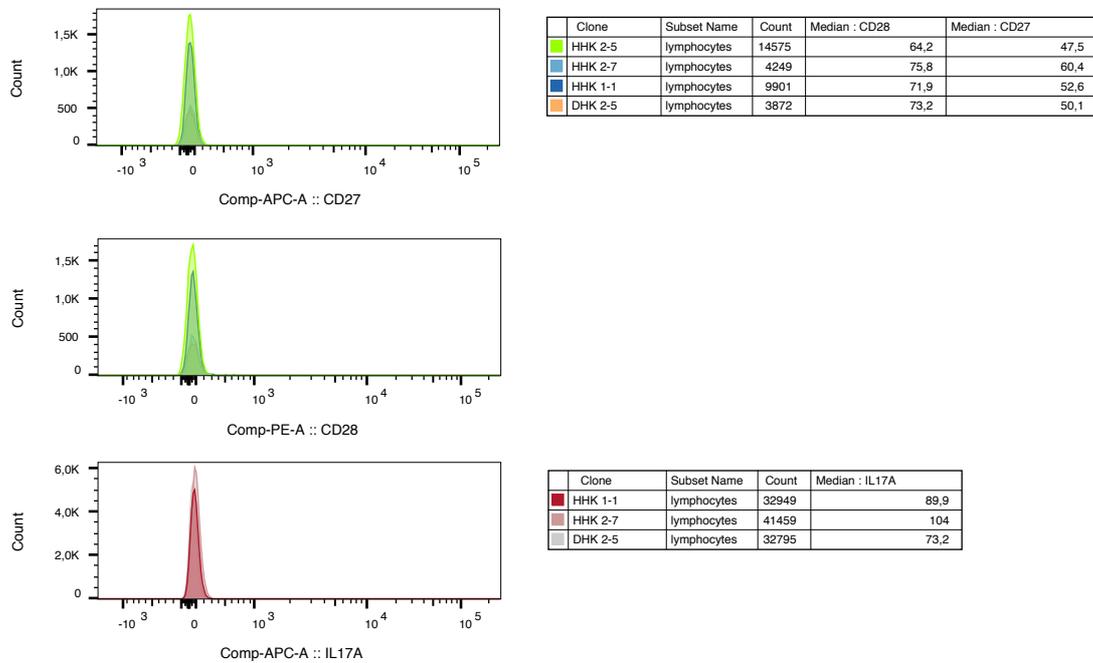


Abbildung 3.20.: CD27, CD28 und IL17A auf $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klonen. Histogramme der CD27 und CD28 Oberflächenproteine sowie des intrazellulären IL17A repräsentativer *ex vivo* kultivierter $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone.

3. ERGEBNISSE

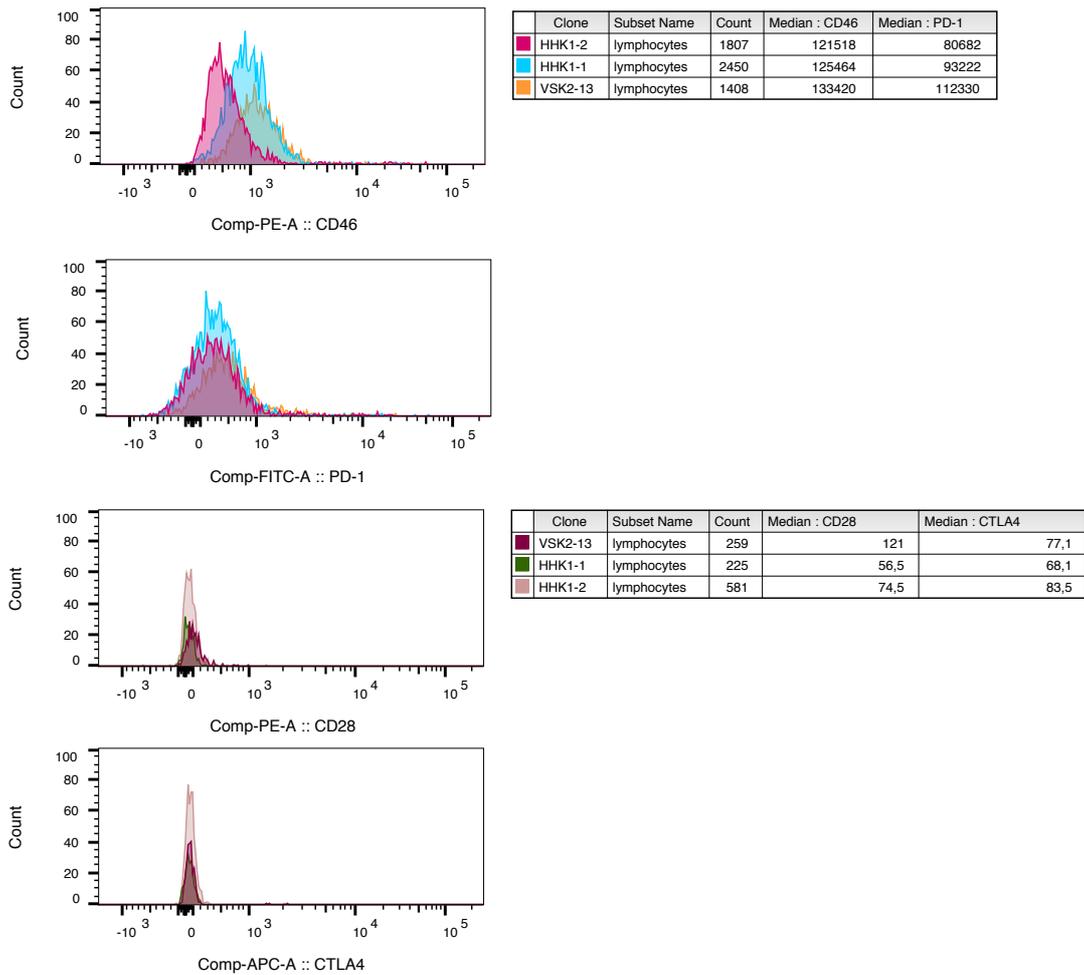


Abbildung 3.21.: FACS-Analyse von CD46, PD-1, CD28 und CTLA-4 auf Vδ1⁺CD4⁺T-Zell-Klonen. Histogramme des oberflächengebundenen CD46, PD-1 CD28 und CTLA-4 dreier Vδ1⁺CD4⁺T-Zell-Klone.

3.1.6. MICA-induzierte $V\delta 1^+CD4^+$ -TZR-Stimulation

Da Groh und Kollegen in (23) MICA/B-Moleküle als Liganden des $V\delta 1^+$ -TZR berichteten interessierte uns, ob MICA/B TZR-Signaling in $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klonen auslösen und eine Transdifferenzierung induzieren bzw. beeinflussen können. Interessanterweise wurde die MICA/B-TZR-Interaktion mit charakteristisch niedriger Bindungsstärke und als lang anhaltend berichtet (23).

3.1.6.1. MICA/B-Sequenzierung und *in silico*-Interaktionsstudien

Die Ähnlichkeit von MICA/B zu MHC-Molekülen spiegelt sich auch in ihrer polymorphen Natur wieder, die die Individualität der Moleküle gewährleistet (siehe IPD/IMGT-HLA-Datenbank, (110, 111)). Zur gezielten Untersuchung von MICA/B- $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klon-Interaktionen im allogenen und allogenen Setting wurden die individuellen Sequenzen von MICA und MICB (von David Heister) analysiert und deren Bindungsstärke mit den TZR $V\delta 1$ -CDR3-Sequenzen von stabil kultivierbaren $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellklonen verschiedener Spender *in silico* verglichen (59).

Biophysikalisch entspricht die hohe Spezifität eines Liganden zu seinem Rezeptor (autologes Setting) einer, im Vergleich zur Interaktion mit einem „sub- oder supraoptimalen“ (allogenen) Liganden, deutlich anderen Bindungsstärke, die einer erhöhten Affinität der Moleküle gleich kommt. Unter Verwendung von *in silico*-Modellen konnten wir keine Unterschiede der Bindungsstärke zu verschiedenen TZR $V\delta 1$ -CDR3-Regionen feststellen (s. (59)). Die *in silico*-Analyse der nicht-glykosylierten Moleküle im autologen vs. allogenen Setting lässt somit keine spenderindividuelle MICA/B- $V\delta 1^+CD4^+$ -TZR-Interaktion vermuten.

3.1.6.2. Einfluss von MICA/B auf das TZR-Signal

Die Bindung von abgespalteten, löslichen (gsheddeden) MIC-Molekülen wirkt im Gegensatz zu oberflächengebundenen MIC inhibitorisch auf den NKG2D-vermittelten Signalweg (31). Wir verwendeten deshalb eine Laser-Scanning-Mikroskopie-Technik (genannt MAAACS), um die TZR-Signale ausgewählter $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klone detektieren zu können, die: 1. löslichen MICA/B-Molekülen in Überständen, 2. oberflächengebundenen MICA/B-Molekülen (Coaten der Plattenoberfläche mit Überständen) oder 3. zellgebundenen MICA/B-Molekülen auf Monozyten ausgesetzt worden waren (s. (58)).

Die MAAACS-Analysen der TZR-Signalinduktion zeigten, dass die intensivsten Signale in den Negativkontrollen (nur Medium, ungecoatete Oberflächen) detektiert wurden, was widerspiegeln könnte, dass die Integrin-vermittelte TZR-Bypass-Stimulation eine stärkere Aktivierung der $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zellen induzierte als die Exposition mit dem löslichen und oberflächengebundenen autologen/allogenen MICA/B-Molekülen, oder, dass die Komponenten des PBMC-Sekretoms sogar $V\delta 1^+CD4^+$ -TZR-Signale inhibitiert haben könnten (58).

3. ERGEBNISSE

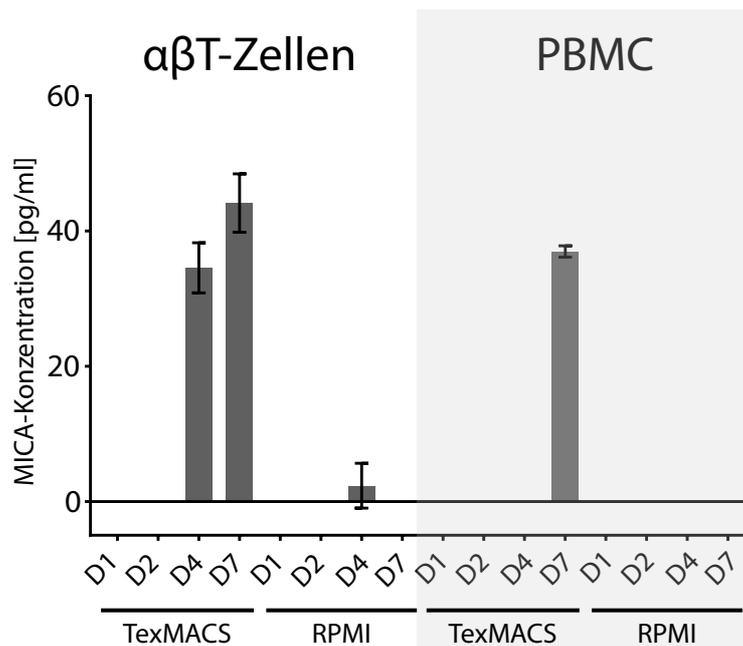


Abbildung 3.22.: MICA-Konzentration in Zellkulturüberständen von ruhenden $\alpha\beta$ T-Zellen und PBMCs in TexMACS und RPMI. MICA-Konzentration in Zellkulturüberständen von ruhenden $\alpha\beta$ T-Zellen und PBMCs bei einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden an Tag 1/2/4/7 in Duplikaten bestimmt ($n=2$, via ELISA).

Um den Einfluss unterschiedlicher Medien auf das Shedding von MICA durch $\alpha\beta$ T-Zellen oder PBMCs zu untersuchen, wurden von ihnen konditionierte Medien mittels ELISA auf gesheddetes MICA hin analysiert. Trotz der Tatsache, dass die von uns detektierten MICA-Konzentrationen an der unteren Nachweisgrenze liegen, schien eine Kultur in TexMACS mehr MICA-Shedding ins Medium zu ermöglichen, wobei $\alpha\beta$ T-Zellen ein höheres MICA-Shedding-Potenzial als PBMCs verzeichneten (siehe Abb. 3.22). Die höchste Konzentration an abgespaltenem MICA wurde in der in TexMACS-Medium kultivierten $\alpha\beta$ T-Zell-Probe an Tag 7 nachgewiesen ($c = 44,13$ pg/ml, $SD = 4,314$ pg/ml; Tag 4: $c = 34,56$ pg/ml, $SD = 3,70$ pg/ml), während in RPMI am gleichen Tag kein Shedding nachweisbar war und der entsprechende Überstand von PBMCs 36,97 pg/ml enthielt ($SD = 0,84$ pg/ml). In RPMI wurde nur an Tag 4 eine sehr geringe MICA-Konzentration in der von $\alpha\beta$ T-Zellen stammenden Probe nachgewiesen ($c = 2,35$ pg/ml, $SD = 3,32$ pg/ml).

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

In Abb. 3.23 wird ein genereller Überblick über den experimentellen Aufbau der folgenden Transdifferenzierungsexperimente gegeben. Zusätzlich werden in Abb. 3.24 exemplarisch die Abbildungen der Analysen der Ansätze sowie deren Interpretation erläutert. Aufgrund der mehrdimensionalen Natur von FACS-Messungen und der hohen Anzahl von Proben und Zeitpunkten ermöglichen tSNE-Analysen und Heatmap-Plots eine semi-quantitative, grafische Darstellung der experimentellen Ergebnisse.

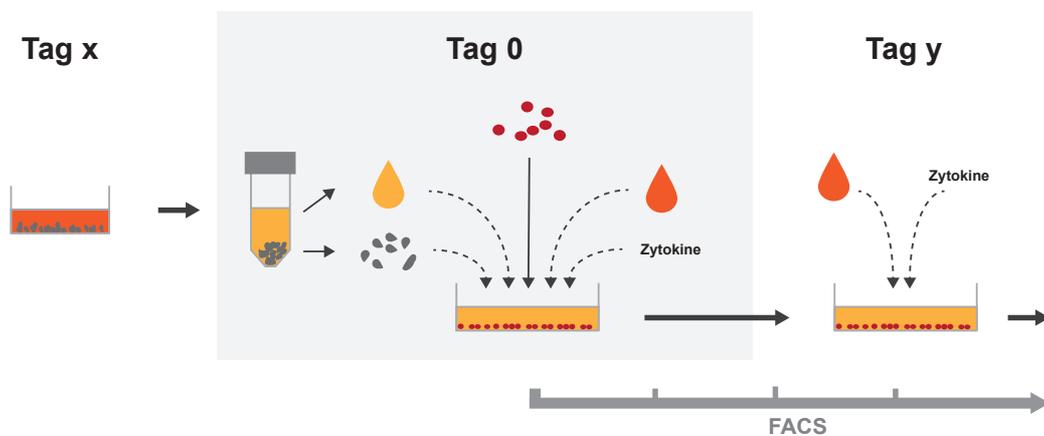


Abbildung 3.23.: Allgemeiner Überblick über den Aufbau der Transdifferenzierungsexperimente. Eine Zellprobe (in grau dargestellt) wurde für x Tage in Medium kultiviert, um konditioniertes Zellkulturmedium (gelb dargestellt) und kultivierte Zellen als Feeder-Zellen für das Experiment zu erhalten. An Tag 0 wurden diese Feeder-Zellen mit 80 Gy bestrahlt, wenn nicht anders angegeben. Außerdem wurde eine Fraktion von $V\delta 1^+CD4^+$ Zellen (oder eine Probe wie z. B. pan $V\delta 1^+$ T-Zellen, hier rote Punkte) gezählt und anschließend in eine Vertiefung mit einer oder mehreren der folgenden Komponenten gegeben: konditioniertes Zellkulturmedium, Feeder-Zellen, frisches Zellkulturmedium (roter Tropfen) und Zytokine (IL-2 und IL-7 waren immer vorhanden, andere Zytokine im Zusammenhang mit akuter/steriler Entzündung wurden wie in der detaillierten Übersicht über den Aufbau jedes einzelnen Experiments angegeben hinzugefügt). Die Proben wurden kultiviert und mittels FACS-Messungen auf Transdifferenzierungsintermediate ($C/V\delta 1^+C\beta^+$) über die Zeit gemonitort. Wo angegeben, wurden die Proben mit frischem Medium und Zytokinen versorgt, um die Proliferation der T-Zellen zu fördern/erlauben.

3. ERGEBNISSE

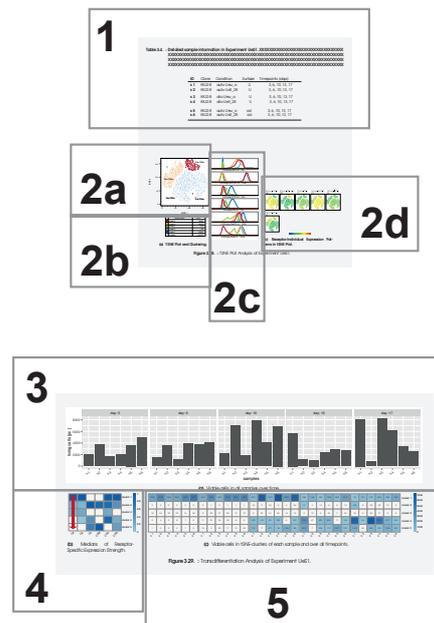


Abbildung 3.24.: Allgemeine Übersicht über die Analyseplots der Transdifferenzierungsexperimente.

1. Detaillierte Probenübersicht – In dieser Tabelle sind die ID jeder Probe, sowie der untersuchte Zelltyp/Klon, die probenspezifischen Kulturbedingungen (wie z. B. Kulturmedium), die Oberfläche der Zellkulturgefäße und die Zeitpunkte der FACS-Messungen zusammengefasst.

2a. tSNE-Plot mit Clustern – Dieser tSNE-Plot ist eine 2D-Darstellung aller Ereignisse (hier lebensfähige Zellen) über alle Zeitpunkte des Experiments, mit Clustering nach Oberflächenrezeptorähnlichkeit. Als Marker wurden CD3, CD4, CD8, C δ /V δ 1 (Cd/Vd1), C β (Cb) und C γ (Cg) gewählt. Generell wurde die Bildung von fünf Clustern forciert, da sich diese Anzahl als optimaler Kompromiss zwischen Komplexität und Übersichtlichkeit erwies. Jedes Cluster ist farbcodiert, wie in der Legende dargestellt (siehe **2b**). Für eine allgemeine Übersicht wurden die großen Cluster nach dominant exprimierten/downregulierten Rezeptormolekülen benannt.

2c. Markerspezifische Histogramme der tSNE-Cluster – Um die spezifische Targetexpression jedes tSNE-Clusters zu zeigen, wird jedes Cluster (siehe Farbcode) in einem rezeptorspezifischen Histogramm dargestellt.

2d. Markerspezifisch farbkodierte tSNE-Plots - Eine alternative Darstellung der clusterspezifischen Target-Signale ist eine rezeptorspezifische tSNE-Plot-Färbung entsprechend der Signalstärke der einzelnen Targets. Hier wurde die Signalstärke im Bereich von minimal (blau) über niedrig (grün) bis maximal (gelb bis rot) eingefärbt.

3. Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit – Ausgehend von der gleichen anfänglichen Zellzahl in jeder Vertiefung (zum Zeitpunkt T0) kann der Einfluss der jeweiligen Probenbedingungen auf Proliferation und Überleben aus der Anzahl der lebensfähigen Zellen im Laufe der Zeit abgeleitet werden.

4. Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmediane – Um eine Charakterisierung jedes Clusters nach seinem individuellen Target-Signalprofil zu ermöglichen, wurden die Medianwerte (FU) der Signale jedes Rezeptors auf das maximale rezeptorspezifische Signal normiert und in einer Heatmap dargestellt. Die Intensität entspricht dabei der Signalstärke (weiß - keine Expression bis tiefblau - hohe Expression).

5. Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern – Diese Heatmap zeigt viablen Zellen einer Probe (weiß - niedrige Zellzahlen, bis blau - hohe Zellzahlen) über alle Zeitpunkte (in Tagen wie in 3. dargestellt). So kann der Anteil der lebenden Zellen innerhalb jedes Clusters zu jedem Zeitpunkt abgelesen werden. Aufgrund der Anordnung der Cluster basierend auf der C/V δ 1-Signalstärke (Cluster 1-5: höchstes bis niedrigstes C/V δ 1-Signal, siehe roter Pfeil im Text) würde der Transdifferenzierungsprozess in diesem Diagramm durch eine Verschiebung von links oben (Cluster 1 + früher Zeitpunkt) nach rechts unten (Cluster 5 + späterer Zeitpunkt) dargestellt, wie in diesem Beispiel gezeigt.

3.2.1. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS1

Wie oben beschrieben (siehe Abb. 1.2) sind Zellen und insbesondere auch T-Zellen sensibel für ihre Mikroumgebung. Ihr Verhalten (z. B. Sekretom, Adhäsion, Metabolismus) kann durch verschiedene Stimuli wie z. B. zellgebundene Liganden oder lösliche Moleküle beeinflusst werden. Immunzellen sezernieren *in vitro* in Abhängigkeit der Kulturbedingungen verschiedene lösliche Faktoren wie z. B. Zytokine, gescheddete Oberflächenmoleküle (MICA/B) und Metaboliten (Laktat). Um ein besseres Verständnis des Einflusses von durch $\alpha\beta$ T-Zellen konditioniertem TexMACS-Zellkulturmedium auf die Induktion der $V\delta 1^+$ -Transdifferenzierung zu erhalten, wurde eine erste Untersuchung mit Zellkulturüberständen von ruhenden oder α CD3/CD28-stimulierten autologen und allogenen $\alpha\beta$ T-Zellen in TexMACS durchgeführt. Nach einer Konditionierungsperiode von 6 (allogen) und 7 Tagen (autolog) bei einer anfänglichen Dichte von 10^6 $\alpha\beta$ T-Zellen/ml wurden die Überstände von der Oberfläche der Zellkulturplatten abgenommen, wobei ein direkter Kontakt mit der Zellschicht am Boden der Wells vermieden wurde. Zusätzlich wurden die Überstände einmal bei $500 \times g$ für 10 min zentrifugiert, wonach die Überstände erneut ohne Kontakt zum Pellet abgenommen wurden, um sicher zu stellen dass die so generierten Überstände komplett frei von $\alpha\beta$ T-Zellen und α CD3/CD28-Beads waren. Der Einfluss der Lair-1-vermittelten Inhibition/Dämpfung des TZR-Signalings wurde auf kollagenbeschichteten 96-Well-Platten untersucht. Nach den ersten 10 Tagen des Experiments wurde jedes Well mit $100 \mu\text{l}$ TexMACS mit IL-2 ($c_{\text{end}}=200$ units/ml) und IL-7 ($c_{\text{end}}=10$ ng/ml) supplementiert, um die durch Transdifferenzierung aus dem $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klon entstandenen $\alpha\beta$ T-Zellen zu unterstützen. An Tag 17 wurden $100 \mu\text{l}$ TexMACS pro Vertiefung mit IL-2 ($c_{\text{end}}=200$ units/ml), IL-7 ($c_{\text{end}}=10$ ng/ml) und PHA ($c_{\text{end}}=0,25$ ng/ml) hinzugefügt, um die Proliferation der transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen zu ermöglichen.

Tabelle 3.4.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS1. Zellkulturüberstände wurden von $\alpha\beta$ T-Zellen generiert, welche für 6/7 Tage (allo/auto) in TexMACS-Zellkulturmedium ohne (w_o) oder mit (3_28) α CD3/CD28-Stimulation kultiviert worden waren. Alle Wells wurden an Tag 0 mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt an Tag 0 ca. $1,18 \cdot 10^5$ Klonzellen. Auto - autolog, allo - allogen; Ue - $100 \mu\text{l}$ konditionierte Zellkulturüberstände pro Well; U - U-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, col - Kollagen-beschichtete F-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen $200 \mu\text{l}$ /Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 1	KKJ2-8	auto Uew_o	U	3, 6, 10, 13, 17
s 2	KKJ2-8	auto Ue3_28	U	3, 6, 10, 13, 17
s 3	KKJ2-8	allo Uew_o	U	3, 6, 10, 13, 17
s 4	KKJ2-8	allo Ue3_28	U	3, 6, 10, 13, 17
s 5	KKJ2-8	auto Uew_o	col	3, 6, 10, 13, 17
s 6	KKJ2-8	auto Ue3_28	col	3, 6, 10, 13, 17

Im tSNE-Plot des Experiments UeS1 lassen sich drei große Cluster erkennen (Abb. 3.25). Zusätzlich ist allgemein eine Verschiebung von links oben (Cluster 1) nach rechts unten

3. ERGEBNISSE

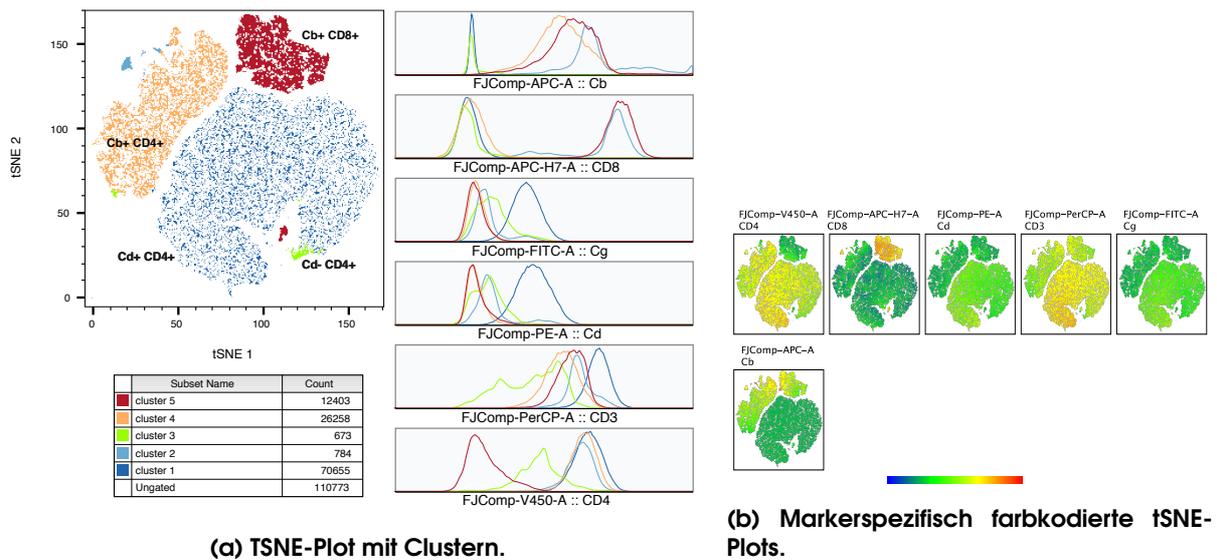
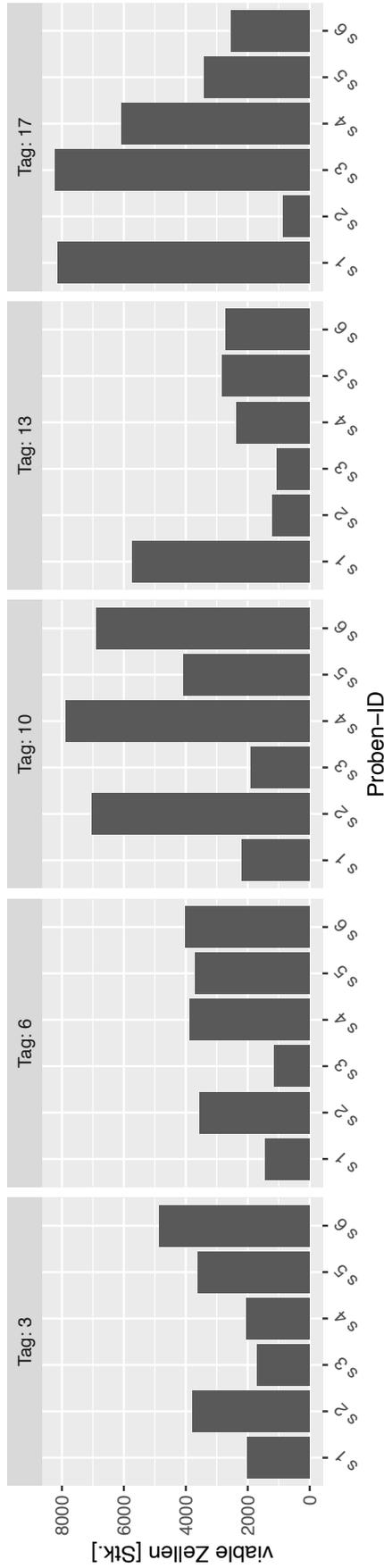


Abbildung 3.25.: TSNE-Analyse des Experiments UeS1.

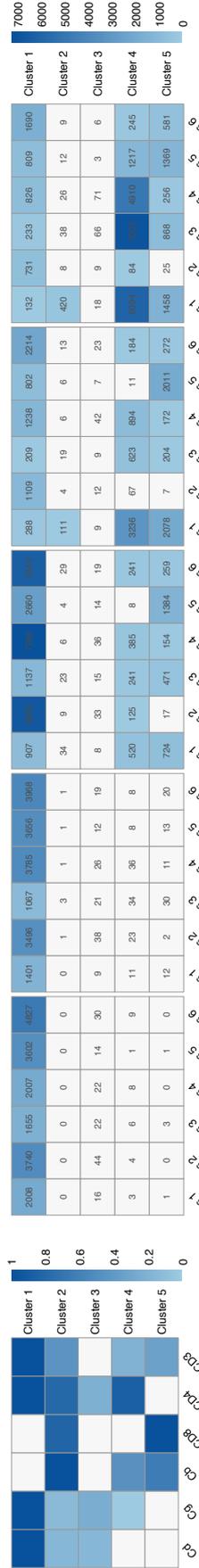
in der Transdifferenzierungs-Heatmap 3.26c zu sehen, was darauf hindeutet, dass die eingesetzten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone in allen Proben transdifferenzierten. Dabei entstanden $C\beta^+CD4^+$ und $C\beta^+CD8^+$ T-Zellen (Cluster 4 + Cluster 5). Die Transdifferenzierung fand größtenteils zwischen Tag 6 und 10 des Experiments statt, wobei die Proben s1/3/5, die mit den Überständen unstimulierter $\alpha\beta$ T-Zellen versetzt waren, die größten Anteile $C\beta^+$ T-Zellen aufweisen: an Tag 10 56,7/37,7/34,2%, an Tag 13 92,9/77,7/71,3% und an Tag 17 93,0/95,9/75,8% des Ausgangswertes an Tag 0. Die Proben mit Überständen stimulierter $\alpha\beta$ T-Zellen (s2/4/6) weisen konstant weniger $C\beta^+$ T-Zellen auf als ihre Korrelate aus „unstimulierten“ Bedingungen (s1/3/5). Die größten Unterschiede verzeichnet hierbei das autologe Setting, wobei in Probe s1 an den Tagen 10/13/17 28,0/15,0 und 7,3-fach mehr $C\beta^+$ T-Zellen in Vergleich zu Probe s2 (stimuliert) nachgewiesen wurden. In Proben s1/3/5 (Uew_o) dominierten dabei an Tag 17 $CD4^+$ (Cluster 4) gegenüber $CD8^+$ -Zellen (Cluster 5 Abb. 3.26c). Auf Kollagen (vgl. s1 & s2 zu s5 & s6) kehrte sich diese Dominanz zugunsten des $CD8$ -Co-Rezeptors um (Cluster 5 in Abb. 3.26c). Die meisten $C\beta^+$ T-Zellen wurden in Probe s3 an Tag 17 nachgewiesen (7890 Zellen). Gleichzeitig weisen die unterschiedlichen Zellzahlen der einzelnen Proben auf unterschiedliche Proliferationsraten unter den unterschiedlichen experimentellen Settings hin. Die PAnsätze mit Überständen von $\alpha CD3/CD28$ -stimulierten $\alpha\beta$ T-Zellen (s2/4/6) erhöhten in den ersten 10 Tagen die Viabilität der Progenitoren (siehe Abb. 3.26a und Cluster 1 in Abb. 3.26c), die Medium/Zytokin-Gabe an Tag 10 (s. oben) bewirkte jedoch die Umkehr, da sie sich vor allem auf die Viabilität in den Proben s1/3/5 positiv auswirkte.

Zusammenfassend lässt sich für das Experiment UeS1 sagen, dass die Proben s1 und s5, mit dem Überstand ruhender autologer $\alpha\beta$ T-Zellen auf F-bottom-Wells, über die Tage 10 und 13 die höchste Anzahl transdifferenzierter Zellen aufweisen, wobei an Tag 17 das allogene Setting (s3) die meisten $C\beta^+$ T-Zellen aufweist.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorgnexpressionsmediane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.26.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues1.

3. ERGEBNISSE

Bei diesem Vorversuch ist hervorzuheben, dass für jede Probe nur ein Well angesetzt worden war, d. h. die Zellen wurden zu jedem Zeitpunkt an dem eine FACS-Messung durchgeführt wurde durch Mischen mechanischen Kräften ausgesetzt. Um einen Vergleich der Proben untereinander zu ermöglichen, wurde in jedes Well die gleiche Ausgangszellzahl plattiert und pro FACS-Messung das gleiche Probenvolumen verwendet.

Zur Untersuchung, ob unterschiedliche Mengen von $\alpha\beta$ T-Zell-abgeleiteten, löslichen MICA-Molekülen in den Überständen von stimulierten oder ruhenden $\alpha\beta$ T-Zellen vorliegen, wurde ein kryokonserviertes Aliquot beider autologer Überstände des Experiments in UeS1 in Duplikaten mittels ELISA-Immunoassay nach MICA quantifiziert. Im Vergleich zum Überstand ruhender $\alpha\beta$ T-Zellen (nicht detektierbare geringe Menge an löslichem MICA) lag die MICA-Konzentration in Überständen von α CD3/CD28-stimulierten $\alpha\beta$ T-Zellen mit 96,65 pg/ml (SD = 6,42 pg/ml, n= 2) im nachweisbaren Bereich, was auf eine stimulationsinduzierte Steigerung der MICA-Shedding-Rate hinweist (Abb. 3.27).

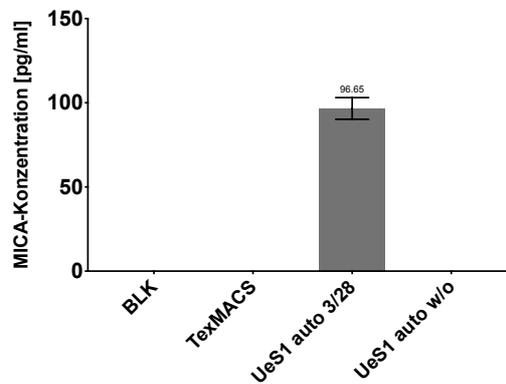


Abbildung 3.27.: MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS1. Die MICA-Konzentration autologer Zellkulturüberstände von CD3/28-stimulierten oder unstimulierten $\alpha\beta$ T-Zellen, welche TexMACS-Medium über 6 Tage vorkonditionierten, wurde in Duplikaten im ELISA ermittelt. BLK - Negativkontrolle, TexMACS - Mediumkontrolle.

3.2.2. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS2

Weil im ersten Transdifferenzierungsexperiment UeS1 vorkonditionierte Zellkulturüberstände von PBMCs die Induktion der $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Transdifferenzierung ermöglichten, wurde im nachfolgenden Experiment, genannt UeS2, der Umfang der Proben erweitert. So sollte mehr Einblick in den Einfluss allogener ruhender (w_o) und aktivierter ($\alpha CD3/38$ -Stimulation) nicht-adhärenter PBMCs als bestrahlte Feederzellen und ihrer Zellkulturüberstände (Präkonditionierung bei einer Dichte von 10^6 Feederzellen/ml) gewonnen werden. Zusätzlich wurde in manchen Ansätzen das TZR-Signaling durch Lair-1-Interaktion mit kollagenbeschichteten Zellkulturplatten unterdrückt. Die Beads ($\alpha CD3/CD28$) wurden durch zweimaligen Magneteinsatz und einen Zentrifugationsschritt (bei $500 \times g$, 10 min, RT) vollständig aus den präkonditionierten Zellkulturmedien entfernt. An Tag 3 des Experiments wurde jede Vertiefung vorsichtig durchgemischt, da die Ausübung mechanischer Kräfte möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Transdifferenzierung haben könnte (s. Integrinsignalling und TZR-Stimulation). Nach 10 Tagen wurde jede Vertiefung mit $100 \mu l$ TexMACS, IL-2 ($c_{end}=200$ units/ml) und IL-7 ($c_{end}=10$ ng/ml) supplementiert.

Tabelle 3.5.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS2. Zellkulturüberstände wurden von autologen non-adhärenenten PBMCs in TexMACS-Medium nach 4-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) $\alpha CD3/CD28$ -Stimulation gewonnen. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $1 \cdot 10^5$ Klonzellen. M - $100 \mu l$ TexMACS-Medium pro Well Ue - $100 \mu l$ Zellkulturüberstand pro Well, Z - $3,6 \cdot 10^5$ bestrahlte Feederzellen pro Well; NK - F-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, col - Kollagen-beschichtete F-bottom 96-Well-Zellkulturplatte; finales Probenvolumen von $200 \mu l$ pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	KKJ2-8	M	NK	0, 6, 10, 13, 17
s 1	KKJ2-8	Uew_o	NK	6, 10, 13, 17
s 2	KKJ2-8	Ue3_28	NK	6, 10, 13, 17
s 3	KKJ2-8	Zw_o	NK	6, 10, 13, 17
s 4	KKJ2-8	Z3_28	NK	6, 10, 13, 17
s 5	KKJ2-8	M	col	6, 10, 13, 17
s 6	KKJ2-8	Uew_o	col	6, 10, 13, 17
s 7	KKJ2-8	Ue3_28	col	6, 10, 13, 17
s 8	KKJ2-8	Zw_o	col	6, 10, 13, 17
s 9	KKJ2-8	Z3_28	col	6, 10, 13, 17

In diesem Experiment fand eine Transdifferenzierung statt, wie an den drei großen Clustern im tSNE-Plot in Abb. 3.28a zu erkennen ist. Gleichzeitig ist die Schwerpunktverschiebung einiger Proben von Cluster 2 ($V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklone) zu Cluster 3 ($C\beta^+CD8^+$) und Cluster 4 ($C\beta^+CD4^+$) über die Zeit (Abb. 3.29c) sichtbar. An Tag 10 und später enthielten sowohl die Proben s1 & s2 (nur Überstände), als auch s6 & s7 (Überstand und kollagenbeschichtete Oberfläche) viele viable Zellen und zeigten eine Transdifferenzierung mit einer Dominanz von $CD4^+$ -Zellen (Abb. 3.29a 3.29c). Durch Kollagenbeschichtung verschob sich das Co-Rezeptor-Verhältnis der nicht beschichteten Wells nicht wie

3. ERGEBNISSE

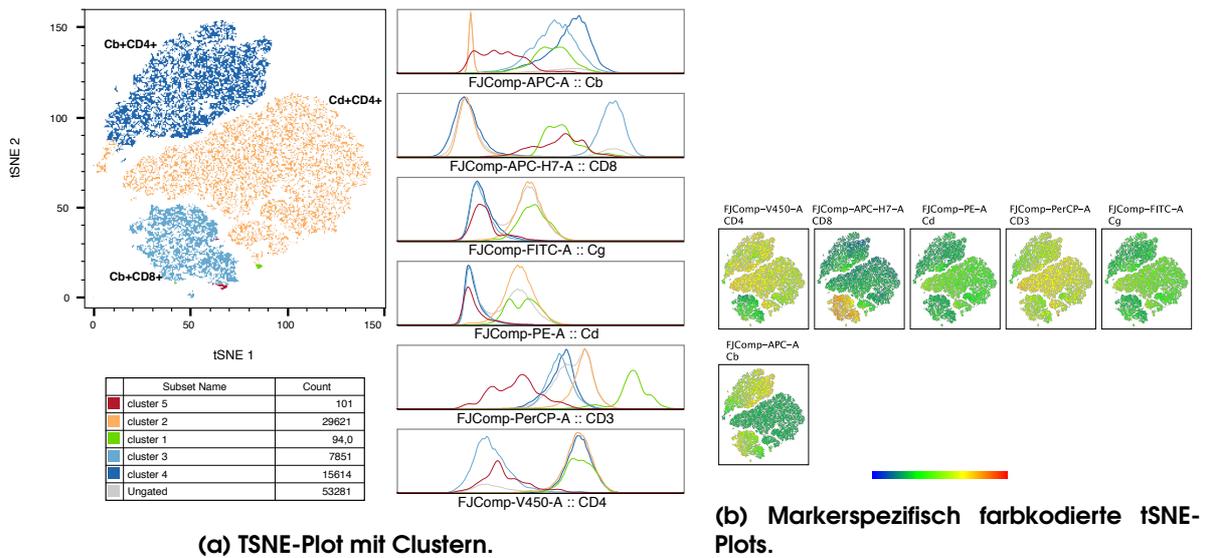
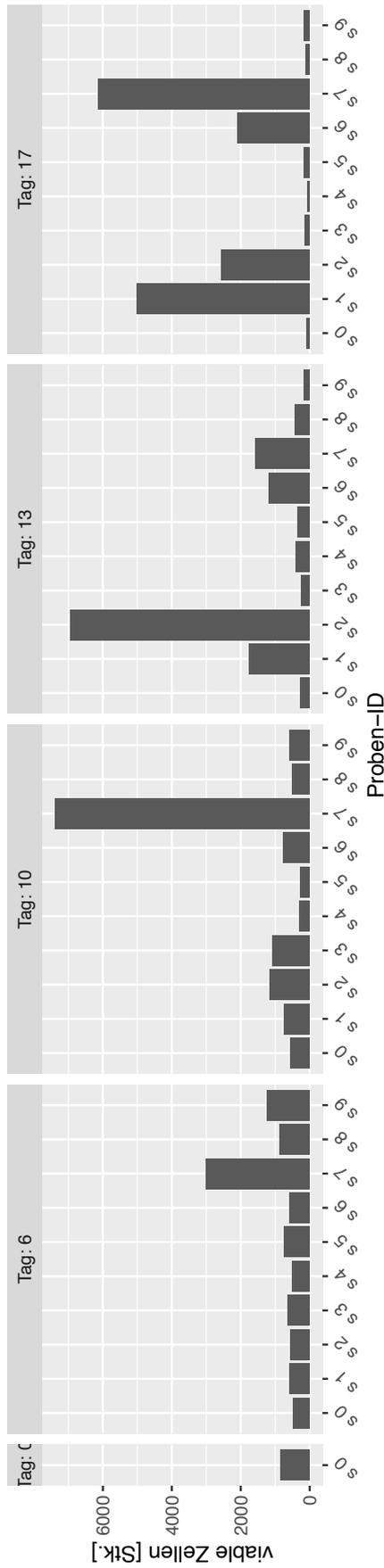


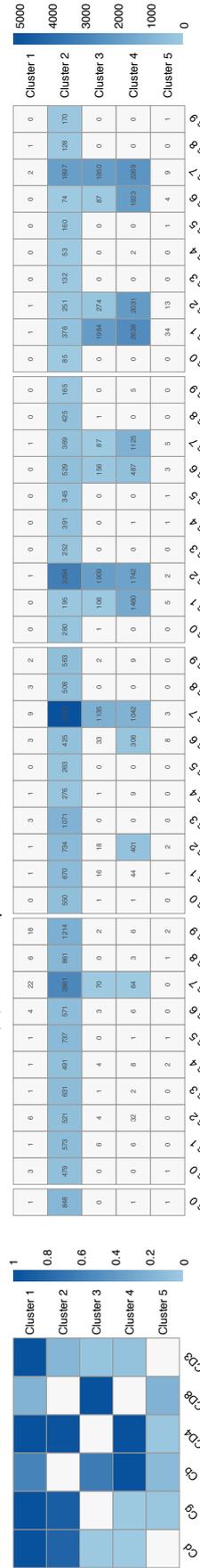
Abbildung 3.28.: TSNE-Analyse des Experiments UeS2.

im Experiment UeS1 gezeigt (siehe Abb. 3.29c). Sowohl die Mock-Proben (s0 und s5 nur Medium) als auch die mit Feederzellen ergänzten Proben (s3/4/8/9) hatten eine konstant niedrige Anzahl viabler Zellen (Abb. 3.29a).

3.2. Transdifferenzierungsexperimente



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-gnalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.29.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS2.

3. ERGEBNISSE

3.2.3. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS3

Basierend auf den Daten früherer Experimente und zur Wiederholung der ersten beiden Experimente wurde Experiment UeS3 zusätzlich mit einem weiteren $V\delta 1^+CD4^+$ -Klon (CK6-121) im autologen Setting durchgeführt. Außerdem wurde die Kombination von Feederzellen mit Zellkulturüberständen sowie der Einfluss der TZRC β -Stimulation zur Induktion der Transdifferenzierung (in Kombination mit löslicher $\alpha CD3/CD28$ -Stimulation mittels 0,5 $\mu g/ml$ OKT3- und 1 $\mu g/ml$ $\alpha CD28$ -Antikörper) getestet. Dazu wurden kryokonservierte nicht-adhärenente PBMCs des ersten Spenders und nicht fraktionierte PBMCs des zweiten Spenders in TexMACS-Medium (Dichte: $6,66 \cdot 10^5$ Zellen/ml) kultiviert. $\alpha CD3/CD28$ -Beads wurden durch zweimaligen Magneteinsatz und einen Zentrifugationsschritt (bei 450 x g, 10 min, RT) vollständig aus den präkonditionierten Zellkulturmedien entfernt.

Tabelle 3.6.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS3. Zellkulturüberstände wurden von non-adhärenenten PBMCs in TexMACS-Medium nach 7-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) $\alpha CD3/CD28$ -Stimulation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $1,18 \cdot 10^5$ Klonzellen. Auto - autolog; M - 100 μl TexMACS-Medium pro Well, Ue - 100 μl konditionierte Zellkulturüberstände pro Well; Z - 10^5 bestrahlte non-adhärenente PBMCs als Feederzellen pro Well, $\alpha C\beta$ - $\alpha TZRC\beta$ -Antikörper, NK - F-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen 200 μl /Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	KKJ2-8	M	NK	6, 10, 13
s 1	KKJ2-8	auto Uew_o	NK	6, 10, 13
s 2	KKJ2-8	auto Ue3_28	NK	6, 10, 13
s 3	KKJ2-8	auto Zw_o	NK	6, 10, 13
s 4	KKJ2-8	auto Z3_28	NK	6, 10, 13
s 5	KKJ2-8	auto Ue+Z3_28	NK	6, 10, 13
s 6	KKJ2-8	auto Ue+Zw_o	NK	6, 10, 13
s 7	KKJ2-8	auto Ue3_28 + $\alpha C\beta$	NK	6, 10, 13
s 8	CK6-121	M	NK	6, 10, 13
s 9	CK6-121	auto Ue3_28	NK	6, 10, 13
s 10	CK6-121	auto Uew_o	NK	6, 10, 13

Da die tSNE-Analyse der Proben von Experiment UeS3, wie in Abb. 3.30 dargestellt, kein Clustering zeigte wurden keine weiteren Analysen durchgeführt. Interessanterweise waren auch in diesem Experiment die meisten viablen Zellen in den Proben mit Überständen nachweisbar. Dabei wirkten sich sowohl die Überstände stimulierter PBMCs (s2/5/7), aber auch die Überstände ruhender PBMCs (s1/s6), positiv auf die Viabilität der Klone aus (Abb. 3.31a). Die Stimulation mit dem $\alpha TZRC\beta$ -Antikörper hatte an Tag 6 und 13 keine Auswirkung auf die Viabilität des Klons, an Tag 10 entsprach die Viabilität der Probe s7 dem 3,9-Fachen der unstimulierten Probe (vgl. s2 und s7). Die Ansätze mit dem zweiten $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klon (CK6-121) enthielten an allen drei Messpunkten ähnlich niedrige Levels viabler Zellen.

In Übereinstimmung mit der geringen MICA-Konzentration, die in den Überständen von stimulierten $\alpha\beta T$ -Zellen in Experiment UeS1 nachgewiesen wurde, gab es nur eine

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

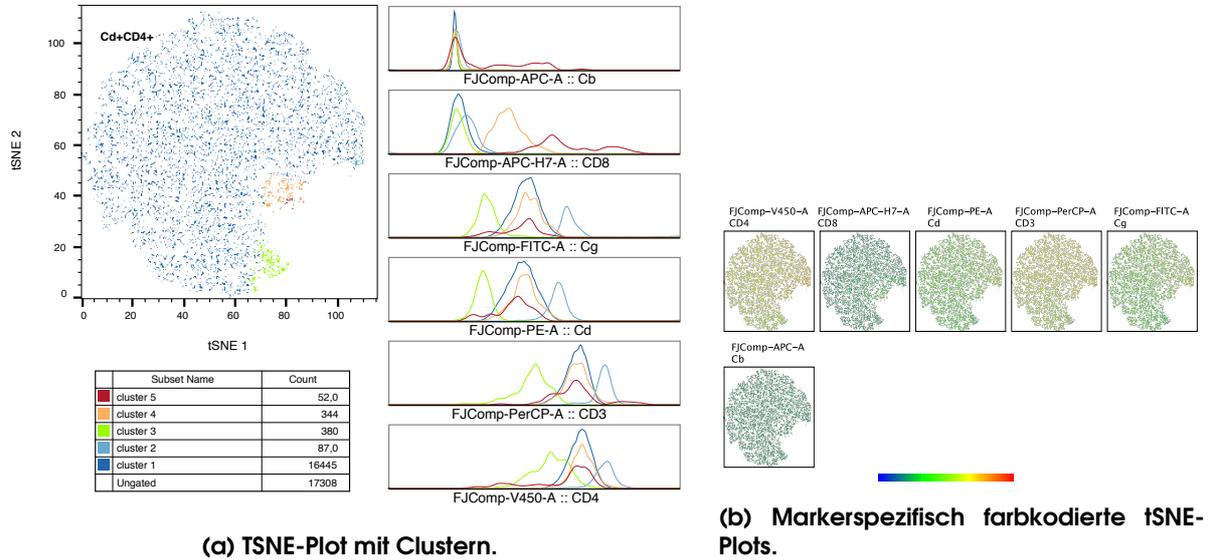


Abbildung 3.30.: TSNE-Analyse des Experiments UeS3.

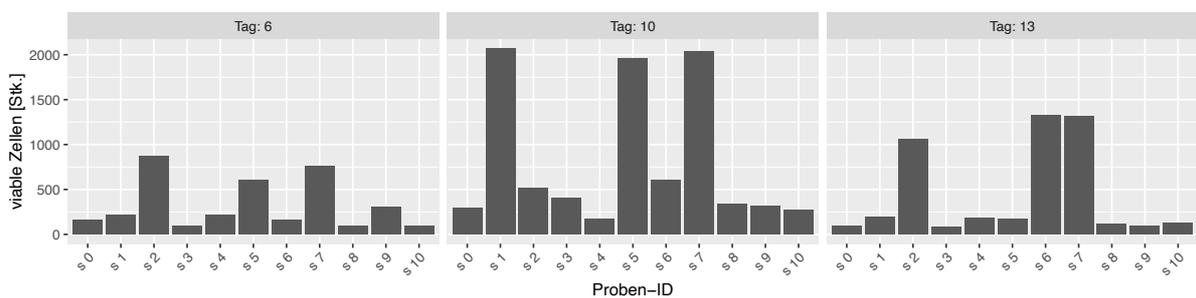


Abbildung 3.31.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS3.

3. ERGEBNISSE

minimale, aber nachweisbare, Menge an freiem MICA im Überstand von α CD3/CD28-stimulierten PBMCs ($c=17,23$ pg/ml, $SD = 24,37$ pg/ml, $n= 2$).

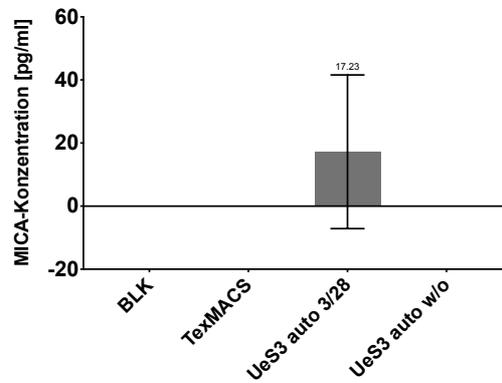


Abbildung 3.32.: MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS3. Die MICA-Konzentration autologer CD3/28-stimulierter oder unstimulierter PBMCs aus Kultur in TexMACS-Medium (7Tage Vorkonditionierung) wurde in Duplikaten mittels ELISA-Immunoassay detektiert. BLK - Negativkontrolle, TexMACS - Mediumkontrolle.

3.2.4. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS4

Es ist nicht bekannt, ob die permanente Stimulation und Induktion einer exponentiellen $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellproliferation das Verhalten der $V\delta 1^+CD4^+$ -Klonzellen in Bezug auf eine forcierte oder blockierte Transdifferenzierung beeinflusst. Daher wurde ein „frischer“ und hoch proliferativer Klon (ca. vier Wochen *in vitro* Zellkultur) im Experiment UeS4 untersucht. Nach einmaliger Entfernung der $\alpha CD3/CD28$ -Stimulationsbeads auf dem Magneten wurden die PBMCs abzentrifugiert (bei 450 xg, 10 min, RT) und bestrahlt, bevor sie in die Wells gegeben wurden. Nach 10 Tagen wurde jedes Well mit 100 μ l TexMACS, IL-2 ($c_{end}=200$ Einheiten /ml) und IL-7 ($c_{end}=10$ ng/ml) supplementiert.

Tabelle 3.7.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS4. Zellkulturüberstände wurden von autologen PBMCs in IL-2 supplementiertem (30 u/ml) TexMACS-Medium nach 5-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) $\alpha CD3/CD28$ -Stimulation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $1,18 \cdot 10^5$ Klonzellen. M - 100 μ l TexMACS-Zellkulturmedium pro Well, Ue - 100 μ l Zellkulturüberstände, Z - bestrahlte Feederzellen ($5 \cdot 10^4$ Zellen/Well = 2:1 Klon:Feederzell-Ratio) in 50 μ l; U - U-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen von 200 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	HHK1-1	M	U	0, 3, 8, 10, 14, 35
s 1	HHK1-1	Uew_o	U	3, 8, 10, 14, 35
s 2	HHK1-1	Ue3_28	U	3, 8, 10, 14, 35
s 3	HHK1-1	Zw_o	U	3, 8, 10, 14, 35
s 4	HHK1-1	Z3_28	U	3, 8, 10, 14, 35
s 5	HHK1-1	(Ue+Z)w_o	U	3, 8, 10, 14, 35
s 6	HHK1-1	(Ue+Z)3_28	U	3, 8, 10, 14, 35

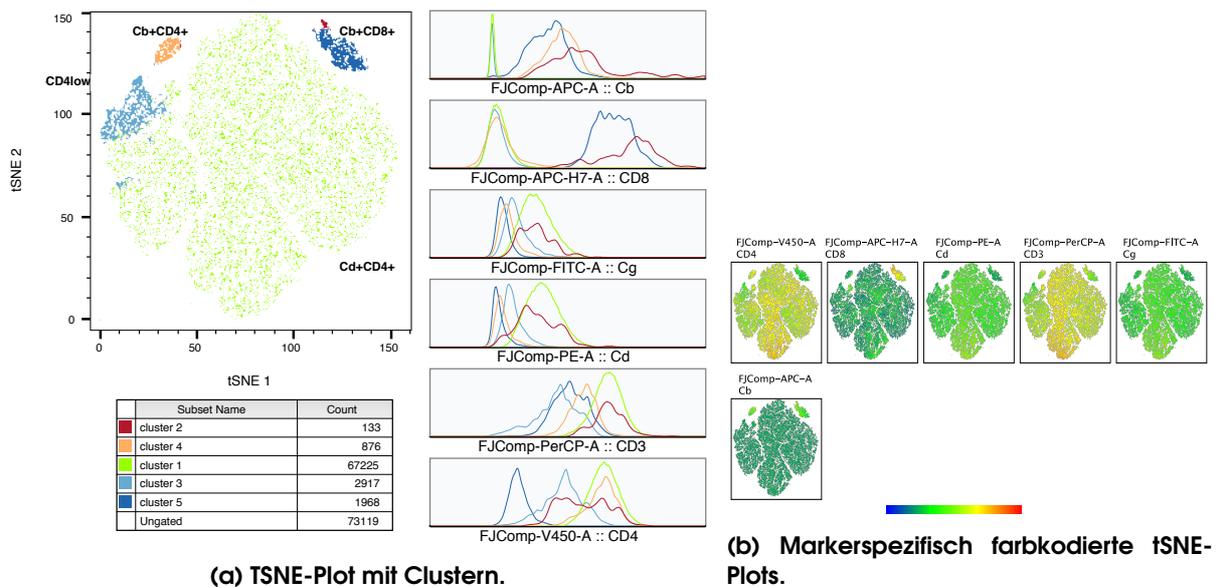
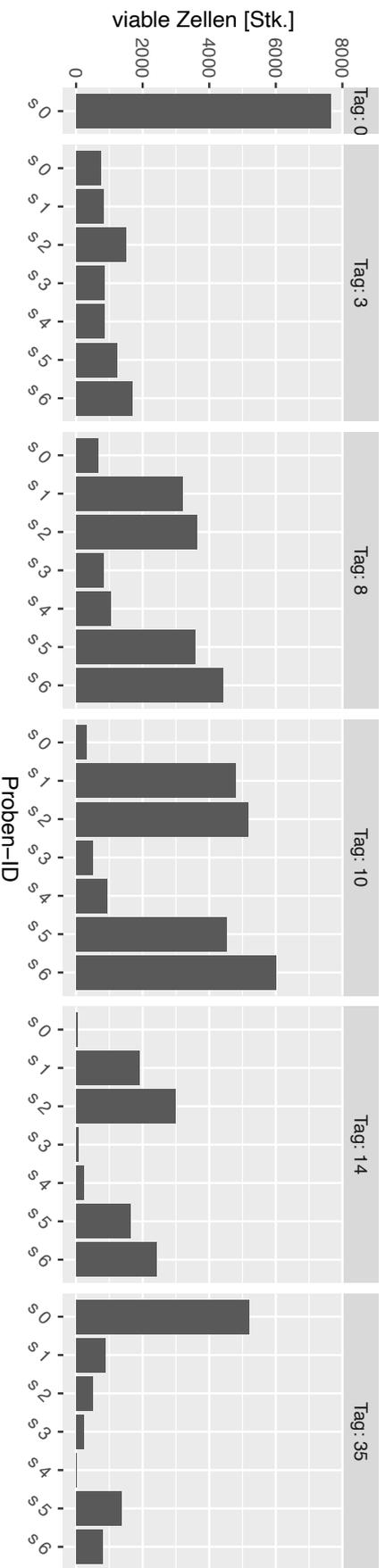
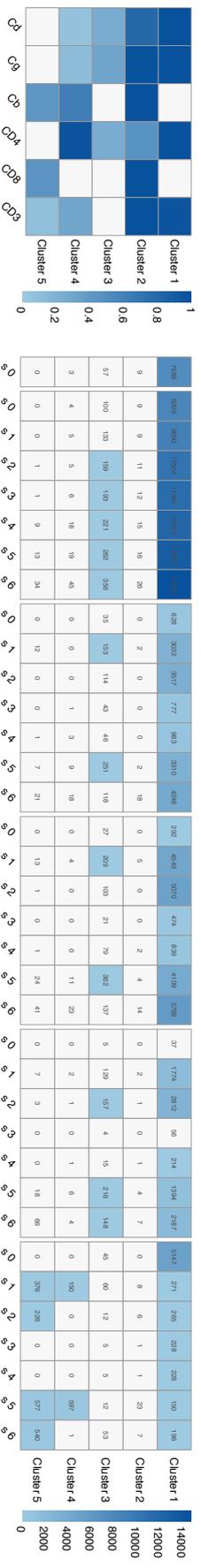


Abbildung 3.33.: TSNE-Analyse des Experiments UeS4.

In diesem Experiment fand die Transdifferenzierung in $C\beta^+CD4^+$ (Cluster 4) und $C\beta^+CD8^+$



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.34.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues4.

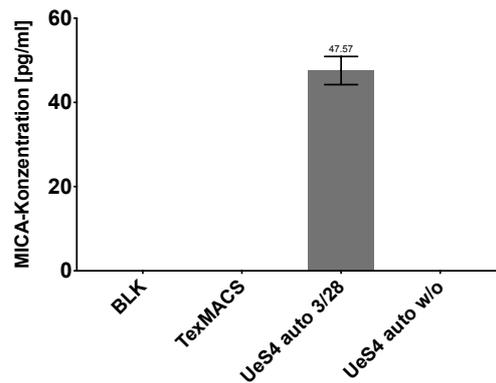


Abbildung 3.35.: MICA-Konzentrationen der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS4. Die MICA-Konzentrationen autologer Zellkulturüberstände von CD3/28-stimulierten oder unstimulierten PBMCs, welche TexMACS-Medium über 5 Tage vorkonditionierten, wurden in Duplikaten über ELISA ermittelt. BLK - Negativkontrolle, TexMACS - Mediumkontrolle.

(Cluster 5) bei einer begrenzten Anzahl von Zellen der Proben, die nur Überstände (s1 & s2) oder Überstände und Feederzellen enthielten (s5 & s6), statt. Allerdings erst zu einem sehr späten Zeitpunkt, nach 35 Tagen (siehe Abb. 3.33 und Abb. 3.34). Die vier o. g. Proben enthielten durchgehend die meisten viablen Zellen, wie in Abb. 3.34a dargestellt, während die Proben s3 und s4 (nur Feederzellen) der Mock-Probe (Medium-only-Kontrolle s0) in Bezug auf die Viabilität und die ausbleibende Transdifferenzierung ähnelten. Gesheddetes MICA war, wie für Experimente UeS1 und UeS3 beschrieben, nur im konditionierten Zellkulturmedium von α CD3/CD28-stimulierten Zellen (hier: PBMCs, $c = 47,57$ pg/ml, $SD = 3,34$ pg/ml, $n=2$) nachweisbar (Abb. 3.35).

3. ERGEBNISSE

3.2.5. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS5

Der Einfluss von IL-2 auf PBMCs während der Vorkonditionierung des Zellkulturmediums wurde durch Kultivierung autologer PBMCs mit 30/90 units/ml IL-2 in TexMACS untersucht. Zusätzlich wurden Überstände von ruhenden und aktivierten allogenen $\alpha\beta$ T-Zellen untersucht. α CD3/28-Stimulationsbeads und Zellen wurden durch einmaligen Magneteinsatz, einen ersten Zentrifugationsschritt bei 450 x g (10 min, RT) und einen zweiten bei 2000 x g (10 min, RT) unter Verwendung einer Mikrospin-Säule (Porengröße von 0,2 μ m) quantitativ aus den präkonditionierten Zellkulturmedien entfernt.

Tabelle 3.8.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS5. Zellkulturüberstände wurden in TexMACS-Medium von autologen PBMCs mit 30/90 units/ml IL-2 über 14 Tage und allogenen $\alpha\beta$ T-Zellen nach 12-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) α CD3/CD28-Stimulation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $1,18 \cdot 10^5$ Klonzellen. M - 100 μ l TexMACS-Medium pro Well, Ue - 200 μ l Zellkulturüberstände pro Well, TUE - Überstände allogener $\alpha\beta$ T-Zellen; 30/90 - 30/90 units/ml IL-2; U - U-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen von 200 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	HHK1-1	Klon-Ue	U	0, 4, 8, 13
s 1	HHK1-1	M	U	4, 8, 13
s 2	HHK1-1	Ue30	U	4, 8, 13
s 3	HHK1-1	Ue90	U	4, 8, 13
s 4	HHK1-1	TUe3_28	U	4, 8, 13
s 5	HHK1-1	TUw_o	U	4, 8, 13
s 6	HHK1-2	Klon-Ue	U	4, 8
s 7	HHK1-2	M	U	4, 8
s 8	HHK1-2	Ue30	U	4, 8
s 9	HHK1-2	Ue90	U	4, 8
s 10	HHK1-2	TUe3_28	U	4, 8
s 11	HHK1-2	TUw_o	U	4, 8

Zur Bestimmung des pH-Wertes der Zellkulturüberstände an Tag 0 wurden Proben aller Überstände mit einem pH-Indikator gemessen. Vier der fünf Proben hatten einen neutralen pH-Wert von ca. 7,7, während nur der Überstand von aktivierten T-Zellen mit einem pH-Wert von 6,5 leicht sauer war. In Experiment UeS5 fand keine Transdifferenzierung statt. Interessanterweise waren jedoch wenige Zellen der Proben s6 und s10 (Klon HHK1-2), obwohl keine $C\beta^+$ -Expression nachweisbar war, $CD8^+$ (Cluster 3 und 4 in Abb. 3.36a) oder $CD3^{low}CD4^+$ an Tag 8 (Probe 10 - Cluster 5). Das Überleben in den Langzeit-vorkonditionierten Zellkulturüberständen war reduziert und vergleichbar mit den Mock-Kontrollproben s1 und s7 (siehe Abb. 3.37a). Im Gegensatz dazu hatten von Klonen abgeleitete Überstände (Proben s0 und s6) sowie solche von stimulierten allogenen $\alpha\beta$ T-Zellen (s4 und s10) einen positiven Effekt auf die Zellviabilität.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

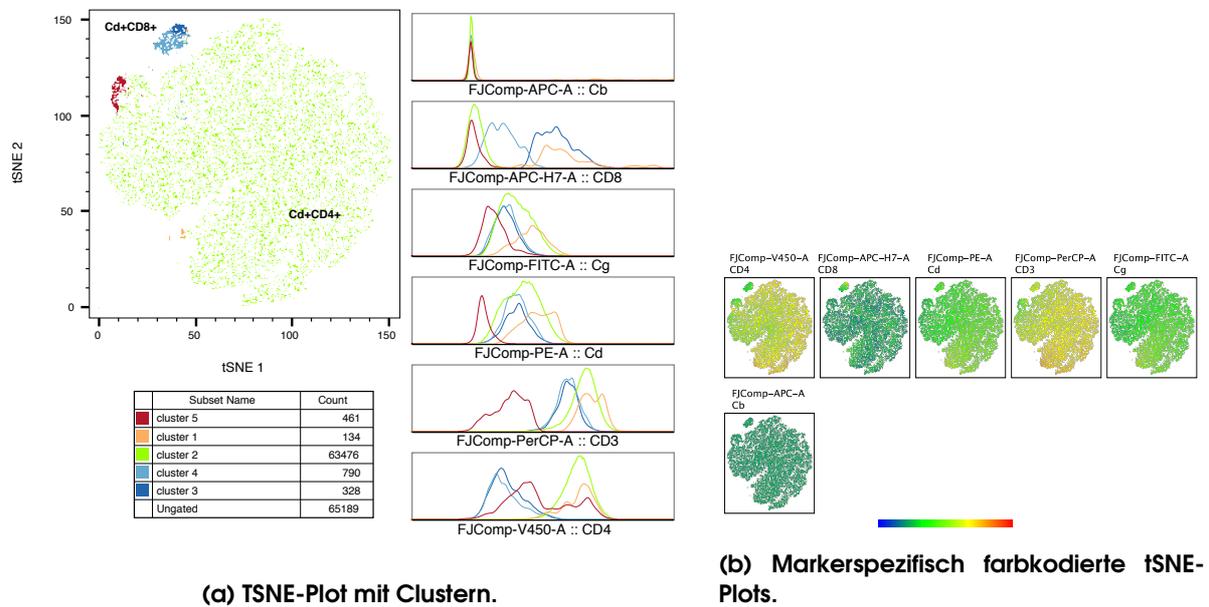
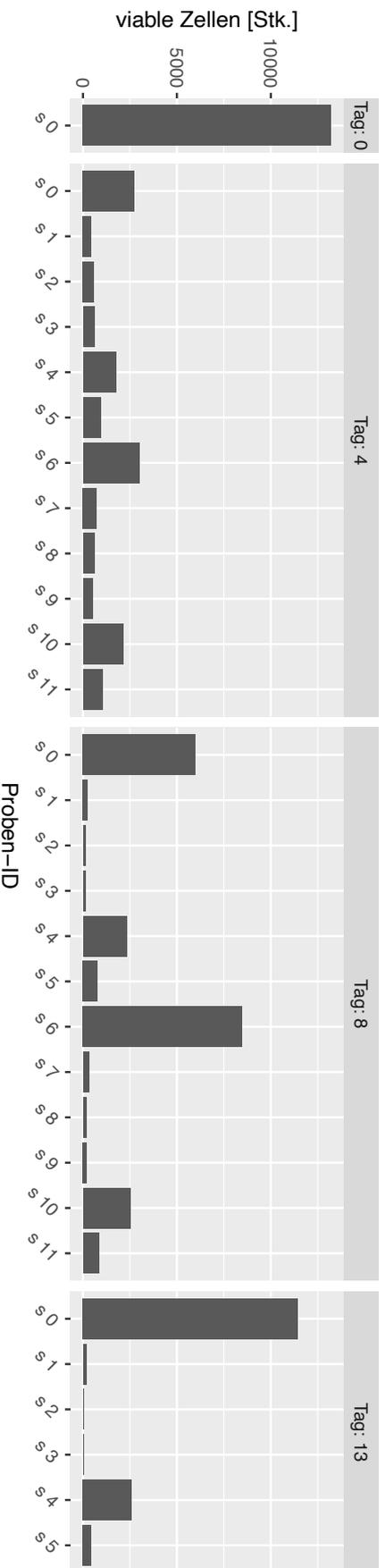
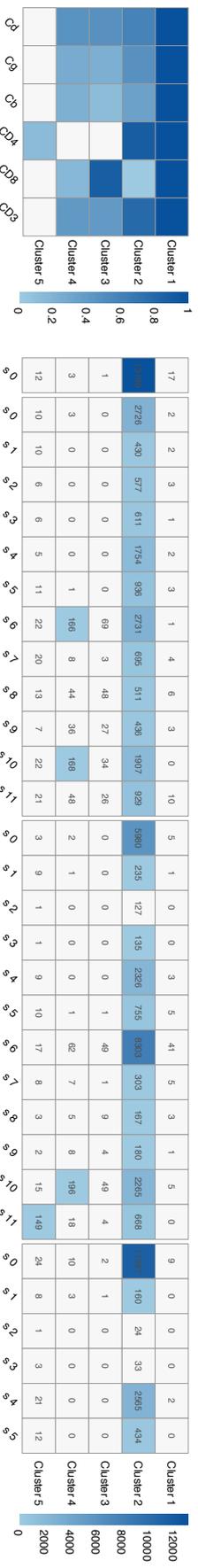


Abbildung 3.36.: TSNE-Analyse des Experiments Ue5.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.37.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ue55.

3.2.6. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS6

Da die Langzeitkultur zur Gewinnung von Zellkulturüberständen die Zellproliferation der Klone negativ beeinflusste, wurden anschließend Überstände nach kürzeren Inkubationszeiten gewonnen. Um den Einfluss von TexMACS-Medien im Vergleich zum Standard-Zellkulturmedium RPMI+ in Bezug auf die Transdifferenzierung untersuchen zu können, wurde das Experiment UeS6 unter Verwendung von RPMI+-Medium durchgeführt. Zusätzlich wurde ein möglicher Effekt von gesheddetem MICA/B auf die Transdifferenzierung der $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklone durch Zugabe von neutralisierenden α MICA/B-Antikörpern verhindert. Überstände wurden aus autologen $\alpha\beta$ T-Zellen generiert und aufgereinigt, wie für Experiment UeS5 beschrieben.

Tabelle 3.9.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS6. Zellkulturüberstände wurden von autologen $\alpha\beta$ T-Zellen in RPMI+Medium nach 6-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) α CD3/CD28-Stimulation gebildet. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $1,18 \cdot 10^5$ Klonzellen. M - 100 μ l RPMI+ Medium pro Well, Ue - 100 μ l konditionierter Überstand pro Well; α MICA/B - α MICA/B -Antikörper (Preinkubation der Überstände/des Mediums: 5 min, auf $C_{end} = 2 \mu$ g/ml verdünnt, 37 °C); U - U-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen von 200 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	HHK1-1	M	U	0, 7, 10, 15, 22, 29
s 1	HHK1-1	Ue3_28	U	17, 10, 15, 22, 29
s 2	HHK1-1	Uew_o	U	7, 10, 15, 22, 29
s 3	HHK1-1	M+ α MICA/B	U	7, 10, 15, 22, 29
s 4	HHK1-1	Ue3_28+ α MICA/B	U	7, 10, 15, 22, 29
s 5	HHK1-1	Uew_o+ α MICA/B	U	7, 10, 15, 22, 29
s 6	HHK1-2	M	U	0, 7, 10, 15, 22, 29
s 7	HHK1-2	Ue3_28	U	7, 10, 15, 22, 29
s 8	HHK1-2	Uew_o	U	7, 10, 15, 22, 29
s 9	HHK1-2	M+ α MICA/B	U	7, 10, 15, 22, 29
s 10	HHK1-2	Ue3_28+ α MICA/B	U	7, 10, 15, 22, 29
s 11	HHK1-2	Uew_o+ α MICA/B	U	7, 10, 15, 22, 29

Die experimentellen Settings des Experiments UeS6 führten zu keiner Transdifferenzierung, wie man am ausbleibenden Clustering des tSNE-Plots erkennen kann: die meisten Zellen sind in Cluster 4 zu finden, welches den Markersignalen der $V\delta 1^+CD4^+$ -Progenitoren entspricht (Abb. 3.38a). Betrachtet man den Viabilitätsplot in Abb. 3.39a, so zeigen die Proben s1/4/7/10, die mit Überständen von α CD3/CD28-stimulierten PBMCs versetzt wurden, über alle Tage die höchste Anzahl viabler Zellen. Die Neutralisation des gesheddeten α MICA/B bewirkte bei beiden Klonen kein von der entsprechenden unbehandelten Probe abweichendes Verhalten (s1 & s7 vs. s4 & s10, α MICA/B-only-Proben s3 und s9, sowie Mock-Proben s0 und s6, alle Abb. 3.39a). Klon HHK1-2 hatte im Schnitt eine höhere Viabilität.

3. ERGEBNISSE

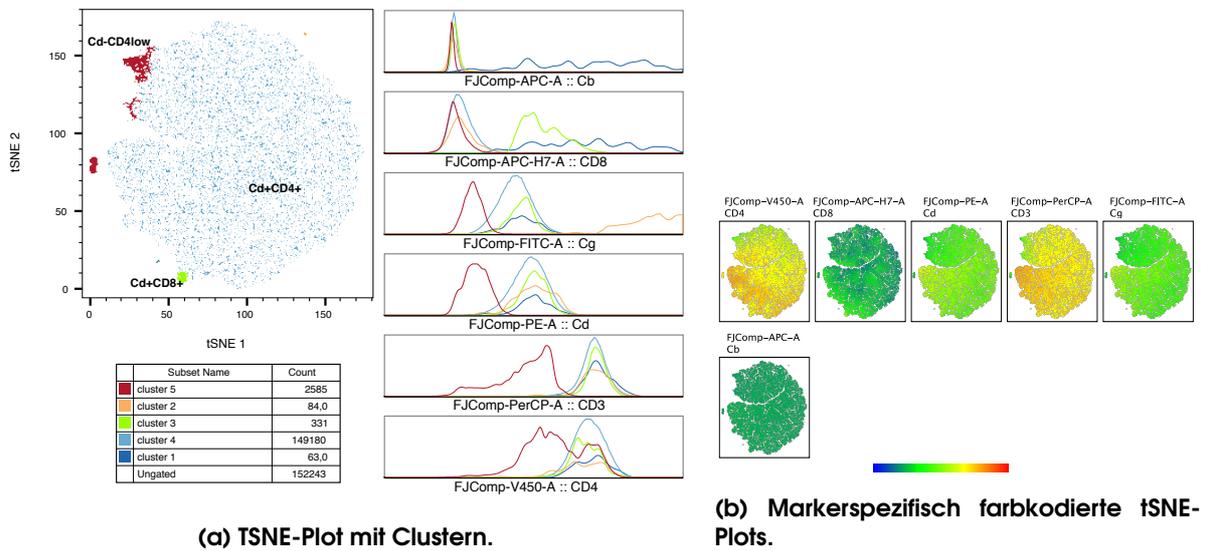
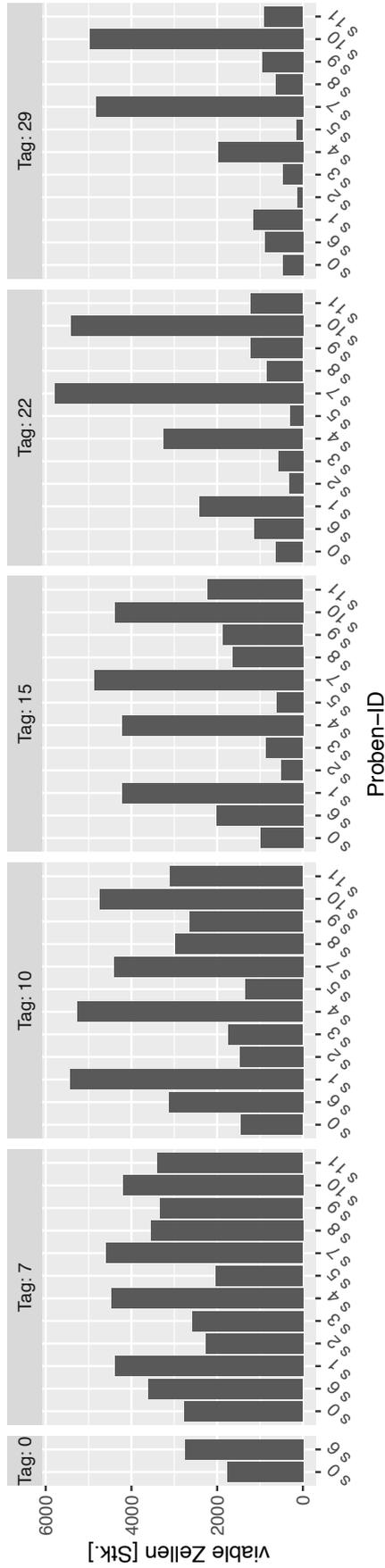
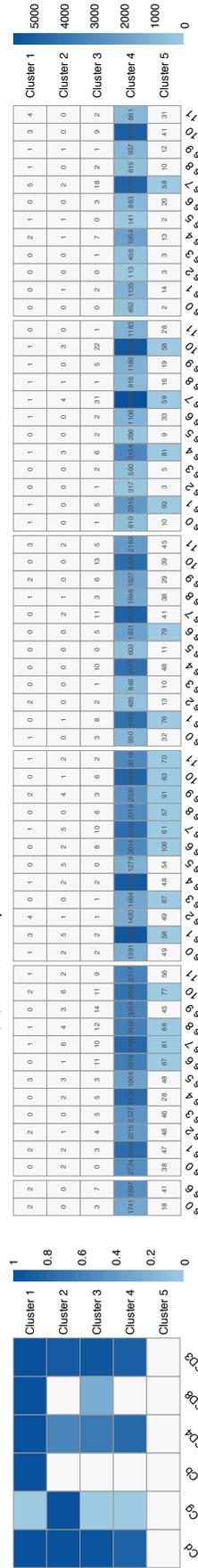


Abbildung 3.38.: TSNE-Analyse des Experiments UeS6.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-signalmediane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.39.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS6.

3. ERGEBNISSE

3.2.7. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS7

Im Rahmen des Experiments UeS7 wurden autologe PBMCs 5 Tage vor Versuchsbeginn isoliert, wenn angegeben stimuliert (α CD3/CD28) und bei einer Dichte von 10^6 Zellen/ml in TexMACS-Medium inkubiert. Die Reinheit der Überstände wurde durch eine α CD3/28-Bead-Abreicherung auf einem Magneten und zwei Zentrifugationsschritte (1. bei $450 \times g/2$. bei $5000 \times g$, 10 min, RT) sichergestellt. Um den Einfluss von Notch-Signaling und TZR β -Stimulation zu untersuchen wurden ein Teil der bestrahlten Feederzellen an Tag 0 mit Antikörpern vorinkubiert. Dies geschah für 30 min bei 37°C mit α DLL4- und α TZR β (VH31)-Antikörpern bevor sie zur Co-Kultur hinzugefügt wurden.

Tabelle 3.10.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS7. Zellkulturüberstände wurden von autologen PBMCs in TexMACS-Medium und 5-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) α CD3/CD28-Stimulation ($c_{\text{end}}=30$ units/ml IL-2) gewonnen. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $1,18 \cdot 10^5$ Klonzellen. M - 100 μ l TexMACS-Medium pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well; Z - autologe PBMCs ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klon:Z 1:1,5), AB - α DLL4 ($c_{\text{end}}=2 \mu\text{g/ml}$) und α TZR β -Antikörper ($c_{\text{end}}=1 \mu\text{g/ml}$), U - U-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen von 200 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	HHK1-1	M	U	0, 7
s 1	HHK1-1	Ue3_28	U	7
s 2	HHK1-1	Uew_o	U	7
s 3	HHK1-1	Z3_28	U	7
s 4	HHK1-1	(Ue+Z)3_28	U	7
s 5	HHK1-1	(Ue+Z)w_o	U	7
s 6	HHK1-1	Zw_o	U	7
s 7	HHK1-1	M+AB	U	7
s 8	HHK1-1	Uew_o+AB	U	7
s 9	HHK1-1	Uew3_28+AB	U	7
s 10	HHK1-1	Zw_o+AB	U	7
s 11	HHK1-1	(Ue+Z)w_o+AB	U	7
s 12	HHK1-1	(Ue+Z)3_28+AB	U	7
s 13	HHK1-1	Ue3_28+AB	U	7

Interessanterweise war im Experiment UeS7 die MICA-Konzentration im Überstand von ruhenden PMBCs ($c = 10,76 \text{ pg/ml}$, $SD = 3,41 \text{ pg/ml}$, $n = 2$) nachweisbar und lag bei etwa einem Drittel derjenigen von α CD3/28-stimulierten PBMCs ($c = 35,78 \text{ pg/ml}$, $SD = 2,54 \text{ pg/ml}$, $n = 2$). Wie im tSNE-Plot (Abb. 3.41) dargestellt, fand in den ersten sieben Tagen des Experiments keine Transdifferenzierung statt. Aufgrund der geringen Gesamtviabilität der V δ 1 $^+$ CD4 $^+$ T-Zellen wurde das Experiment vorzeitig abgebrochen (Abb. 3.42a). Bis zum siebten Tag konnte kein unterschiedliches Verhalten zwischen AB-behandelten (s7-13) und nicht-behandelten Proben (s0-6) beobachtet werden.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

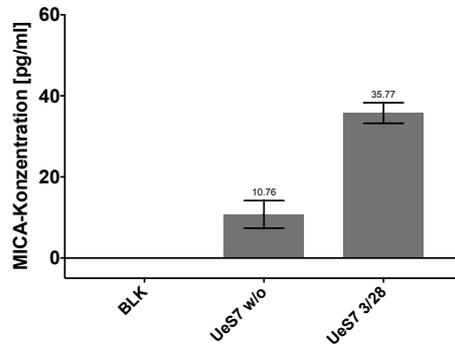


Abbildung 3.40.: MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments **UeS7**. Die MICA-Konzentration autologer Zellkulturüberstände von CD3/28-stimulierten oder unstimulierten PBMCs, welche TexMACS-Medium über 5 Tage vorkonditionierten, wurde in Duplikaten über ELISA ermittelt. BLK - Negativkontrolle.

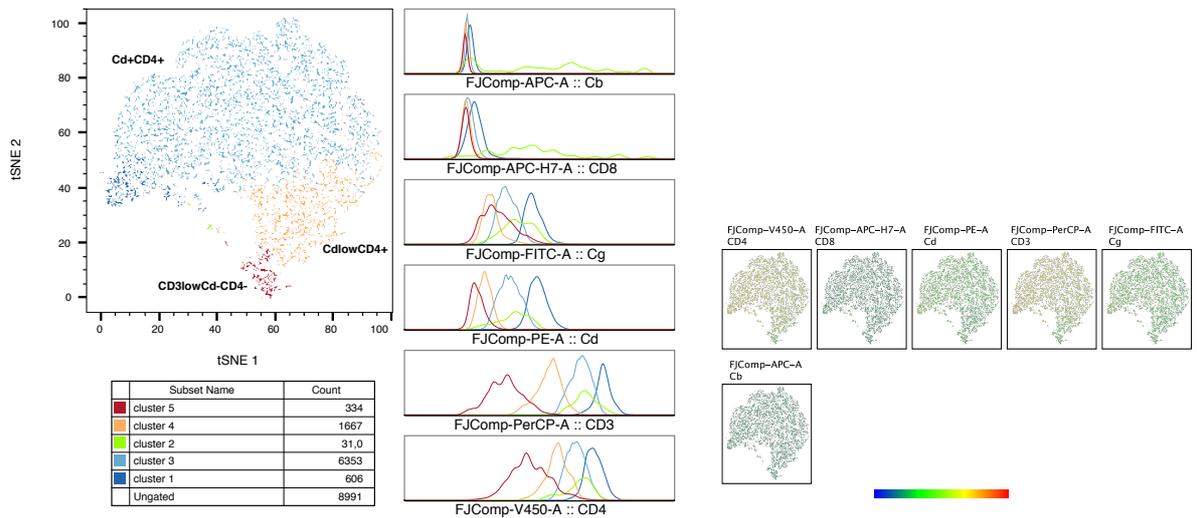
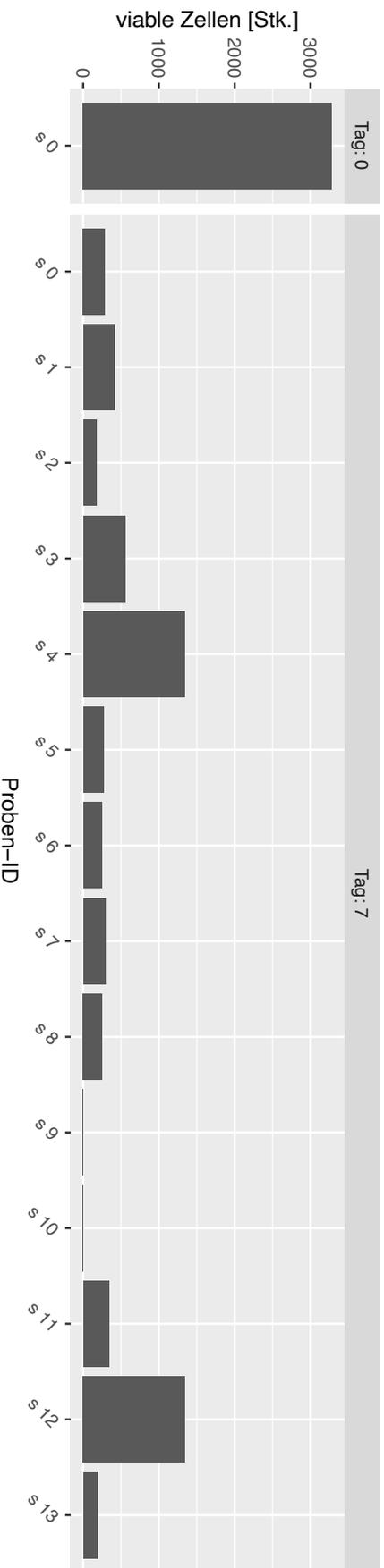
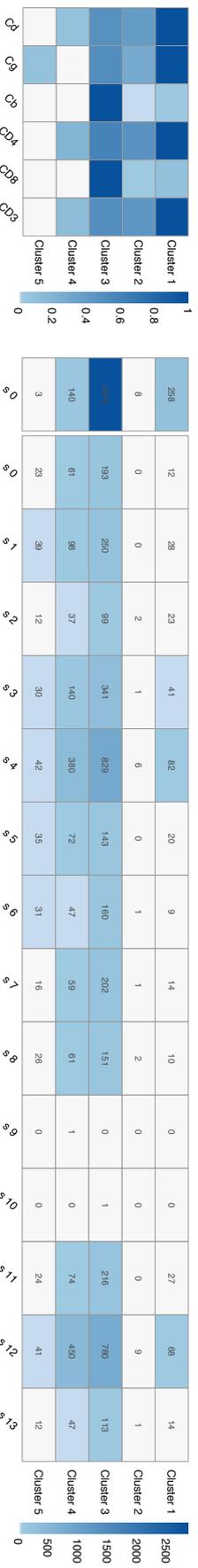


Abbildung 3.41.: TSNE-Analyse des Experiments UeS7.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(c) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

3.2.8. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS8

Um Experiment UeS7 zu wiederholen und die Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein weiterer frisch klonierter $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klon (VSK2-13) unter den für UeS7 beschriebenen Bedingungen und Settings untersucht. Hierzu wurden Überstände aus 6-tägiger autologer PBMC-Kultur in TexMACS generiert, die durch α TZRC β -Stimulation und α DLL4-Antikörpervermittelte Blockierung wurde ausschließlich bei ruhenden PBMCs durchgeführt.

Tabelle 3.11.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS8. Zellkulturüberstände wurden von autologen PBMCs in TexMACS-Medium und 6-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) α CD3/CD28-Stimulation ($c_{end}=30$ units/ml IL-2) gewonnen. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $1,18 \cdot 10^5$ Klonzellen. M - 100 μ l TexMACS-Medium pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well; Z - autologe PBMCs bei $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klon:Z 1:1,5), AB - α DLL4 ($c_{end}=2$ μ g/ml) und α TZRC β -Antikörper ($c_{end}=1$ μ g/ml), U - U-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen von 200 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	VSK2-13	M	NK	0, 7, 12, 16, 23
s 1	VSK2-13	Uew_o	NK	7, 12, 16, 23
s 2	VSK2-13	Ue3_28	NK	7, 12, 16, 23
s 3	VSK2-13	Zw_o	NK	7, 12, 16, 23
s 4	VSK2-13	Z3_28	NK	7, 12, 16, 23
s 5	VSK2-13	Ue+Zw_o	NK	7, 12, 16, 23
s 6	VSK2-13	Ue+Z3_28	NK	7, 12, 16, 23
s 7	VSK2-13	Uew_o +AB	NK	7, 12, 16, 23
s 8	VSK2-13	Zw_o +AB	NK	7, 12, 16, 23
s 9	VSK2-13	Ue+Zw_o +AB	NK	7, 12, 16, 23

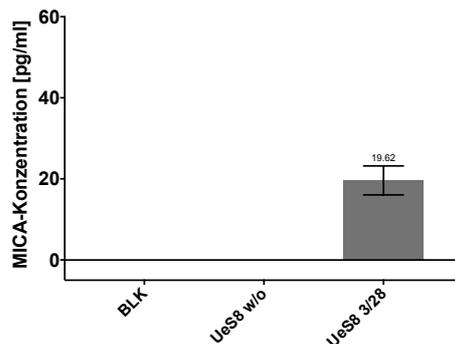


Abbildung 3.43.: MICA-Konzentration der autologen Zellkulturüberstände des Experiments UeS8. Die MICA-Konzentration autologer Zellkulturüberstände von CD3/28-stimulierten oder unstimulierten PBMCs, welche TexMACS-Medium über 6 Tage vorkonditionierten, wurde in Duplikaten über ELISA ermittelt. BLK - Negativkontrolle.

Wie für andere UeS-Experimente (außer UeS7) berichtet, war MICA ausschließlich im Überstand von α CD3/28-stimulierten PBMCs nachweisbar ($c = 19,63$ pg/ml, $SD = 3,58$ pg/ml, $n = 2$). Die Anzahl transdifferenzierender Zellen war in diesem Experiment bei allen Proben außer Probe s4 und s6 (Z3_28 und Ue+Z3_28) mit unter 1% der viablen Zellen vernachlässigbar gering. Die Mehrheit aller Zellen wurde dem Cluster 2 zugeordnet

3. ERGEBNISSE

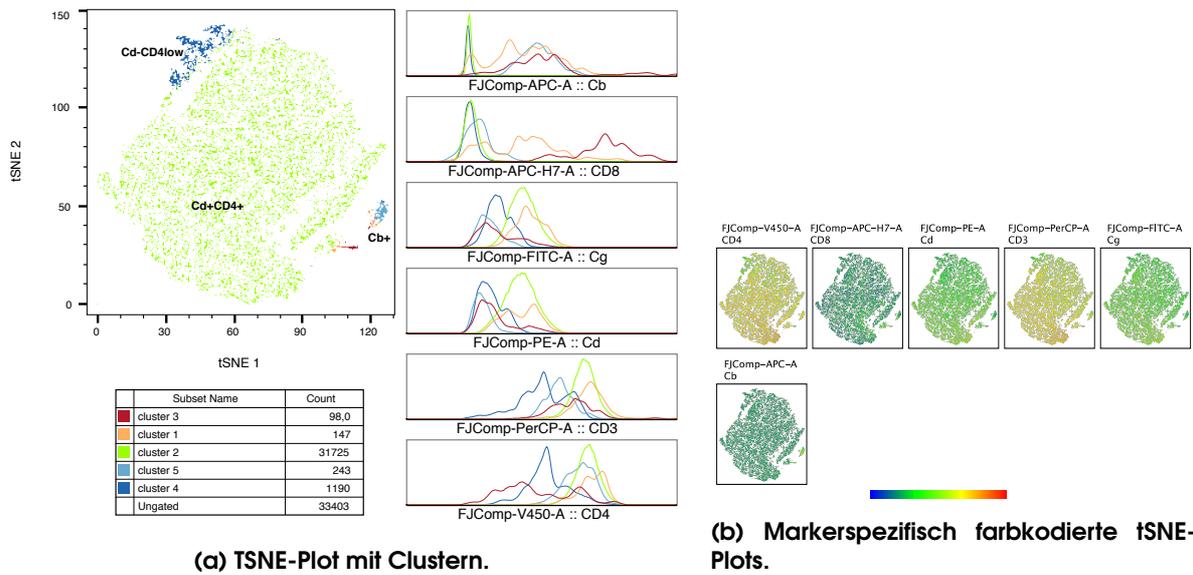
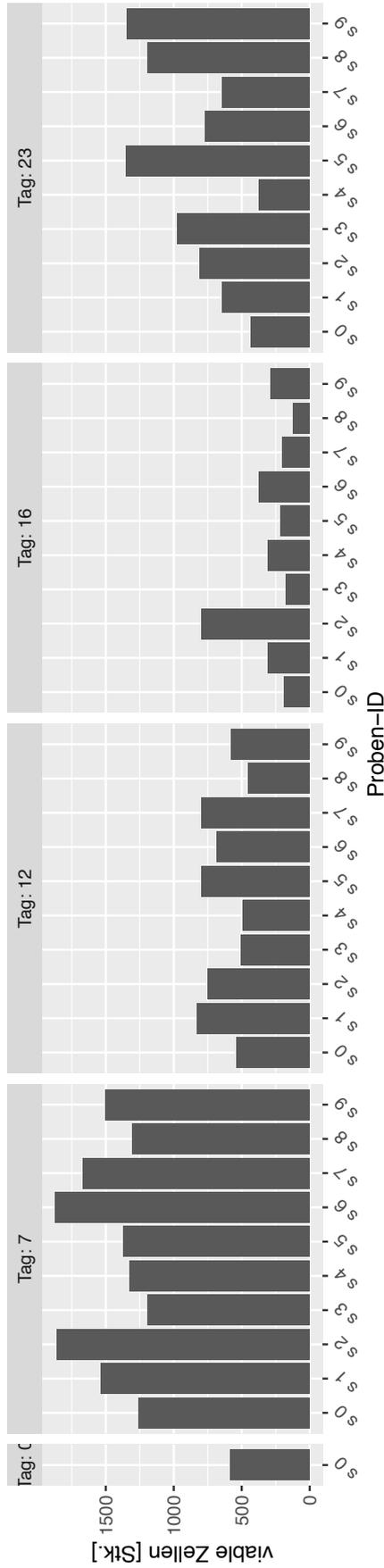
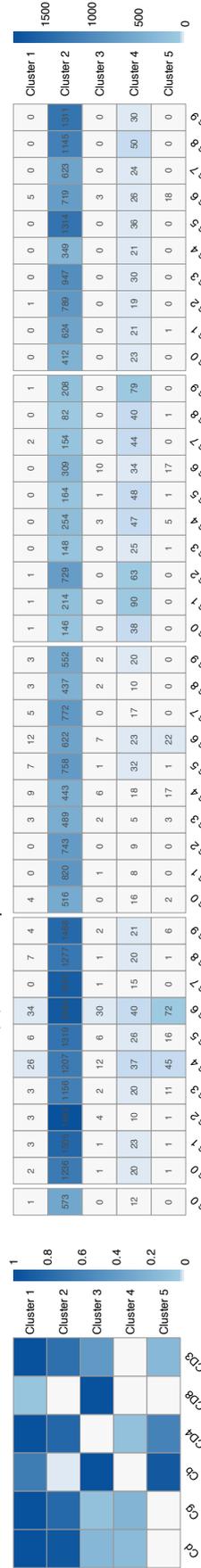


Abbildung 3.44.: TSNE-Analyse des Experiments UeS8.

und die Anzahl viabler Zellen war über alle Zeitpunkte gering ($V\delta 1^+CD4^+$ Vorläuferzellen, Abb. 3.44a und Abb. 3.45c). Die variablen, nicht Gauß-verteilten, clusterspezifischen $C\beta$ -Expression im $C\beta$ -Histogramm (s. Abb 3.44a) in Kombination mit den geringen Zellzahlen an vielen Zeitpunkten deutet auf das Vorliegen von Messartefakten hin.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-signalmediane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.45.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS8.

3. ERGEBNISSE

3.2.9. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS9

Nach Seet und Kollegen (112), ermöglicht eine dichte 3D-Kultur (in luftexponierten Sphären) die Differenzierung von T-Zellen aus CD34⁺CD3⁺T-Zell-Progenitoren im Kontext mit hDLL1-exprimierenden murinen Stromazellen (MS-5-hDLL1-Zelllinie, Verhältnis 1:20). Dabei ahmt das 3D-Setting auch räumlich die thymische Umgebung nach, was sich positiv auf die T-Zell-Entwicklungsraten auswirkt (112). Basierend auf unseren früheren Experimenten mit vorkonditionierten Zellkulturüberständen interessierte uns, ob der 3D-Kontext die Transdifferenzierung in unserem experimentellen Setting verbessern würde. Daher wurde ein V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klon mit der 80 Gy bestrahlten, autologen adhären PBMC-Zellfraktion (gewonnen durch Plastikadhärenz auf einer Zellkulturplatte, 15,1% CD14⁺ Monozyten) in einem Verhältnis von 1:16,7 im Konus eines V-bottom-Wells gemischt. Um den Einfluss des Notch-Signaling zu untersuchen, wurde gleichzeitig jeweils ein Ansatz mit einem blockierenden α DLL4-Antikörper angesetzt. Die Reinheit des konditionierten Zellkulturüberstandes wurde durch zwei Zentrifugationsschritte (1. bei 450 x g, 2. bei 5000 x g, jeweils 10 min, RT) sichergestellt. An Tag 9 wurde jede Vertiefung mit 100 μ l TexMACS inkl. IL-2 (c_{end} =200 μ l/ml) und IL-7 (c_{end} =10 ng/ml) supplementiert.

Tabelle 3.12.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS9. Zellkulturüberstände wurden von autologen ruhenden PBMCs in TexMACS-Medium und 5-tägiger Inkubation (c_{end} = 30 units/ml IL-2) gewonnen. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l TexMACS-Medium pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well; Z - ruhende autologe PBMCs bei $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klon:Z 1:1,5), Mono - bestrahlte autologe adhären PBMC-Fraktion ($1,26 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klon:Mono 1:16,8), AB - α DLL4 (c_{end} = 2 μ g/ml ; V - V-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, finales Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	VSK2-13	Ue+Z	V	0, 7, 10, 13
s 1	VSK2-13	Ue+Z +AB	V	7, 10, 13
s 2	VSK2-13	Ue+Mono	V	7, 10, 13
s 3	VSK2-13	Ue+Mono +AB	V	7, 10, 13

Der tSNE-Plot von Experiment UeS9 zeigt neben dem progenitorspezifischen Cluster (Cluster 1) nur ein kleines Cluster mit C β ⁺CD4⁺Zellen (Cluster 5) sowie ein weiteres mit C β ⁺CD8⁺Zellen (Cluster 4) (s. Abb. 3.46). Die meisten C β ⁺Zellen waren in den „Mono“-supplementierten Proben s2 und s3 nachweisbar, wobei die Viabilität dieser beiden Proben stets geringer war als bei denjenigen Settings mit PBMC-Support (s0 + s1). Da aber weder eine Erhöhung der Zellzahlen über die Zeit noch eine Fokussierung auf ein Cluster sichtbar sind, könnte es sich bei diesen Messungen auch um Messartefakte handeln (Abb. 3.47). Ein Effekt der Neutralisation des Notch-Signaling über α DLL4-Antikörper auf die Initiation der Transdifferenzierung (s1 vs. s0, s3 vs. s2) ist nicht erkennbar.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

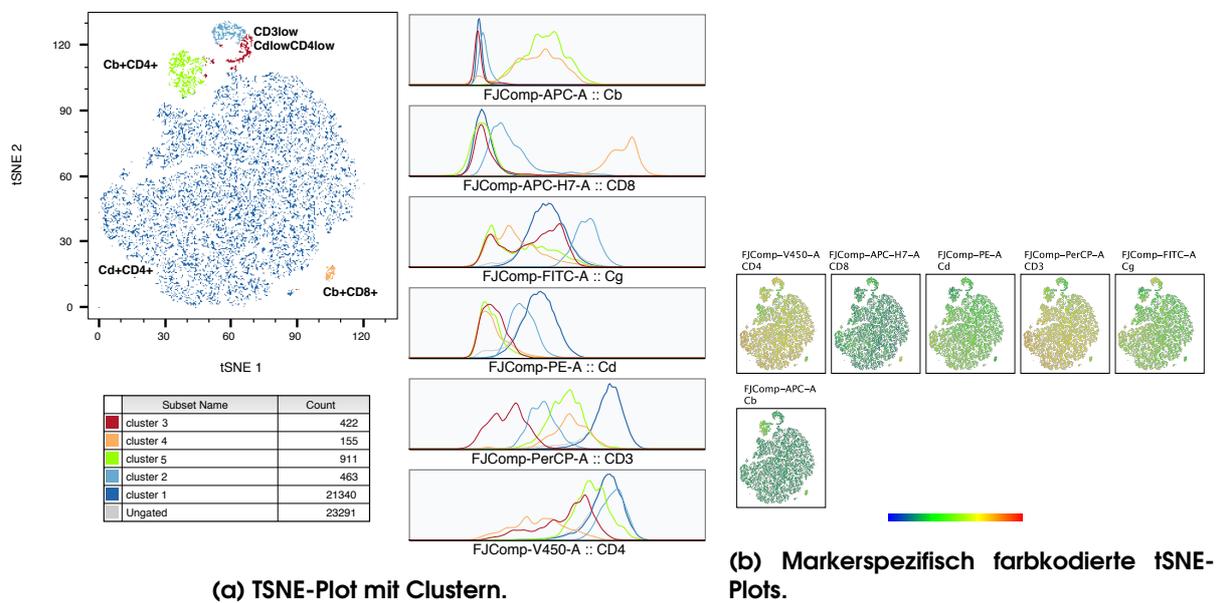
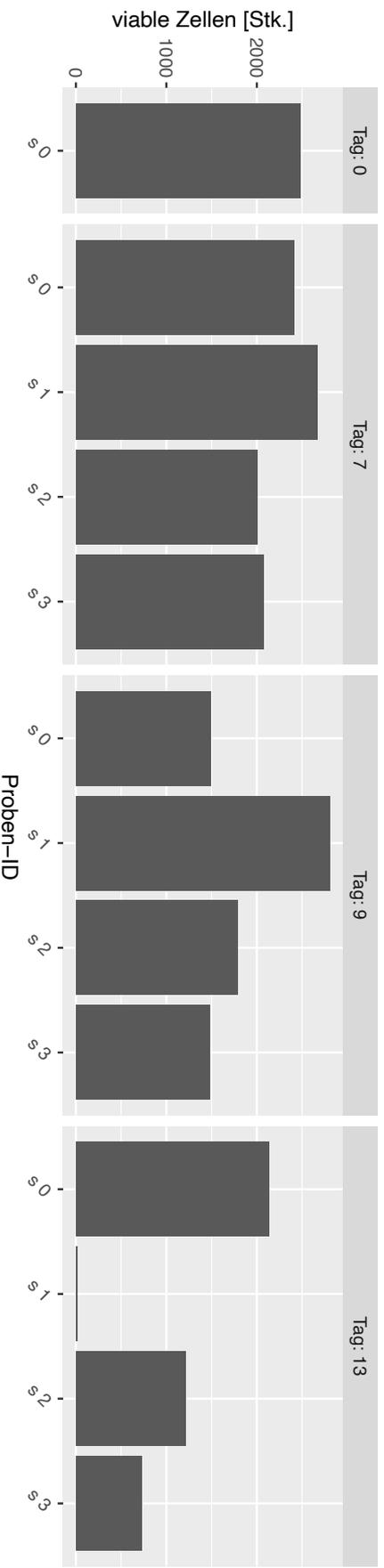
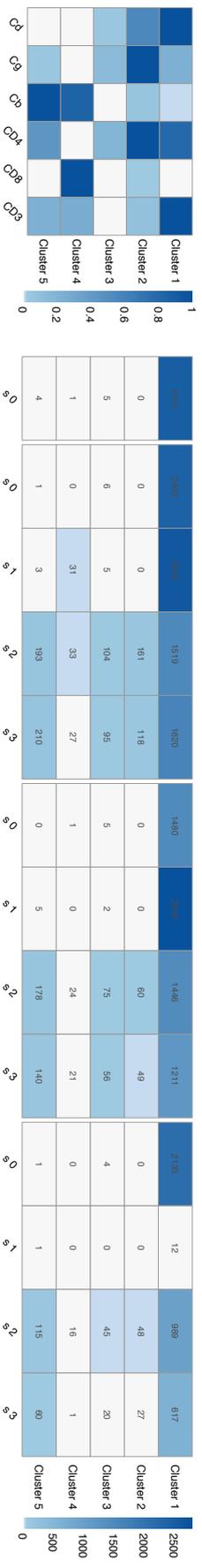


Abbildung 3.46.: TSNE-Analyse des Experiments Ues9.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.47.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues9.

3.2.10. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS10

Für die *in vitro* T-Zell-Differenzierung wurde eine Abhängigkeit von der FBS-Charge berichtet (s. (112)). Basierend auf dem von Seet und Kollegen beschriebenen Versuchsaufbau wurde das übliche FCS-Supplement des (T-Zell-)Mediums durch RB27 ersetzt, um eine serumfreie und damit reproduzierbarere, effiziente Umgebung für die T-Zell-Differenzierung zu gewährleisten (112). Zusätzlich sorgen die hohen Glukosekonzentrationen in TexMACS- und RPMI+-Medium einerseits für hohe T-Zell-Proliferationsraten und erlaubt so *ex vivo* eine optimale Vermehrung der T-Zellen, begünstigt aber andererseits auch die Glykolyse gegenüber der oxidativen Phosphorylierung, ähnlich dem für Tumorzellen charakteristischen „Warburg-Effekt“ (z. B. (113)). Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss der Glukosekonzentration auf das Verhalten von PBMCs und $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellklonen zunächst durch Titrieren von 5/0,5/0,05 mM Glukose in RB27 (mit 4% B27-Zusatz, Daten nicht gezeigt) untersucht. Die Reinheit der Überstände wurde durch eine $\alpha CD3/CD28$ -Bead-Abreicherung auf einem Magneten und zwei Zentrifugationsschritte (1. bei 450 x g/2. bei 5000 x g, 10 min, RT) sichergestellt. Dieses Verfahren zur Überstandserzeugung und Aufreinigung diente als Blaupause für alle folgenden UeS-Experimente. Zur Hälfte aller Ansätze wurde Milchsäure zugegeben, um den Einfluss dieses Metaboliten des Warburgeffekts ((113)) auf die Transdifferenzierung zu untersuchen.

In allen durch PBMCs konditionierten Überständen aus RB27-Medium und beiden Glukosekonzentrationen war gesheddetes MICA von Tag 4 bis 6 nachweisbar, mit ähnlichen Werten für nicht-stimulierte und $\alpha CD3/28$ -stimulierte PBMCs (Abb. 3.48). Da die Messungen alle sehr nahe am unteren Detektionslimit des Assays lagen, ist ein quantitativer Vergleich der Werte nicht sinnvoll (siehe Tab. 3.13).

Tabelle 3.13.: MICA-Konzentrationen der Zellkulturüberstände von PBMCs in RB27-Medium mit 0,5 oder 5 mM Glukose.

Probe	Konzentration (Mittelwert) (pg/ml)	SD (pg/ml)
5mM stim T4	21,18	3,94
5mM stim T5	14,91	6,12
5mM stim T6	5,27	7,45
5mM w/o T4	5,76	8,15
5mM w/o T5	2,81	3,97
5mM w/o T6	4,93	6,98
0,5mM stim T4	7,80	1,00
0,5mM stim T5	5,76	8,15
0,5mM stim T6	6,25	8,84
0,5mM w/o T4	13,37	8,38
0,5mM w/o T5	10,69	15,10
0,5mM w/o T6	7,83	11,07
5mM Mono T6	3,18	4,50

Wie am tSNE-Plot zu erkennen fand in diesem Experiment eine Transdifferenzierung statt. Neben der erhöhten Anzahl viabler Zellen in Probe s3 (UeP5w_o+P0,5w_o, 40 020

3. ERGEBNISSE

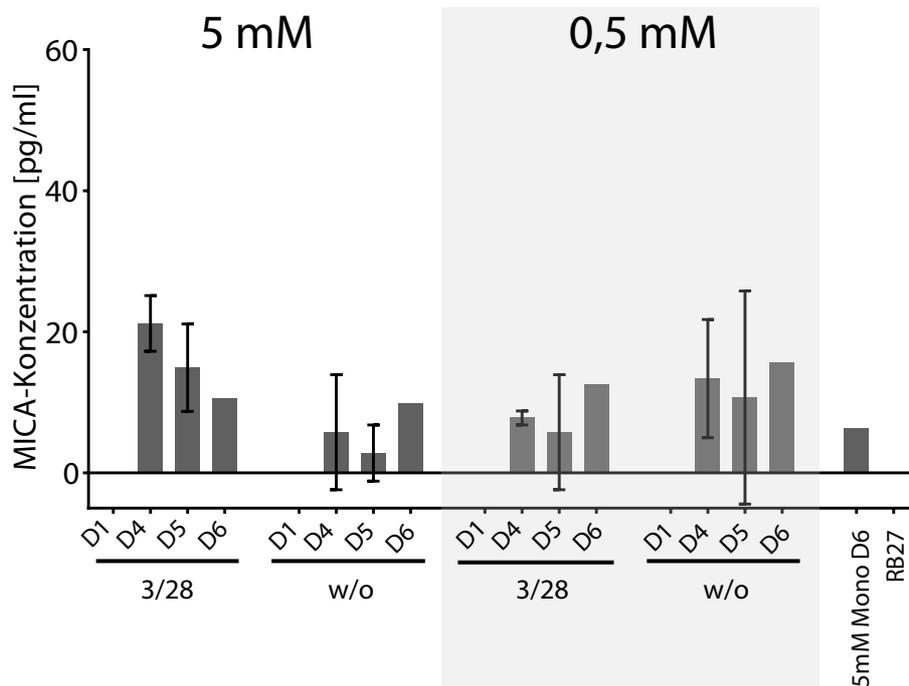


Abbildung 3.48.: MICA-Konzentration der Zellkulturüberstände von PBMCs in RB27-Medium mit 0,5 oder 5 mM Glukose. Die MICA-Konzentration autologer Zellkulturüberstände von CD3/28-stimulierten oder unstimulierten PBMCs wurde an Tag 1/4/5/6 in Duplikaten über ELISA-Technik gemessen. Zusätzlich wurde eine Probe der 6 Tage kultivierten adhärenenten PBMC-Fraktion des Experiments UeS10 (Mono) untersucht.

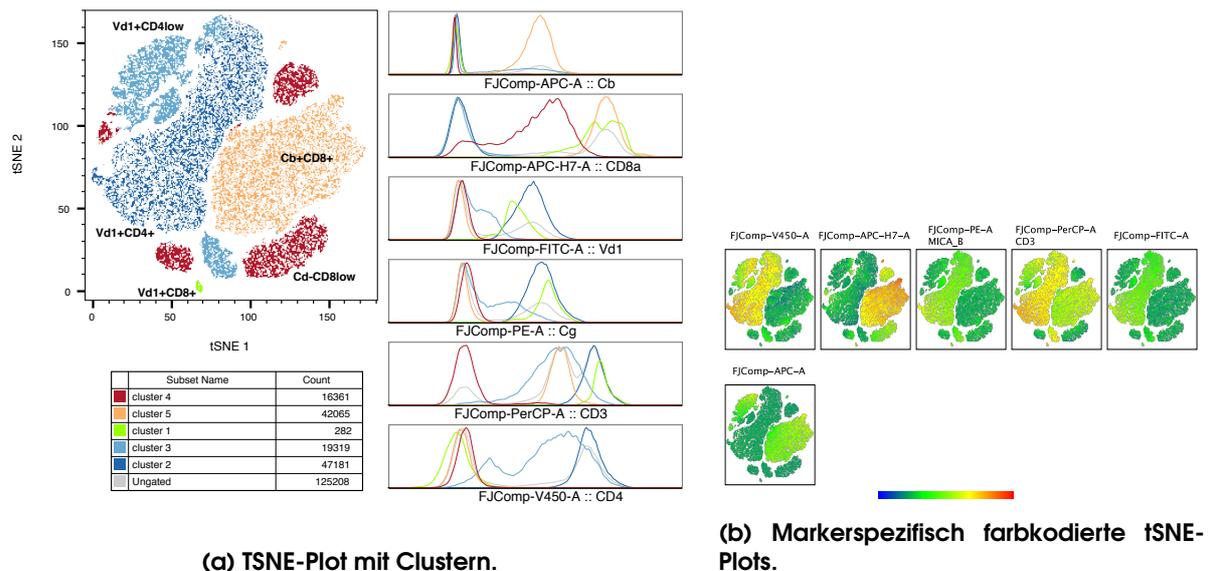
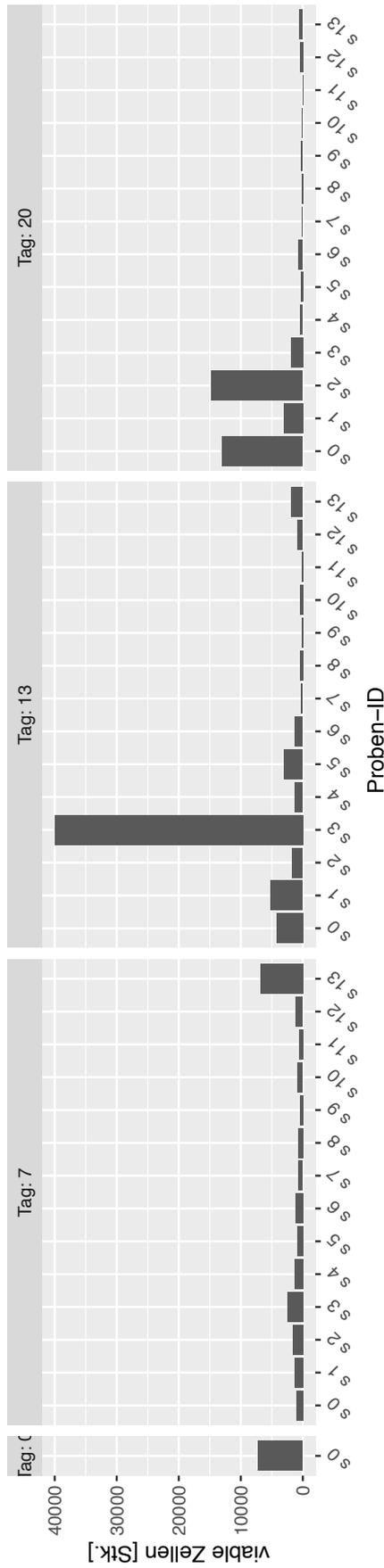
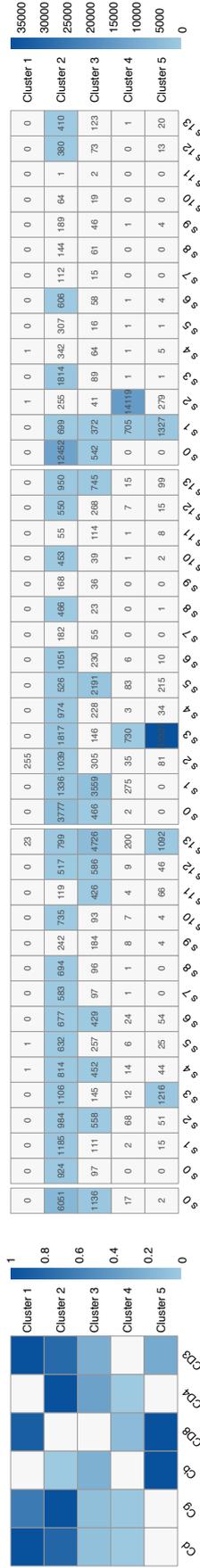


Abbildung 3.49.: TSNE-Analyse des Experiments UeS10.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-gnalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.50.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues10.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.14.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS10. Zellkulturüberstände wurden von autologen PBMCs und Monozyten (adhärente PBMC-Fraktion) in RB27-Medium mit 0,5 oder 5 mM Glukose und 15 mM Michsäure (LA) nach 6-tägiger Inkubation ohne (w_o) oder mit (3_28) CD3/CD28-Stimulation gewonnen. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27-Medium mit 5mM Glucose pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well; Mono - bestrahlte autologe adhärente PBMC-Fraktion nach 6-tägiger Kultur in RB27 ($1,26 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klon:Mono 1:16,8), P - autologe PBMCs; V - V-bottom 96-Well-Zellkulturplatte, +LA - 15 mM Endkonzentration, finales Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	VSK2-13	M	V	0, 7, 13, 20
s 1	VSK2-13	UeMono	V	7, 13, 20
s 2	VSK2-13	UeMono+Mono	V	7, 13, 20
s 3	VSK2-13	UeP5w_o+P0,5w_o	V	7, 13, 20
s 4	VSK2-13	UeP53_28+P3_28	V	7, 13, 20
s 5	VSK2-13	UeP0,5w_o+P5w_0	V	7, 13, 20
s 6	VSK2-13	UeP0,53_28+P0,53_28	V	7, 13, 20
s 7	VSK2-13	M +LA	V	7, 13, 20
s 8	VSK2-13	UeMono +LA	V	7, 13, 20
s 9	VSK2-13	UeMono+Mono +LA	V	7, 13, 20
s 10	VSK2-13	UeP5w_o+P0,5w_o +LA	V	7, 13, 20
s 11	VSK2-13	UeP53_28+P3_28 +LA	V	7, 13, 20
s 12	VSK2-13	UeP0,5w_o+P5w_0 +LA	V	7, 13, 20
s 13	VSK2-13	UeP0,53_28+P0,53_28 +LA	V	7, 13, 20

viable Zellen) an Tag 13, enthält diese Probe auch die meisten transdifferenzierten $C\beta^+CD8^+$ Zellen: an Tag 7 sind 49,1 % bzw. an Tag 13 93 % der viablen Zellen in Cluster 5 (Abb. 3.50). Probe s13 (UeP0,53_28+P0,53_28+LA) hat an Tag 7 eine ähnliche Zellzahl in Cluster 5 (16,0%/5,5 %) wie Probe s3, aber die Anzahl viabler Zellen und auch die Zellen, die Cluster 5 zugeordnet sind, nehmen mit der Zeit ab: an Tag 13/20 wurden nur noch 26,5 % bzw. 8,1 % der viablen Zellen von Tag 7 detektiert. Für Probe s1 (nur UeMono) sind an Tag 20 Zellen in den Clustern 2-5 zu finden, was einer Transdifferenzierung entsprechen könnte. Im Gegensatz dazu weißt die Probe s2 (UeMono+Mono) hauptsächlich $C\delta^+CD8^{low}$ Zellen (Cluster 4) auf. Zellen, die dem Cluster 3 ($C\delta^+CD4^{low}$) zugeordnet sind, finden sich in fast allen Proben und Tagen im Bereich zwischen 0,3 – 72,7 % aller viabler Zellen. Anwesenheit von Laktat (Proben s7-13) verringerte die Viabilität der $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klone.

3.2.11. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS11

In diesem Experiment lag der Fokus auf der Wiederholung des vorherigen Experiments und dem Vergleich der Einflüsse von autologen, adhärennten oder nicht-fraktionierten PBMC auf die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellklonen.

Tabelle 3.15.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS11. Zellkulturüberstände wurden von autologen PBMCs in RB27-Medium mit 0,5 oder 5 mM Glukose und der adhärennten PBMC-Fraktion (aus RB27-Medium mit 5 mM Glukose) nach 6-tägiger Inkubationszeit gewonnen. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27 mit 5 mM Glukose pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well, P (A) - bestrahlte autologe (adhärennte) PBMC-Fraktion, 6 Tage in RB27-Medium kultiviert ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:Mono/P ca. 1:20); 5/0,5 - Glukosekonzentration (mM); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte, finales Volumen waren 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	VSK2-13	M	V	0, 4, 7, 14
s 1	VSK2-13	UeP5	V	4, 7, 14
s 2	VSK2-13	Ue5+P5	V	4, 7, 14
s 3	VSK2-13	Ue5+P0,5	V	4, 7, 14
s 4	VSK2-13	Ue0,5+P5	V	4, 7, 14
s 5	VSK2-13	Ue0,5+P0,5	V	4, 7, 14
s 6	VSK2-13	Ue0,5	V	4, 7, 14
s 7	VSK2-13	Ue5+A5	V	4, 7, 14

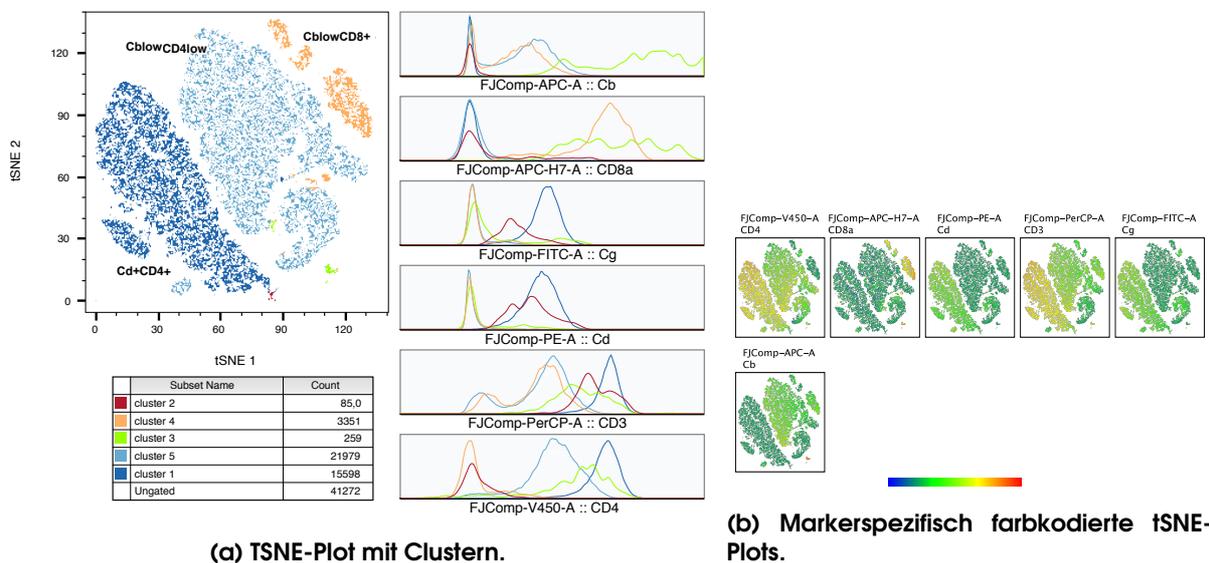
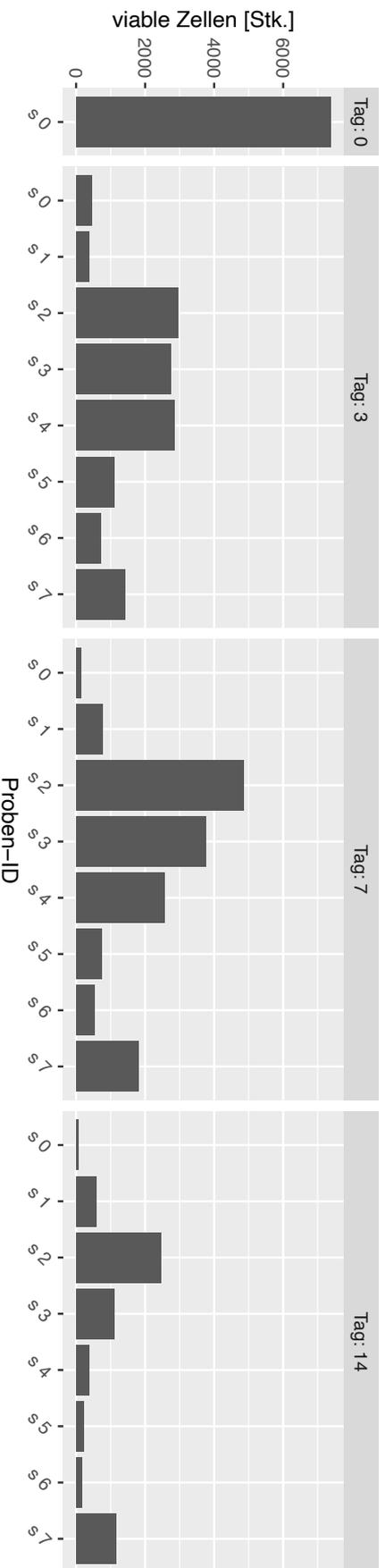
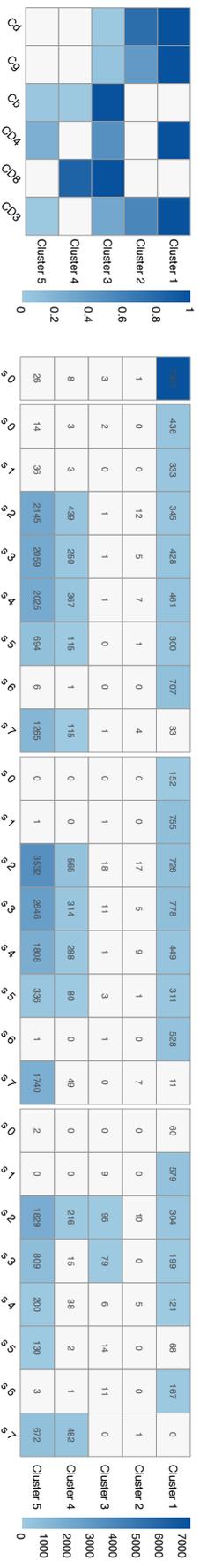


Abbildung 3.51.: TSNE-Analyse des Experiments UeS11.

Ab Tag 3 waren sowohl $C\beta^+CD4^+$ (Cluster 5) als auch $C\beta^+CD8^+$ Zellen (Cluster 4) in allen mit Feederzellen ergänzten Proben (s2/3/4/5/7) bei 56,9–99,0% aller viablen Zellen nachweisbar. Die Probe, die unter anderem die adhärennte PBMC-Fraktion als Feederzellen enthält (s7), zeigte stets die meisten $C\beta^+$ Zellen unter allen „gefeederten“ Ansätzen (s2-5), wobei Proben s2 und s3 (UeS aus RB27 mit 5 mM Glukose) zu allen Zeitpunkten



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

Abbildung 3.52.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues11.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

die meisten viablen Zellen enthielten. Zusätzlich wurde ein minimaler Anteil von 0,5% dieser möglicherweise transdifferenzierten Zellen aber bereits in der reinen Progenitorprobe s0 an Tag 0 detektiert (Abb. 3.52c: bei Proben s0/1/6 ohne Feederzellen stets unter 10,5%). Interessanterweise nimmt die Anzahl der C β ⁺Zellen in den „Überstand-only“-Proben (s1 und s6) nicht zu und verhält sich damit wie die Mock-Probe s0.

3. ERGEBNISSE

3.2.12. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS12

Wie in (32) beschrieben, sind Exosomen, die mRNA, miRNAs, Proteine und Lipide der Donorzelle transportieren, eine Komponente des Sekretoms von PBMCs mit immunologischem Potenzial. *In vitro* stimulieren Exosomen (v. a. bestrahlter) PBMCs die Chemokineexpression und Migration von Fibroblasten, zwei wichtige Prozesse im Rahmen der Angiogenese und Wundheilung (32). Deshalb wurden in diesem Experiment Exosomen, wie im Herstellerprotokoll des „Total Exosome Isolation Kit“ beschrieben, aus ca. 8 ml nicht-adhärenter PBMC-Zellsuspension isoliert, welche zunächst für 6 Tage in RB27 kultiviert worden waren. Um jegliche MICA/B-vermittelte Interaktion zwischen den Exosomen und dem V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klon zu blockieren, wurden die Exosomen zunächst für 1 Stunde bei 4 °C mit einem α MICA/B-Antikörper (5 μ g/ml) inkubiert.

Tabelle 3.16.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS12. Zellkulturüberstände wurden von autologen nicht adhärenenten PBMCs in RB27-Medium mit 5 mM Glukose und 1,5 mM Milchsäure nach 7-tägiger Inkubation gewonnen. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27 mit 5 mM Glukose pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well, Z - bestrahlte autologe (nicht adhärenente) PBMC-Fraktion, 6 Tage in RB27-Medium kultiviert ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:Mono/P ca. 1:20); E - Exosomen, AB - α MICA/B-Antikörper, E-I - Exosomenisoliationsreagenz; V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte, finales Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	VSK2-13	M	V	0, 1, 2, 3, 7, 14
s 1	VSK2-13	M+E	V	1, 2, 3, 7, 14
s 2	VSK2-13	M+E+AB	V	1, 2, 3, 7, 14
s 3	VSK2-13	Ue	V	1, 2, 3, 7, 14
s 4	VSK2-13	Ue+E	V	1, 2, 3, 7, 14
s 5	VSK2-13	Ue+E+AB	V	1, 2, 3, 7, 14
s 6	VSK2-13	Ue+E+Z	V	7, 14
s 7	VSK2-13	Ue+Z	V	7, 14
s 8	VSK2-13	M+E-I	V	7, 14
s 9	VSK2-13	M+Z	V	7, 14

In Experiment UeS12 sind zwar Cluster im tSNE-Plot zu erkennen, wahrscheinlich fand aber dennoch keine Transdifferenzierung statt (insg. lediglich 292 C β ⁺Zellen in Cluster 4 bei den Proben s6 und s7 mit Feederzellen). Vielmehr wurden diese Cluster durch Färbungsunterschiede, vor allem des Markers CD4 an den Tagen 2/3/7, verursacht: an Tagen 7 und 14 sind die TZRC δ - und CD4-Signale eines Subsets von Zellen simultan zur Anzahl viabler Zellen herunterreguliert (Abb. 3.54c: Cluster 1, 2 und 3). Da dieses Subset (Cluster 3) bei allen Proben identifiziert wird muss davon ausgegangen werden, dass das Verhalten des untersuchten V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klons unabhängig vom experimentellen Setting ist. C δ ^{low}CD4^{low}CD3^{low}Klonzellen (Cluster 3) wurden bei vielen UeS Experimenten detektiert und könnten auf das Ausbleiben einer starken TZR- und Zytokin-Stimulation in der Langzeitkultur zurückzuführen sein.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

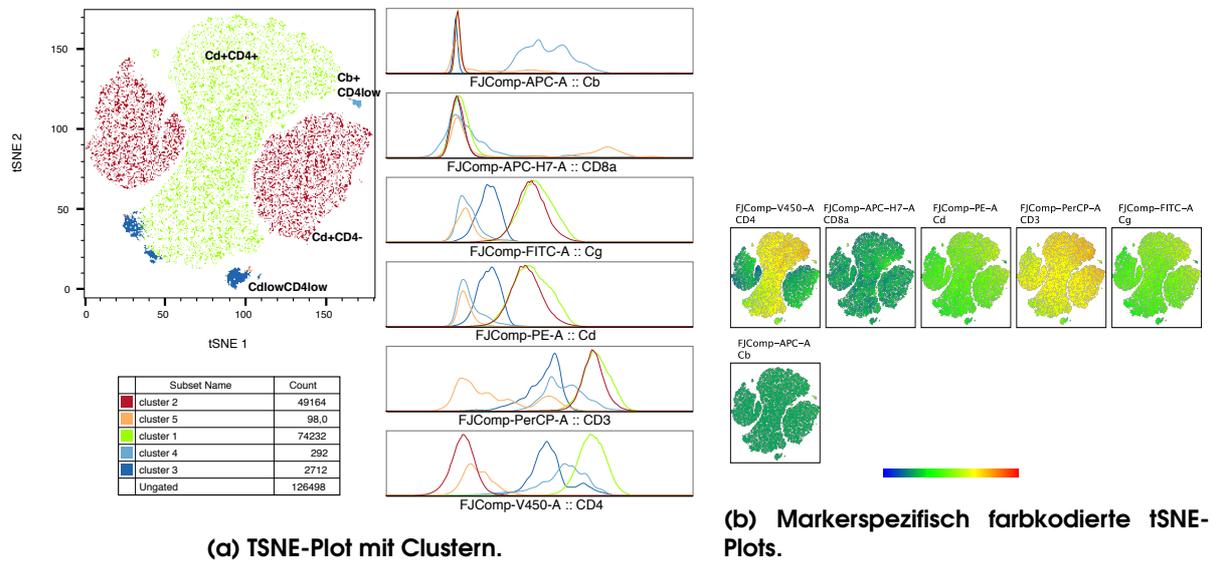
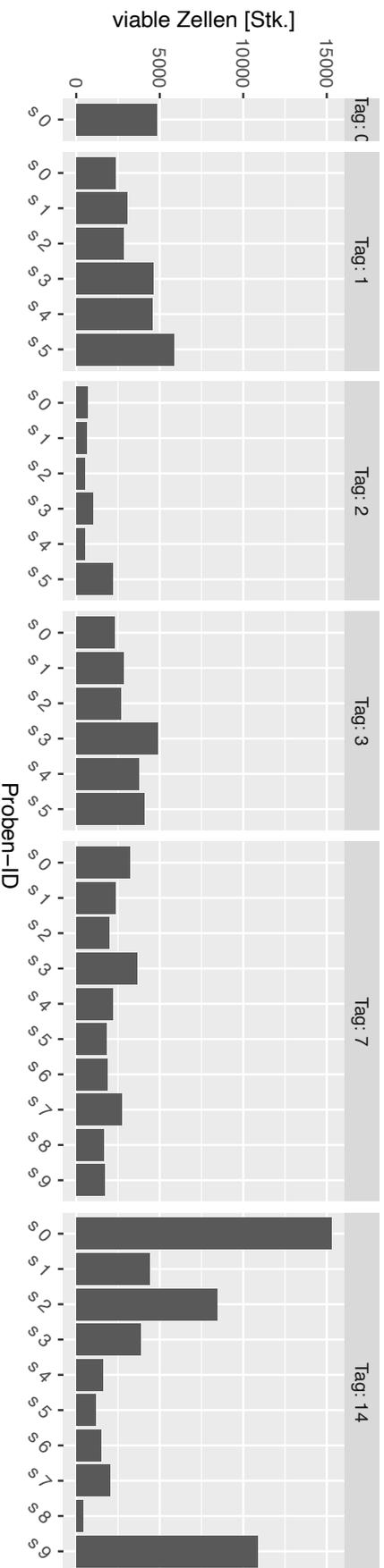
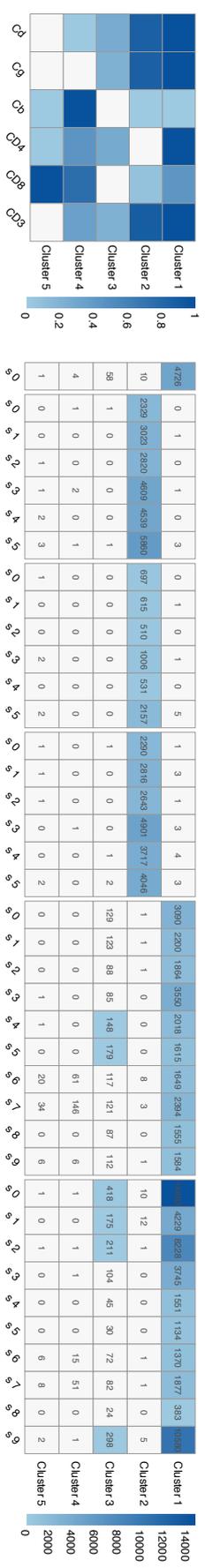


Abbildung 3.53.: TSNE-Analyse des Experiments UeS12.

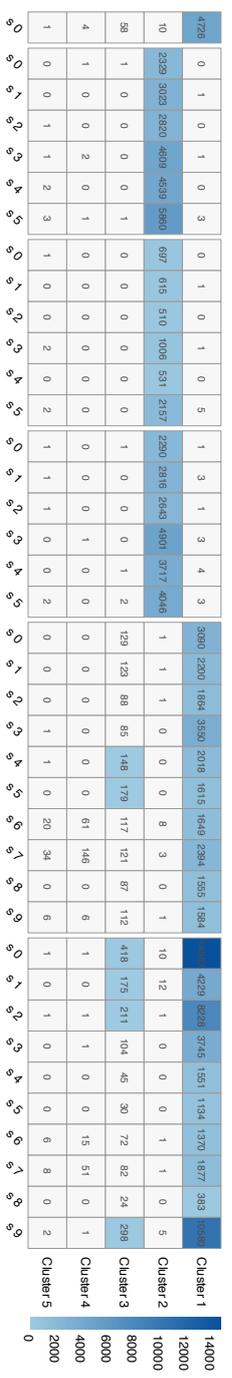


(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(c) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.



3.2.13. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS13

Um zu prüfen ob die Anwesenheit von $\alpha\beta$ T-Zellen möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen hat, wurden PBMCs in diesem Experiment subfraktioniert. Die Transdifferenzierung der Progenitoren wurde parallel im Kontext von unfraktionierten PBMCs, $CD3^-$ PBMCs und $CD3^+$ T-Zellen untersucht. Dazu wurde aus PBMCs eine positive Isolierung von $CD3^+$ Zellen (die negative Fraktion stellen die $CD3$ -depletierten PBMCs dar) durchgeführt. Überstände aller drei Zellfraktionen wurden in RB27-Medium für 6 Tage generiert. Genexpressionsprofile einer Auswahl Notch-Signaling-assoziiierter Gene (*adam10/17*, *dll1/3/4*, *jag1/2*, *nrarp* und *zbtb7a*) sowie *mica* und *micb* wurden ermittelt, um Hinweise zu erhalten, ob sich die drei Zellfraktionen eher ähnlich verhalten oder Unterschiede aufweisen. Zusätzlich wurde die Simulation der $V\delta 1^+CD4^+$ Klonzellen über MICA/B blockiert und ein starker (IMMU510) oder ein schwacher (IL-12/IL-18) TZR-Signaling-Bypass nachgeahmt. An Tag 7 des Experiments wurden alle Wells mit 5 μ l RB27-Medium, das IL-2 ($c_{end}=200 \mu$ l/ml) und IL-7 ($c_{end}=10$ ng/ml) enthielt, supplementiert.

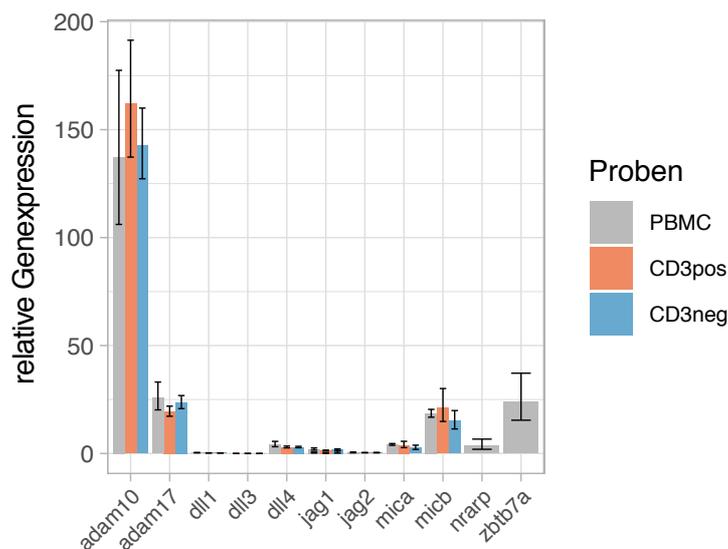


Abbildung 3.55.: Genexpression Ue13. Zu *rpl13a* relativierte Genexpression der Feederzellen des Experiments UeS13.

Wie in Abb. 3.55 dargestellt ähneln sich die relativen Genexpressionen der untersuchten Notch-Signaling-assoziierten Gene sowie *mica/b* der PBMCs, $CD3^-$ PBMCs und $CD3^+$ T-Zellen stark. Es ist keine klare Transdifferenzierung (Cluster 3 und 5, maximal an Tag 7) zu erkennen, die Zellzahlen in den Clustern 1 und 2 ($V\delta^{+/low} CD4^+$ Zellen) dominieren konstant (s. Abb. 3.56a). An Tag 7 enthalten die Proben s6/7/9 (alle mit Überständen unfraktionierter PBMC angesetzt) mit ca. 20% die höchsten Anteile $C\beta^+$ Zellen (Cluster 3+5), an Tag 14 wurden 21,1% in Probe s25 (Ue3-+aMIC+P3-) nachgewiesen. In Abb. 3.57a und Abb. 3.57c zeigen einige Proben an Tag 14 erhöhte Progenitorzahlen (s11/17/21/24), was auf eine hohe Proliferationsrate hinweist.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.17.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS13. Zellkulturüberstände wurden von autologen, nicht-adhärenenten PBMCs in RB27-Medium mit 5 mM Glukose und 1,5 mM Milchsäure durch 7-tägige Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27 mit 5 mM Glukose pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well, P/P3+/P3- - bestrahlte autologe (nicht-adhärenente) PBMCs/CD3⁺PBMCs/ CD3⁻PBMCs ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:Feederzellen ca. 1:20); Immu/ α MIC - IMMU510/ α MICA/B-Antikörper ($c_{\text{end}} = 5 \mu\text{g/ml}/1 \mu\text{g/ml}$), 12_18 - IL-12 und IL-18 (jeweils $c_{\text{end}}=10 \text{ ng/ml}$); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte, finales Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	VSK2-13	M	V	0, 7, 14
s 1	VSK2-13	M+P	V	7, 14
s 2	VSK2-13	M+P3+	V	7, 14
s 3	VSK2-13	M+P3-	V	7, 14
s 4	VSK2-13	UeP	V	7, 14
s 5	VSK2-13	UeP+Immu	V	7, 14
s 6	VSK2-13	UeP+Immu+P	V	7, 14
s 7	VSK2-13	UeP+P	V	7, 14
s 8	VSK2-13	UeP+ α MIC	V	7, 14
s 9	VSK2-13	UeP+ α MIC+P	V	7, 14
s 10	VSK2-13	UeP+12_18	V	7, 14
s 11	VSK2-13	UeP+12_18+P	V	7, 14
s 12	VSK2-13	Ue3+	V	7, 14
s 13	VSK2-13	Ue3+ +P3+	V	7, 14
s 14	VSK2-13	Ue3++Immu	V	7, 14
s 15	VSK2-13	Ue3++Immu+P3+	V	7, 14
s 16	VSK2-13	Ue3++ α MIC	V	7, 14
s 17	VSK2-13	Ue3++ α MIC+P3+	V	7, 14
s 18	VSK2-13	Ue3++12_18	V	7, 14
s 19	VSK2-13	Ue3++12_18+P3+	V	7, 14
s 20	VSK2-13	Ue3-	V	7, 14
s 21	VSK2-13	Ue3-+Immu	V	7, 14
s 22	VSK2-13	Ue3-+Immu+P3-	V	7, 14
s 23	VSK2-13	Ue3-+P3-	V	7, 14
s 24	VSK2-13	Ue3-+ α MIC	V	7, 14
s 25	VSK2-13	Ue3-+ α MIC+P3-	V	7, 14
s 26	VSK2-13	Ue3-+12_18	V	7, 14
s 27	VSK2-13	Ue3-+12_18+P3-	V	7, 14

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

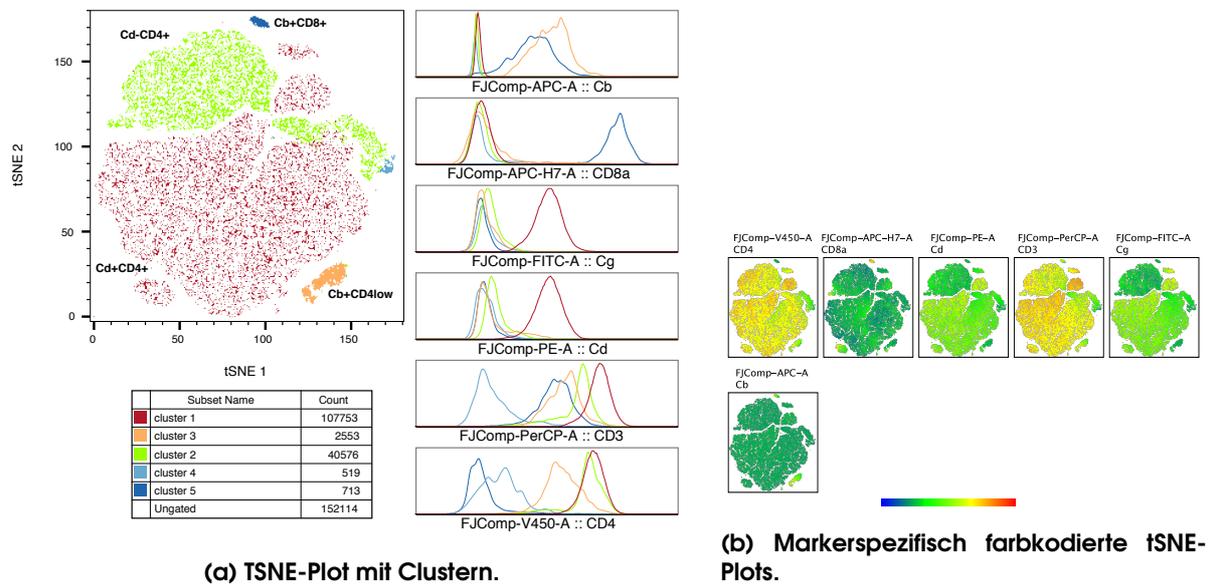
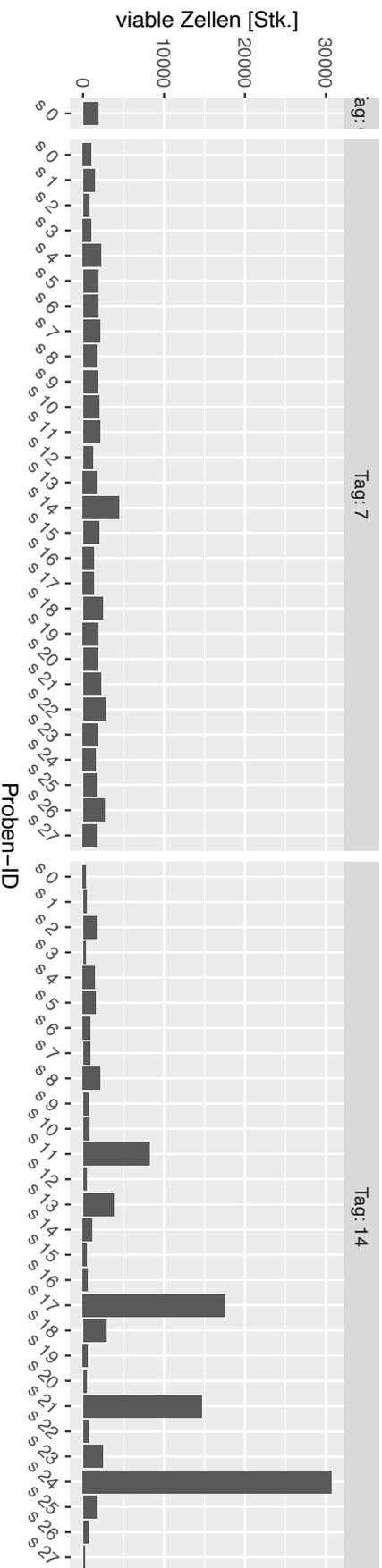
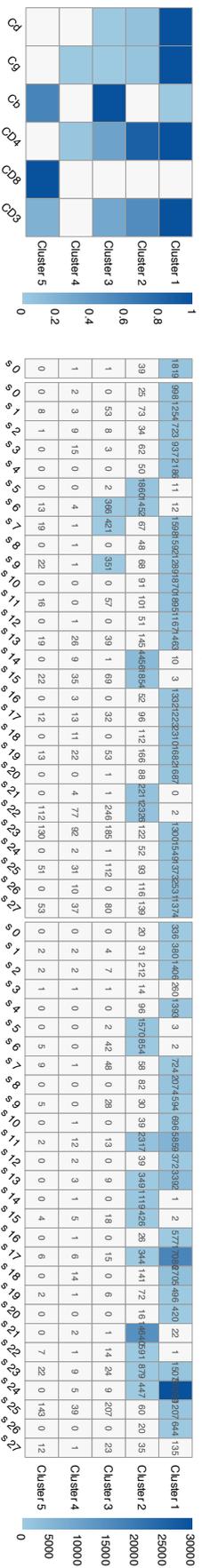


Abbildung 3.56.: TSNE-Analyse des Experiments Ues13.



(a) Proben-spezifische Zellviabilität über die Zeit.



(c) Proben-spezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern..

(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

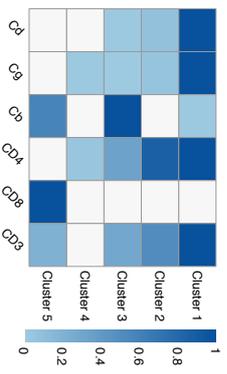


Abbildung 3.57.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues13.

3.2.14. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS14

Um zu überprüfen, ob die Transdifferenzierung durch eine in den Zellkulturüberständen enthaltenen Komponente ermöglicht wird, wurden Überstände von zwei Spendern über Ultra-4-Zentrifugationssäulen 80-fach aufkonzentriert. Jedes 96-Well (siehe Tab. 3.18, UeC) enthielt, wenn angegeben, 1/12 dieses Konzentrats was 4% des Gesamtvolumens des Ansatzes entspricht. Um den Einfluss von Notch-Signalen zu untersuchen wurde DLL4-vermitteltes Notch-Signaling mit DLL4-blockierenden Antikörpern unterbunden, indem die Feederzellen 30 Minuten bei 37 ° vorinkubiert wurden. An Tag 14 wurden alle Wells mit 10 µl RB27-Medium, IL-2 ($c_{\text{end}}=200 \mu\text{l/ml}$) und IL-7 ($c_{\text{end}}=10 \text{ ng/ml}$) supplementiert. Die tSNE-Analysen der beiden Klone wurde unabhängig voneinander durchgeführt, weil ein Unterschied in der basalen Markerexpression der V δ 1⁺CD4⁺T-Zellklone das Clustering negativ beeinträchtigen würde.

Tabelle 3.18.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS14 für die beiden Klone VSK2-13 und HHK1-1. Zellkulturüberstände autologer PBMCs wurden in RB27-Medium mit 5 mM Glukose und 1,5 mM Milchsäure nach 5-tägiger Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 µl RB27 mit 5 mM Glukose pro Well, Ue - 100 µl Überstände pro Well, P - bestrahlte autologe nicht adhärenz PBMCs ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:P ca. 1:20), UeC - 80x aus initial 4 ml aufkonzentrierte Zellkulturüberstände; AB - α DLL4-Antikörper ($c_{\text{end}} = 2 \mu\text{g/ml}$); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte, finales Volumen von 100 µl pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	Klon	M	V	0, 3, 7, 13
s 1	-	M+P	V	3, 7, 13
s 2	Klon	Ue	V	3, 7, 13
s 3	Klon	Ue+AB	V	3, 7, 13
s 4	Klon	Ue+P	V	3, 7, 13
s 5	Klon	Ue+P+AB	V	3, 7, 13
s 6	Klon	UeC	V	3, 7, 13
s 7	Klon	UeC+AB	V	3, 7, 13
s 8	Klon	UeC+P	V	3, 7, 13
s 9	Klon	UeC+P+AB	V	3, 7, 13

3.2.14.1. VSK2-13

Bei Klon VSK2-13 sind möglicherweise transdifferenzierter Zellen (Cluster 3 und 4) an den Tagen 3, 7 und 9 sichtbar: bei Proben s4 & s5 ca. 1/4 aller viablen Zellen, bei Proben s8 und s9 zwischen 9–17% aller viablen Zellen (s. Abb. 3.59c). Dabei waren transdifferenzierte Zellen auf Proben beschränkt, die Feederzellen enthielten (s4/5/8/9). Probe s1, die nur Feederzellen enthielt, wies wenige viable Zellen auf, enthielt aber auch konstant Ereignisse in der beiden Transdifferenzierungs-spezifischen Clustern mit ähnlichem „Cluster 3:Cluster 4“-Verhältnis (CD4:CD8). An Tag 13 hatte die Probe s6, die nur mit aufkonzentrierten Überständen angesetzt worden war, die höchste Anzahl viabler Zellen inkl. ca. 6% möglicherweise transdifferenzierter Zellen.

3. ERGEBNISSE

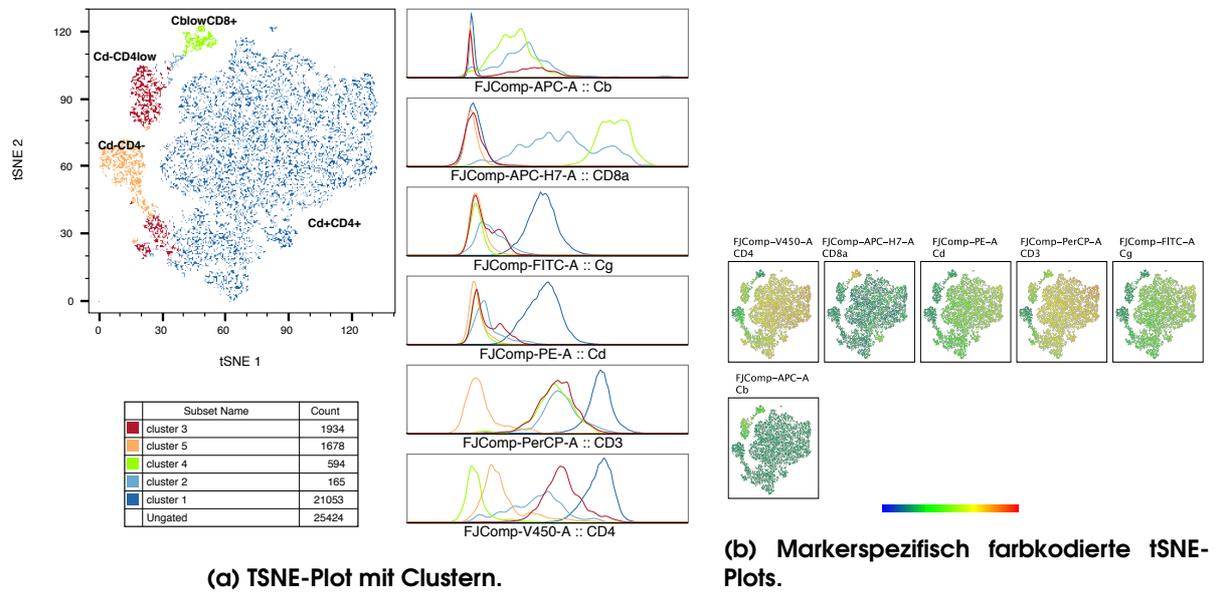
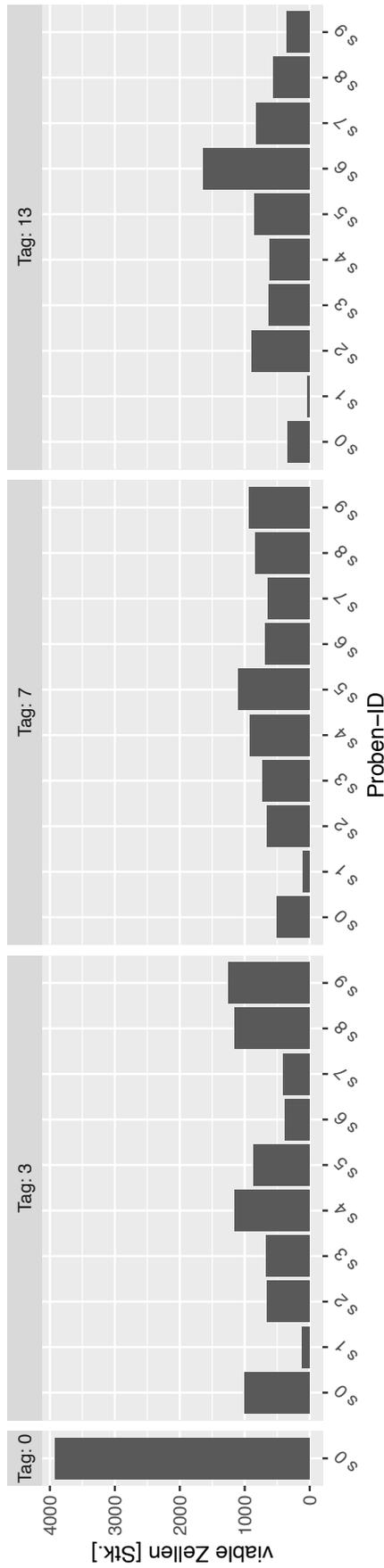
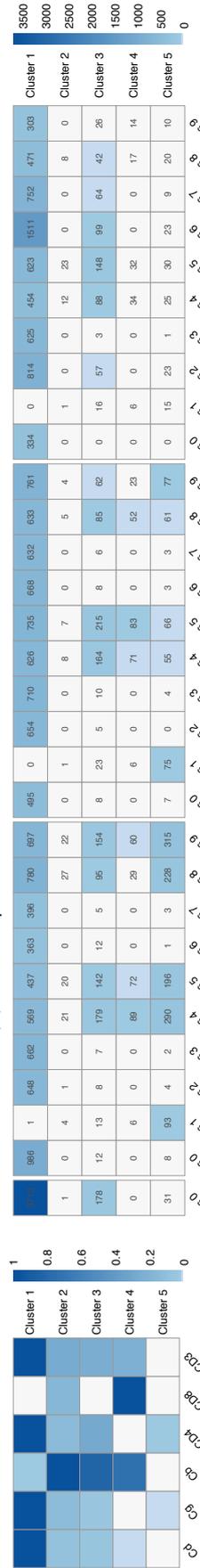


Abbildung 3.58.: TSNE-Analyse des Experiments Ues14 mit Klon VSK2-13.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-signalmediane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.59.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues14 mit Klon VSK2-13.

3. ERGEBNISSE

3.2.14.2. HHK1-1

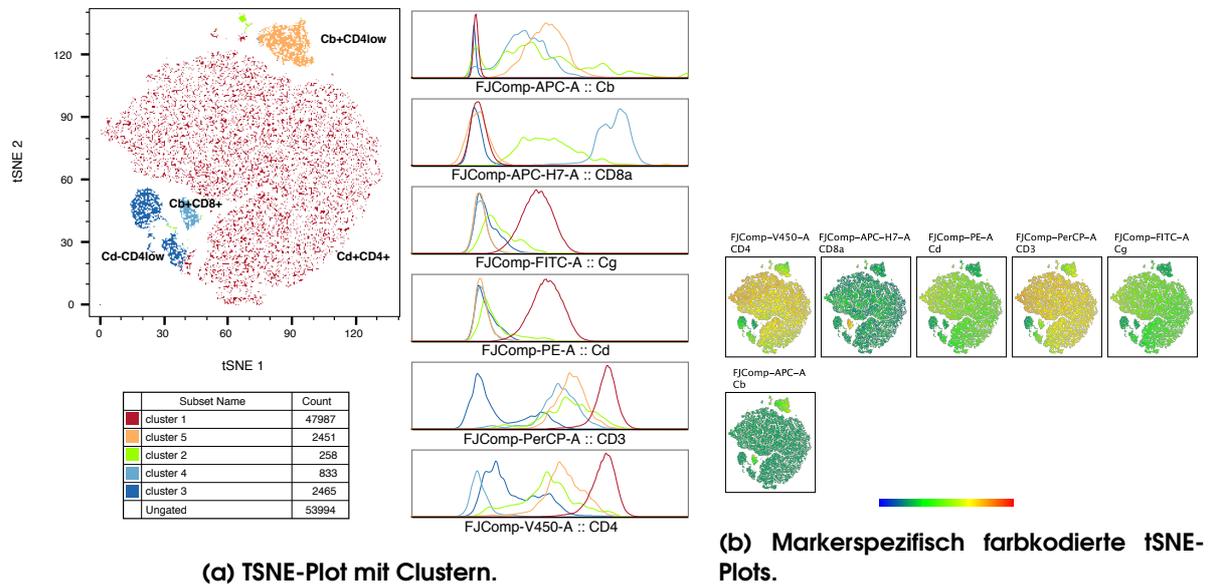
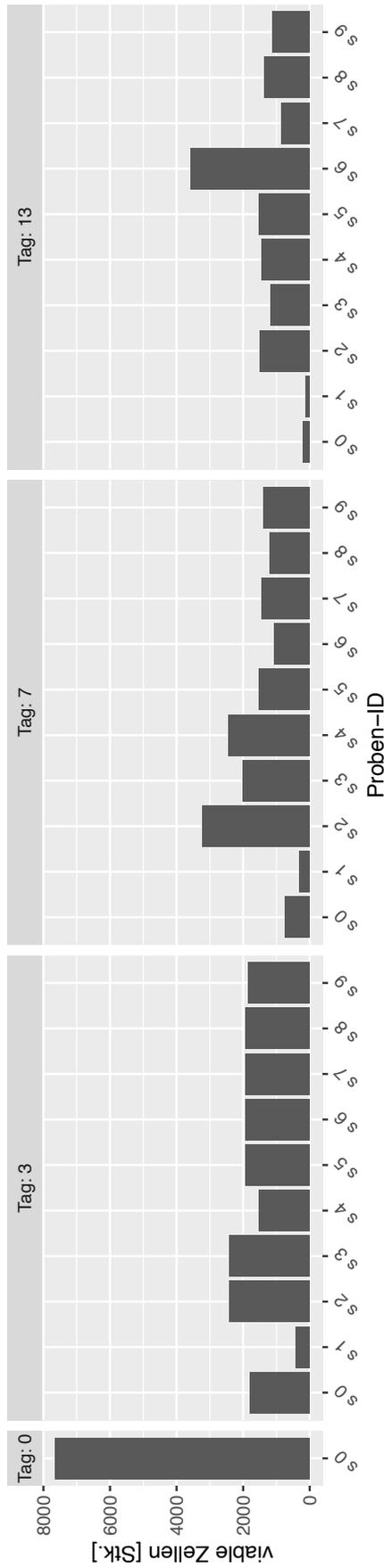
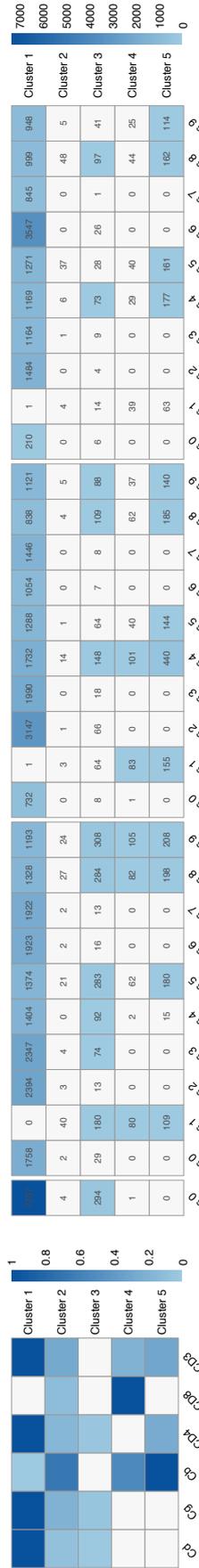


Abbildung 3.60.: TSNE-Analyse des Experiments UeS14 mit Klon HHK1-1.

Klon HHK1-1 zeigt ein ähnliches Verhalten wie Klon VSK2-13, obwohl die Viabilität des Klons HHK1-1 im Vergleich zu Klon VSK2-13 insgesamt höher war (siehe oben).



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-signalmediane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.61.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS14 mit Klon HHK1-1.

3. ERGEBNISSE

3.2.15. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS15

In Experiment UeS15 sollte die Fähigkeit von unstimulierten $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klonen zur Transdifferenzierung und der Einfluss einer möglicherweise unentbehrlichen polyklonalen $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Umgebung untersucht werden. Um nachzuweisen, ob die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen durch die Stimulation des TZR während der positiven Isolierung mittels MACS beeinflusst wird, wurden nicht stimulierte (untouched) $V\delta 1^+$ T-Zellen mittels StemCell Kit negativ isoliert. Basierend auf der Hypothese, dass $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen aus pan $V\delta 1^+$ T-Zellen entstehen könnten, wurde das Herauswachsen von $CD4^+$ Zellen aus $CD4^-$ pan $V\delta 1^+$ T-Zellen untersucht. Zusätzlich zu den experimentellen Settings im Standardzytokinmilieu der UeS-Experimente (niedrige IL-2- und IL-7-Konzentrationen) wurde die Rate der Transdifferenzierung des $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellklons im Kontext der akuten (ol) und sterilen (sl) Entzündung getestet. Die sterile Entzündung sollte dabei, wie Eingangs beschrieben, das thymische Zytokin-Milieu imitieren.

Tabelle 3.19.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS15. Zellkulturüberstände autologer $V\delta$ -PBMCs wurden in RB27-Medium mit 5 mM Glukose, 4% B27-Reagenz und 1,5 mM Milchsäure nach 3-tägiger Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt, falls nicht anders beschrieben, ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen/pan $V\delta 1^+$ T-Zellen. M - 100 μ l RB27 mit 5 mM Glukose pro Well, Ue - 100 μ l Überstände pro Well, Z - bestrahlte autologe $V\delta$ -PBMCs ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:Z ca. 1:20); ol - overt/akute Inflammation (Endkonzentration: 10 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml IL-6, 100 ng/ml sIL-6R, 10 ng/ml IL-12, 10 ng/ml IL-18), sl - sterile Inflammation (15 pg/ml IL-1 α , 10 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml IL-6, 500 pg/ml TNF α), allo pan $V\delta 1^+$ - allogene zu 84,3 % reine pan $V\delta 1^+$ T-Zellen die wenige $C\beta^+CD3^+$ Zellen enthalten; V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte, finales Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	HHK1-1	NK	V	0, 7, 10
s 1	HHK1-1	Ue	V	7, 10
s 2	HHK1-1	UeS+Z	V	7, 10
s 3	pan $V\delta 1^+$ untouched	NK	V	0, 7, 10
s 4	pan $V\delta 1^+$ untouched	UeS	V	7, 10
s 5	pan $V\delta 1^+$ untouched	UeS+Z	V	7, 10
s 6	pan $V\delta 1^+$ $CD4^-$	NK	V	7, 10
s 7	pan $V\delta 1^+$ $CD4^-$	UeS	V	7, 10
s 8	pan $V\delta 1^+$ $CD4^-$	UeS+Z	V	7, 10
s 9	HHK1-1	Ue+Z+ol	V	7, 10
s 10	HHK1-1	Ue+Z+sl	V	7, 10
s 11	HHK1-1	(Ue+Z) _{allo pan$V\delta 1^+$}	V	7, 10

In diesem Experiment wurde probenübergreifend eine hohe Viabilität, aber keine $C\beta^+$ Zellen nachgewiesen (Abb. 3.62a und 3.63c). In Abb. 3.63c kann man deutlich die drei untersuchten Progenitorproben unterscheiden, wobei die reine Klonprobe (s0) konstant die höchste Anzahl viabler Zellen aufweist und Zellen in den Clustern 1/3/5 enthält. Im Allgemeinen ist jedoch keine Verschiebung der Clusterschwerpunkte sichtbar, was auf fehlende Transdifferenzierung hinweist. Die Proben mit pan $V\delta 1^+$ T-Zellen enthal-

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

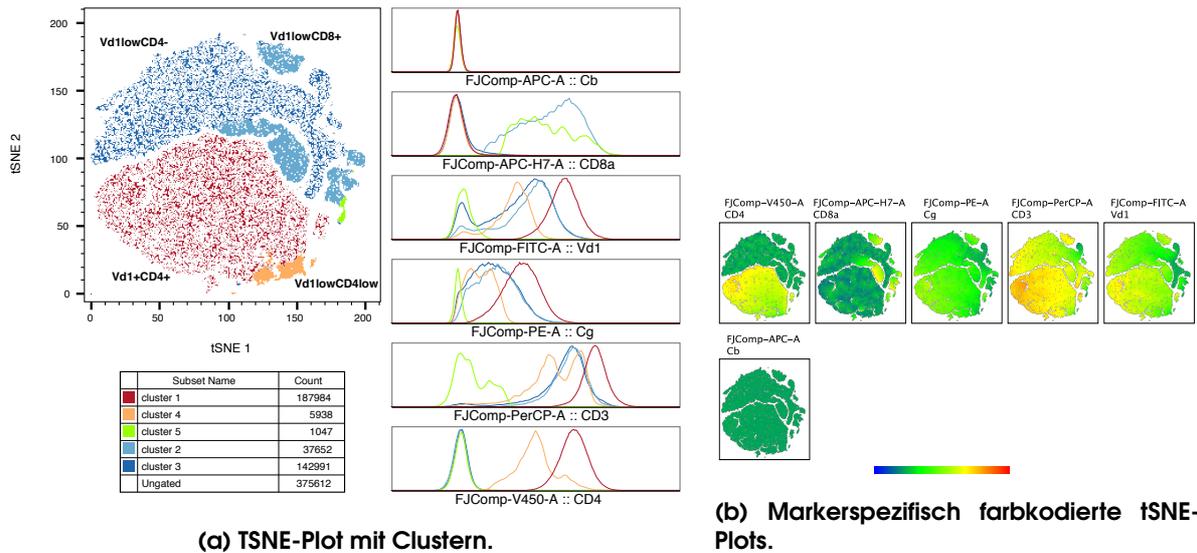
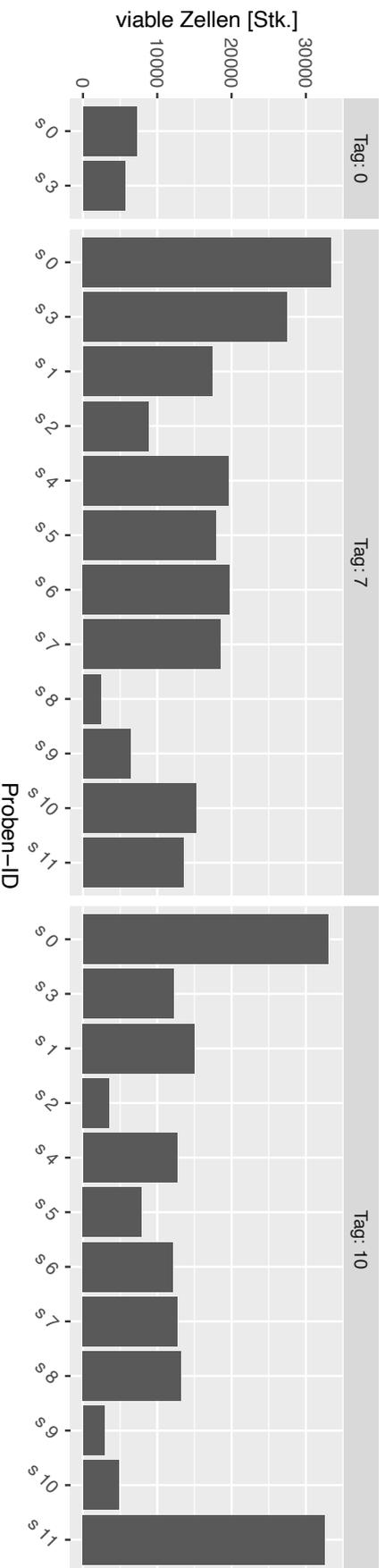
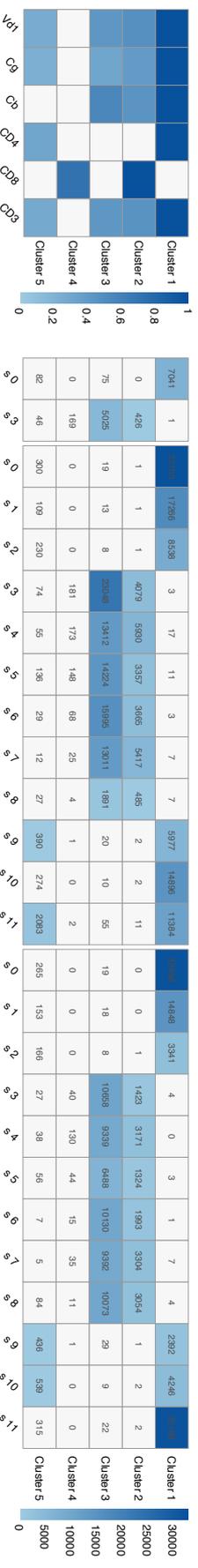


Abbildung 3.62.: TSNE-Analyse des Experiments UeS15.

ten nur sehr wenige Zellen mit progenitorspezifischen Markersignalen (max. 1,4% der viablen Zellen liegen in Cluster1+5). CD8⁺ und DN dominieren mit über 96,2% die Ansätze s3-8 mit panVδ1⁺T-Zellen (Cluster 2+3). Die akute/offene Entzündung (s9) war im Vergleich zur Probe s2, ohne inflammatorischen Zytokinmix, nicht förderlich für die Proliferation und/oder Transdifferenzierung. Auch der Ansatz der sterilen Entzündung s10 unterschied sich an Tag 10 nicht wesentlich von Probe 9. Events in Cluster 5, die Zellen mit einer geringen Expression der progenitorspezifischen Marker entsprechen, sind in allen HHK1-1-Proben vorhanden (s0-3 und s9-11 in Abb. 3.63c).



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(c) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

Abbildung 3.63.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues15.

3.2.16. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS16

Hier sollten im autologen Setting die Einflüsse von CD4⁺ T-Zellen und CD4-depletierter PBMCs, die zur Überstandserzeugung verwendet wurden, auf die Transdifferenzierung analysiert werden.

Tabelle 3.20.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS16. Zellkulturüberstände autologer PBMCs, CD4⁺ T-Zellen und CD4-depletierter PBMCs wurden in RB27-Medium mit 5 mM Glukose und 1,5 mM Milchsäure nach 4-tägiger Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 µl RB27-Medium pro Well, Ue - 100 µl Zellkulturüberstände pro Well von P/CD4⁺/CD4-depletierte PBMC-Zellen; P/CD4⁺/CD4-depPBMCs - bestrahlte autologe PBMCs/CD4⁺/CD4-abgereicherte PBMCs als Feederzellen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:Feederzellen ca. 1:20); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte bei einem finalen Volumen von 100 µl pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	HHK1-1	M	V	0, 3, 6, 10
s 1	HHK1-1	UeCD4 ⁺	V	3, 6, 10
s 2	HHK1-1	(Ue+Z)CD4 ⁺	V	3, 6, 10
s 3	HHK1-1	UeCD4-depPBMCs	V	3, 6, 10
s 4	HHK1-1	(Ue+Z)CD4-depPBMCs	V	3, 6, 10
s 5	HHK1-1	UeP	V	3, 6, 10
s 6	HHK1-1	Ue+P	V	3, 6, 10

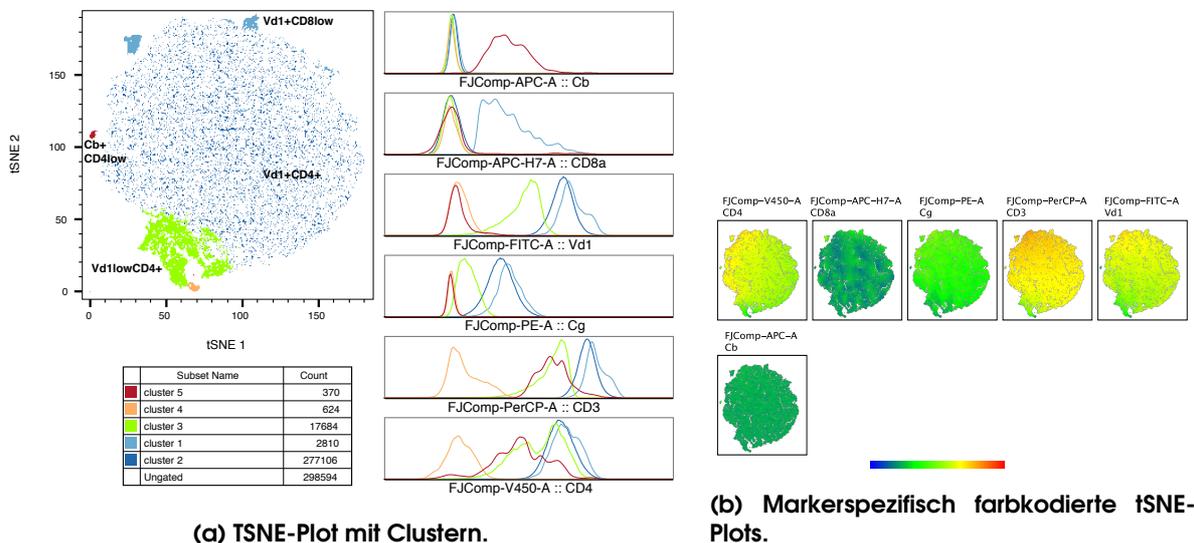


Abbildung 3.64.: tSNE-Analyse des Experiments UeS16.

Die geringe Anzahl Cβ⁺Zellen (Cluster 5) an den Tagen 3 und 6 in den Proben mit Feederzellen (s2/4/6), wird an Tag 10 nicht mehr nachgewiesen, obwohl die Anzahl viable Zellen bis Tag 10 kontinuierlich zunimmt (Abb. 3.65c). Die fehlende Clusterbildung im tSNE-Plot und die Expressionsprofile der Marker deuten demnach eher auf eine Herunterregulierung der Vd1⁺CD4⁺ progenitorspezifischen Marker hin als auf eine Transdifferenzierung. Für eine höhere Zellviabilität und Proliferation waren die Überstän-

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

de von CD4⁺ oder CD4-depletierten PBMCs von Vorteil (s. Proben s1-4, Tag 10, Abb. 3.65c).

3. ERGEBNISSE

3.2.17. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS17

Da die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente nicht vollständig ausschlossen, dass die Assoziation mit anderen V δ 1⁺T-Zellsubtypen für die Transdifferenzierung notwendig ist, wurde der Prozess mit einem isolierten V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klon, einem Mix mehrerer V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone (Klonmix) und einer mit 2% Klonmix gespikten CD4⁻panV δ 1⁺T-Zell-Probe in der autologen und allogenen Einstellung untersucht. Zum Prüfen, ob ein höherer Nährstoffsupport die Transdifferenzierung begünstigt wurde für den Klonmix und die CD4⁻panV δ 1⁺T-Zell-Probe (inkl. Klonmix) ein Ansatz im autologen Setting mit 150 μ l einer 1:1-Mischung aus autologen Zellkulturüberständen und RB27 angesetzt. Nach 11 Tagen wurde jedes Well, je nach Vertiefungsvolumen, mit 5 oder 10 μ l RB27 inkl. IL-2 (c_{end} =200 μ l/ml) und IL-7 (c_{end} =10 ng/ml) supplementiert.

Tabelle 3.21.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS17. Zellkulturüberstände autologer oder allogener PBMCs und der adhärennten PBMCs-Fraktion wurden in RB27-Medium mit 5mM Glukose und 1,5mM Milchsäure und 7-tägiger Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit 50 μ l RB27 inkl. IL-2 und IL-7, zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7, supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen bzw. insgesamt $7,5 \cdot 10^3$ Zellen der Mischung mit 2% Klonmix in CD4⁻panV δ 1⁺T-Zellen. M - 100 μ l RB27-Medium pro Well, Ue - 100 μ l Zellkulturüberstände pro Well; allo - allogene, auto - autolog, P/A - mit 80 Gy bestrahlte PBMCs/adhärennte Fraktion der PBMCs als Feederzellen ($1,5 \cdot 10^5$ PBMCs/Well/ $7,5 \cdot 10^3$ A/Well = Klonzellen:PBMCs ca. 1:20/Klonzellen:Adhärennte PBMC-Fraktion ca. 1:1); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte bei einem finalen Volumen von 160 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 2	Vd1 ⁺ CD4 ⁻	-	V	0
s 5	Vd1 ⁺ CD4 ⁻ + Klonmix	auto Ue + M (1:1)	V	4, 8, 14, 22
s 6	Vd1 ⁺ CD4 ⁻ + Klonmix	auto Ue	V	4, 8, 14, 22
s 20	Vd1 ⁺ CD4 ⁻ + Klonmix	auto Ue+P	V	8, 14, 22
s 11	Vd1 ⁺ CD4 ⁻ + Klonmix	M	V	4, 8, 14, 22, 29, 35
s 12	Vd1 ⁺ CD4 ⁻ + Klonmix	allo Ue	V	4, 8, 14, 22, 29, 35
s 17	Vd1 ⁺ CD4 ⁻ + Klonmix	allo Ue+A	V	8, 14, 22
s 18	Vd1 ⁺ CD4 ⁻ + Klonmix	allo Ue+P	V	8, 14, 22
s 3	Klonmix	auto UeS + M (1:1)	V	0, 4, 8, 14, 22
s 4	Klonmix	auto Ue	V	4, 8, 14, 22
s 19	Klonmix	auto Ue+P	V	8, 14, 22
s 9	Klonmix	M	V	4, 8, 14, 22, 29, 35
s 10	Klonmix	allo Ue	V	4, 8, 14, 22, 29, 35
s 15	Klonmix	allo Ue+A	V	8, 14, 22
s 16	Klonmix	allo Ue+P	V	8, 14, 22
s 7	HHK1-1	M	V	0, 4, 8, 14, 22
s 8	HHK1-1	allo Ue	V	4, 8, 14, 22
s 13	HHK1-1	allo Ue+A	V	8, 14, 22
s 14	HHK1-1	allo Ue+P	V	8, 14, 22

Da im gesamten Experiment (s. Abb. Abb. 3.66) keine C β ⁺Zellen nachgewiesen wurden, hat keine Transdifferenzierung der Prognitoren in α β T-Zellen stattgefunden. Dies wird durch die Dominanz des Clusters 2 (Progenitor) aller Progenitor-Proben (s. Abb. 3.67c) unterstützt. Im Gegensatz zum Klonmix und den Proben, die mit CD4⁻panV δ 1⁺T-

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

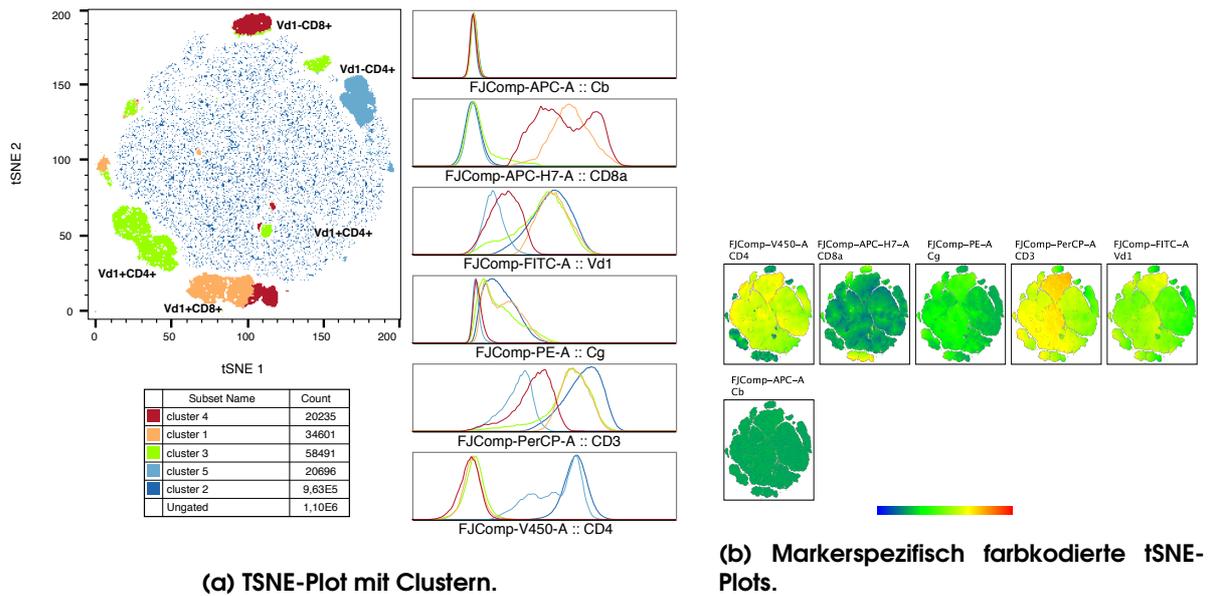
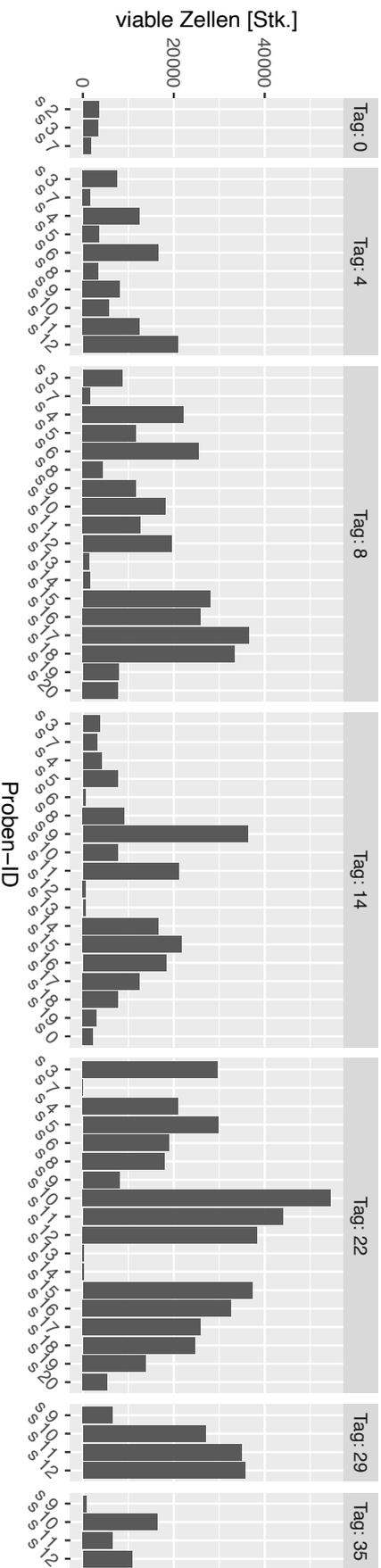
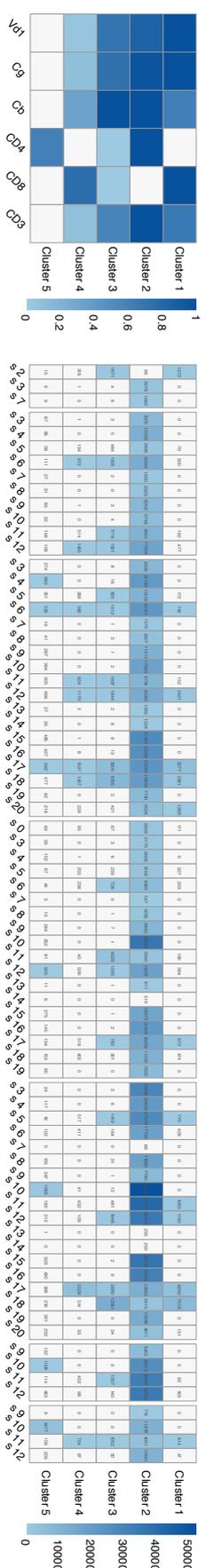


Abbildung 3.66.: TSNE-Analyse des Experiments UeS17.

Zellen ergänzt wurden, zeigen die reinen Klon-Proben (HHK1-1 s7/13/14) die wenigsten viablen Zellen. Nur Probe s8 (Klon mit allogenen Überständen) wies eine höhere Viabilität auf. Erhöhte Zellzahlen innerhalb der Cluster 3 ($V\delta 1^+DN$) und 4 ($V\delta 1^+CD8^+$) über alle Zeitpunkte hinweg waren charakteristisch für die Proben, die $CD4^+panV\delta 1^+T$ -Zellen enthielten (s2/5/6/11/12/17/18/20 in Abb. 3.67c).



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

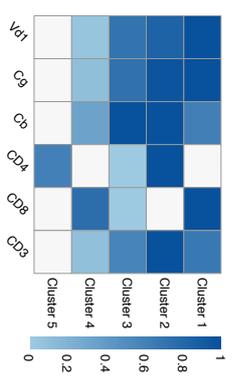


Abbildung 3.67.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues17.

3.2.18. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS18

Die Standardkultur, bei der die Klone durch hohe IL-2- und IL-7-Spiegel zusätzlich zu PHA stimuliert werden, ist optimal für die *ex vivo* Kultur von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Progenitoren und ermöglicht die Proliferation und das Überleben dieses primären Zelltyps über viele Monate. Weil in der vorliegenden Arbeit unter Standardkulturbedingungen keine Transdifferenzierung beobachtet wurde, wurde der Transdifferenzierungsprozess in den UeS-Experimenten im zytokinarmen Milieu ohne PHA untersucht. Im Rahmen des Experiments UeS18 wurden die Folgen eines Zytokinabfalls, der Einfluss der Glukosekonzentration im RB27-Medium während der Präkonditionierungsphase und der pan $V\delta 1^+$ T-Zell- bzw. MS-5-Kontext (murines Stroma) untersucht. Zusätzlich wurde ein Teil des Klons in der Medium-only-Probe einer Zytokinmischung ausgesetzt, die eine sterile Entzündung imitiert. Nach dem Pipettieren aller Komponenten in die 96-Well-Platte sorgte ein kurzer Zentrifugationsschritt bei 300 x g, für 5 min für das richtige Pelletieren der Zellen (s. 3D-Kontext) in den Konus am V-Boden.

Tabelle 3.22.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS18 für beide Spender. Zellkulturüberstände von PBMCs wurden in RB27-Medium mit 5 mM oder 20 mM Glukose durch 7-tägige Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27-Medium mit 5 mM Glukose pro Well, 5/20 - Molarität der Glukose (mM), Ue - 100 μ l Zellkulturüberstände pro Well; P/MS-5 - frisch isolierte bestrahlte PBMCs des Donors 1/2 oder MS-5-Zellen aus DMEM-Kultur als *feeder*-Zellen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:*feeder* ca. 1:20), sl - sterile Inflammation (15 pg/ml IL-1 α , 10 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml IL-6, 500 pg/ml TNF α); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte bei einem finalen Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 1	Klonmix	M5	V	0, 7, 14, 20, 28
s 2	Klonmix	UeS5	V	7, 14, 20, 28
s 3	Klonmix	Ue+P5	V	7, 14, 20, 28
s 4	Klonmix	UeS+MS-5_5	V	3, 7, 14, 20, 28
s 5	Klonmix	M20	V	7
s 6	Klonmix	UeS20	V	7, 14, 20, 28
s 7	Klonmix	UeS+P20	V	7, 14, 20, 28
s 8	Klonmix	UeS+MS-5_20	V	7, 14, 20, 28
s 9	Klonmix	M+sl5	V	14, 20, 28
s 10	pan $V\delta 1^+$ Donor 1	M	V	0, 7, 14, 20, 28
s 11	pan $V\delta 1^+$ Donor 1	M+MS-5	V	7, 14, 20, 28
s 12	pan $V\delta 1^+$ Donor 2	M	V	0, 7, 14, 20, 28
s 13	pan $V\delta 1^+$ Donor 2	M+MS-5	V	7, 14, 20, 28

3.2.18.1. Klonmix

In Abb. 3.69c ist zu erkennen, dass an Tag 14 einige $C\beta^+CD8^+$ Zellen (Cluster 5) in den Proben s2 und s6 (nur Überstände), sowie an Tag 20 in Probe s6 (UeS20) und an Tag 28 in Probe s7 (UeS+P20) nachweisbar waren. Das ähnliche Verhalten der Proben s2 (UeS5)

3. ERGEBNISSE

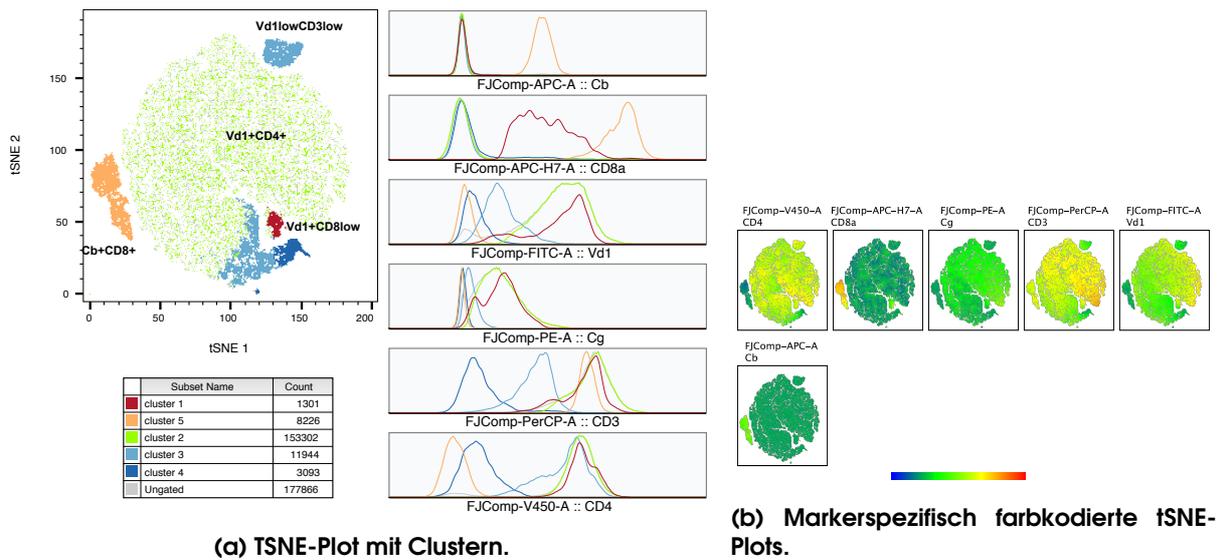
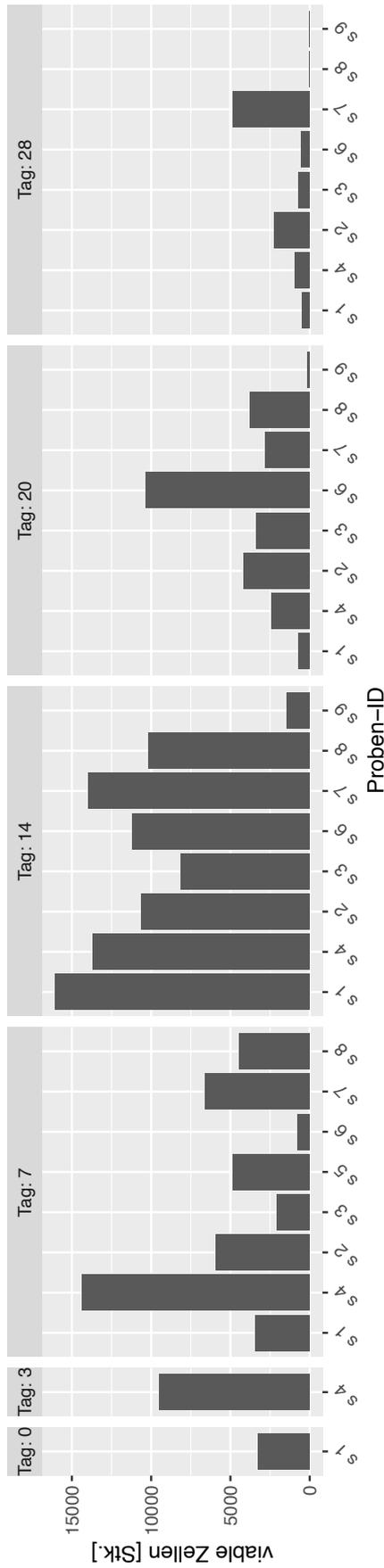
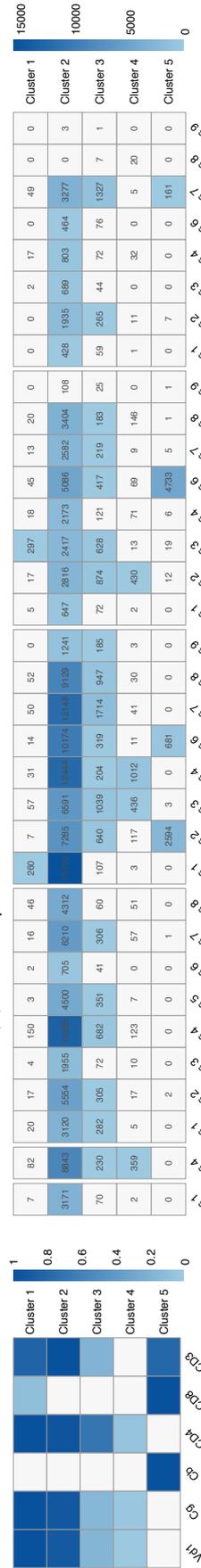


Abbildung 3.68.: tSNE-Analyse des Experiments UeS18 eines Klonmixes.

und s6 (UeS20) weist auf die Unabhängigkeit der Transdifferenzierung von der initialen Glukosekonzentration des RB27-Mediums hin. Die Exposition mit Zytokinen der sterilen Inflammation wirkt sich negativ auf die Viabilität der Zellen aus (s9 in Abb. 3.69a).



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-gnalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.69.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments UeS18 mit einem Klonmix.

3. ERGEBNISSE

3.2.18.2. Donor 1

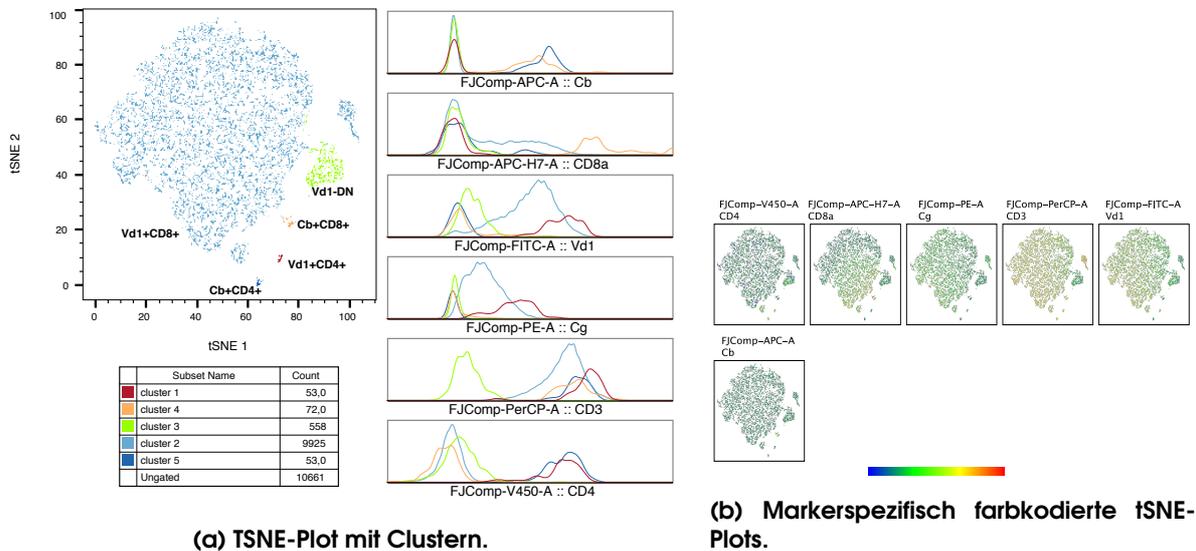
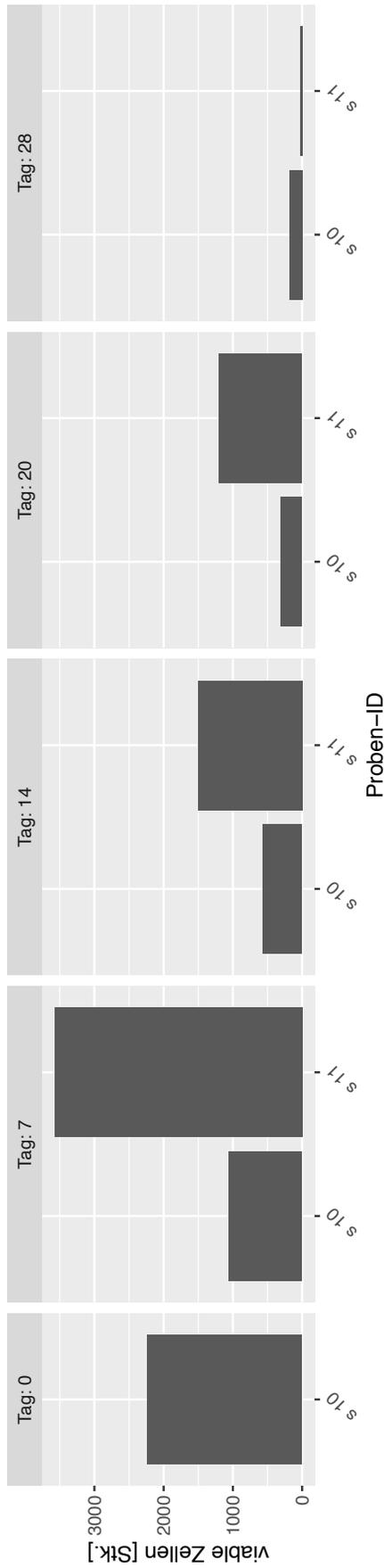


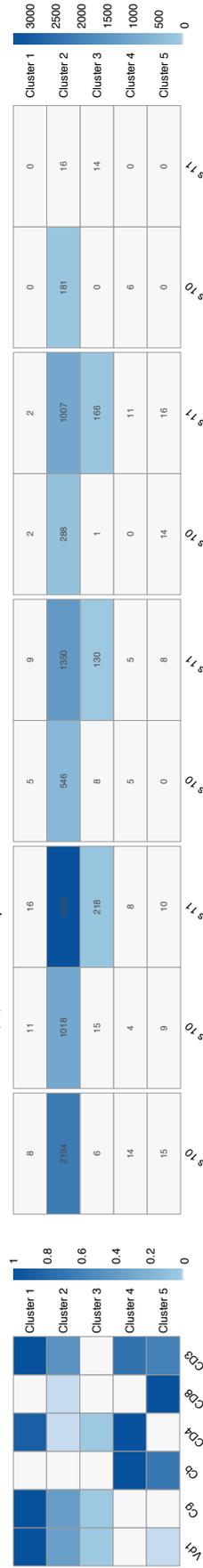
Abbildung 3.70.: TSNE-Analyse des Experiments UeS18 Donor 1.

Die Probe mit MS-5-Support (s11) ist konstant positiv für Ereignisse in Cluster 3 (reduzierte Signalstärke der $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitor marker, siehe Abb. 3.70). Interessanterweise lag die Anzahl der $C\beta^+$ Zellen (Cluster 4 und 5, siehe Abb. 3.69) über die Zeit konstant unter 4,6%, eine Transdifferenzierung in $\alpha\beta T$ -Zellen fand demnach höchstwahrscheinlich nicht statt. Die Anwesenheit von MS-5-Zellen verursachte allerdings eine konstant höhere Anzahl viabler pan $V\delta 1^+$ Zellen (s11) im Gegensatz zur Mock-Kontrollprobe s10.

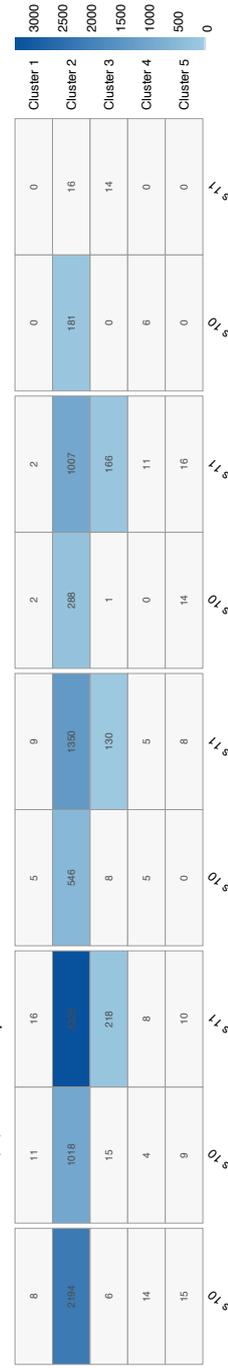
3.2. Transdifferenzierungsexperimente



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorspezifischen Rezeptorspezifischen Receptor-specific cluster medians.



(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.7.1.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues18 Donor 1.

3. ERGEBNISSE

3.2.18.3. Donor 2

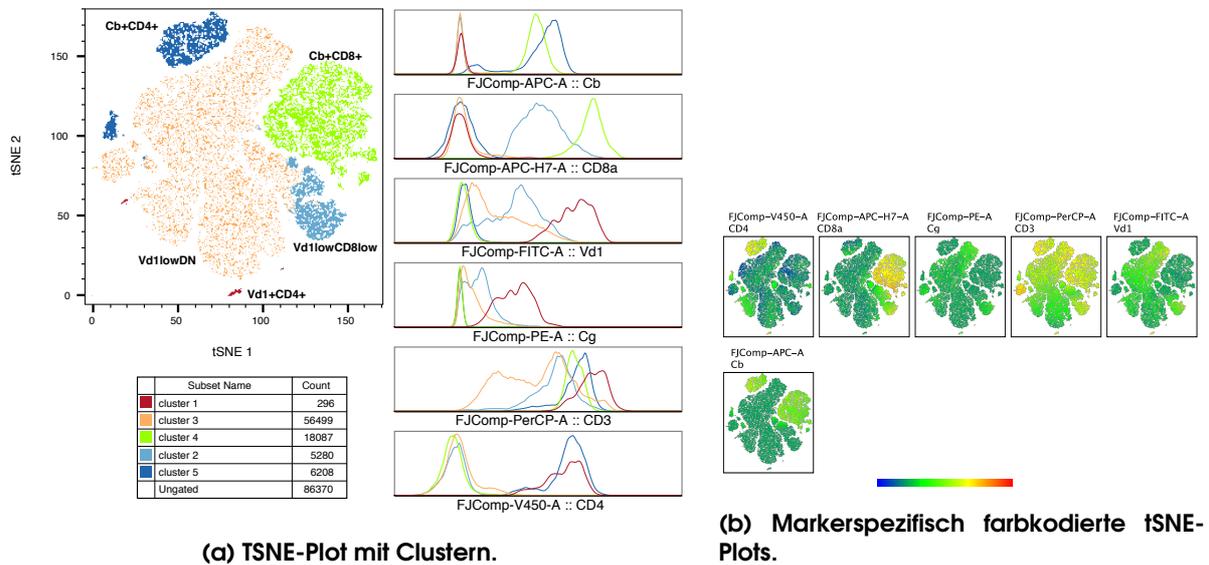
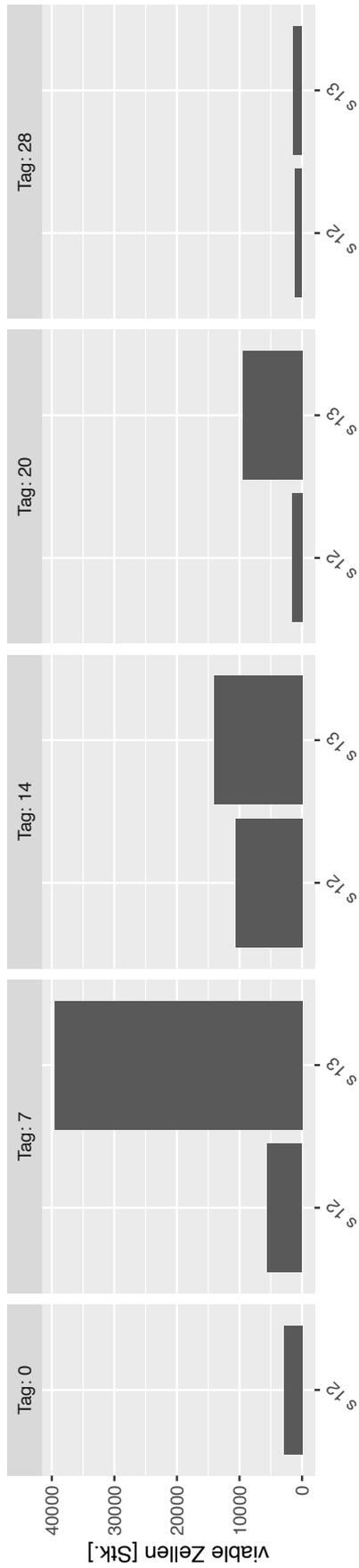


Abbildung 3.72.: TSNE-Analyse des Experiments UeS18 Donor 2.

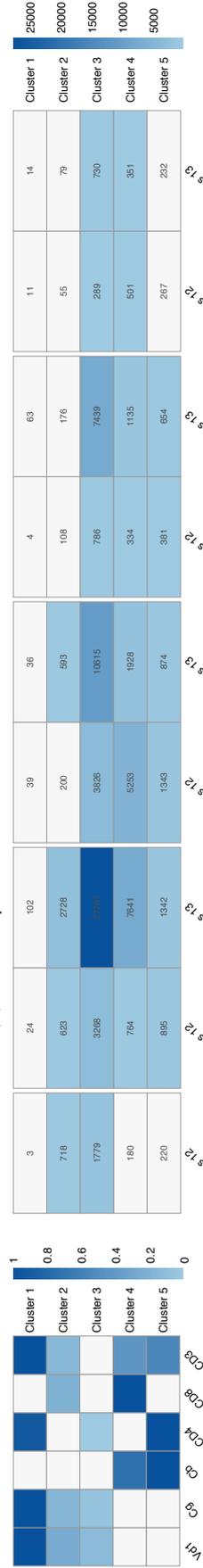
Auf den panV δ 1⁺T-Zellen des zweiten Spenders (Spender 2) ist insgesamt eine niedrige Signalstärke des Markers V δ 1 erkennbar (s. Cluster 2 und 3 an Tag 0, Abb. 3.72). Die Anzahl der C β ⁺Zellen nahm über die Zeit zu (Cluster 4 und 5, siehe Abb. 3.73) und lag bei der Proben ohne MS-5-Zellen (s12) konstant höher (1,3/3,1/2,3/1,7-fach an Tag 7/14/20/28, Abb. 3.73c). Weil die panV δ 1⁺T-Zellen dieses Spenders jedoch auch bereits an Tag 0 C β ⁺Zellen enthielten, ist davon auszugehen, dass die Transdifferenzierung bereits vorab initiiert worden war. In Bezug auf die Viabilität zeigten die Zellen dieses Spenders dasselbe Verhalten wie die von Spender 1, d. h. mehr viable Zellen in der mit MS-5-Zellen ergänzten Probe s13.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente



Proben-ID

(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

Cluster	s12	s13
Cluster 1	3	24
Cluster 2	718	623
Cluster 3	1779	3266
Cluster 4	180	764
Cluster 5	220	895
	102	36
	2728	593
	10015	7439
	7641	1928
	1342	874
	39	200
	3266	5255
	1343	1343
	4	108
	766	7439
	334	1135
	381	654
	11	63
	55	176
	289	730
	501	351
	267	232

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.73.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues18 Donor 2.

3. ERGEBNISSE

3.2.19. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS19

Basierend auf den Angaben von Seet und Kollegen sind (murine) Stromazellen ein essentieller Bestandteil der *ex vivo* T-Zell-Differenzierungsumgebung (112). Deshalb wurde der Effekt der murinen Stromazelllinie MS-5 und ihres Sekretoms in RB27-Medium erneut im Kontext der Transdifferenzierung von V δ 1⁺CD4⁺ untersucht. Weil MS-5-Zellen in RB27-Nährmedium eine Beeinträchtigung der Oberflächenadhäsion und verringerte Proliferationsraten zeigten, wurden zusätzlich MS-5-Zellen verwendet, die bis zum Tag 0 des Experiments unbeeinträchtigt/exponentiell in (nährstoffreichem) DMEM-Medium heranwachsen. Um einen engen Kontakt von MS-5-Zellen und den V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen sicherzustellen, wurde der Ansatz kurz zentrifugiert (bei 300 x g, 5 min).

Tabelle 3.23.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS19. Zellkulturüberstände von MS-5-Zellen wurden in RB27-Medium mit 5 mM Glukose durch 7-tägiger Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^4$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27-Medium mit 5 mM Glukose pro Well, Ue - 100 μ l Zellkulturüberstände pro Well; MS-5 - MS-5-Zellen kultiviert in RB27/DMEM als Feederzellen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonzellen:Feederzellen ca. 1:20); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte bei einem finalen Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	Klonmix	M	V	0, 7, 13, 21
s 1	Klonmix	Ue	V	7, 13, 21
s 3	Klonmix	MS-5 _{DMEM}	V	7, 13, 21
s 4	Klonmix	Ue + MS-5 _{RB27}	V	7, 13, 21
s 5	Klonmix	Ue + MS-5 _{DMEM}	V	7, 13, 21

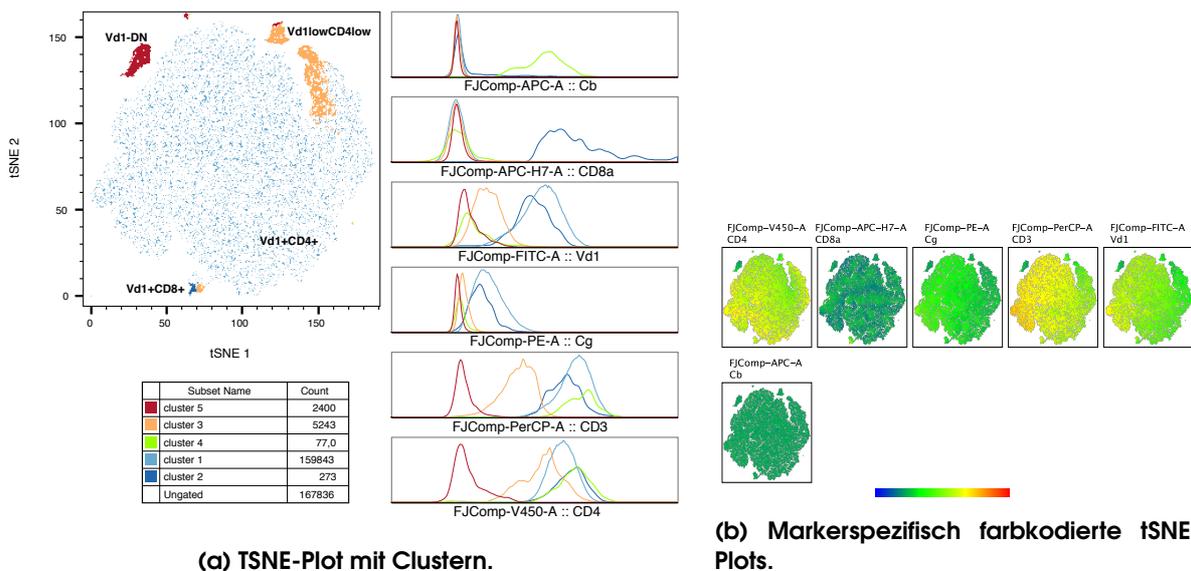
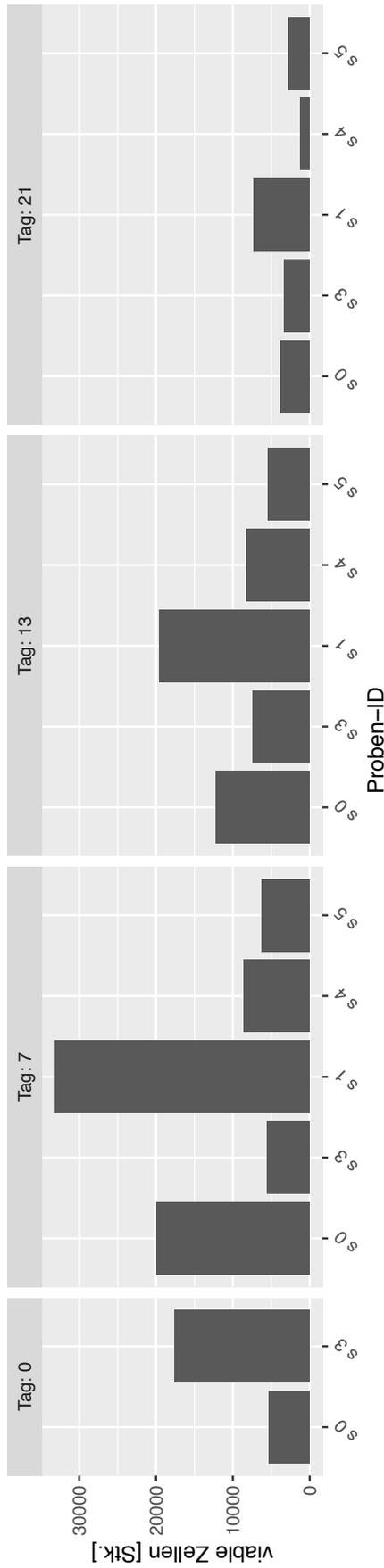
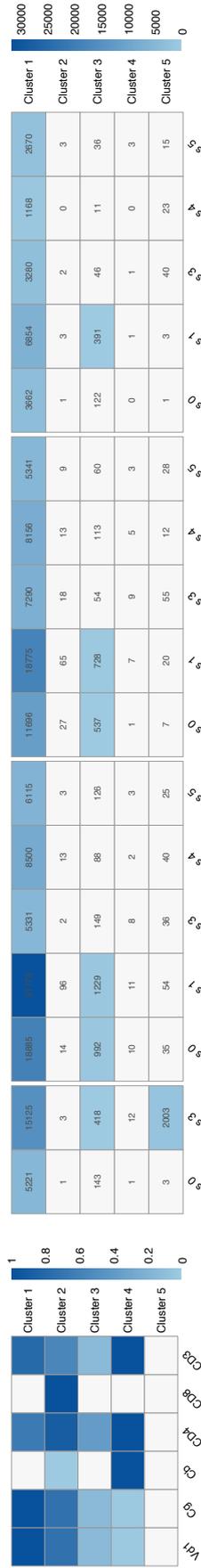


Abbildung 3.74.: TSNE-Analyse des Experiments UeS19.

Im Experiment UeS19 wurden mit unter 0,4% nur sehr wenige C β ⁺Zellen (Cluster 4 und Cluster 2, Abb. 3.74c) detektiert, welche zudem über alle Proben verteilt waren.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-signalmediane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.75.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues19.

3. ERGEBNISSE

Obwohl die MS-5-Zellen aus DMEM-Kultur unter dem Mikroskop optimal aussahen, induzierten sie, wie an Proben s3 (MS-5_{DMEM}) und s5 (UeS + MS-5_{DMEM}) erkennbar, keine Transdifferenzierung. Wie zuvor wurde die höchste Gesamtviabilität bei den Zellen der reinen UeS-Probe s1 (Abb. 3.75a) nachgewiesen.

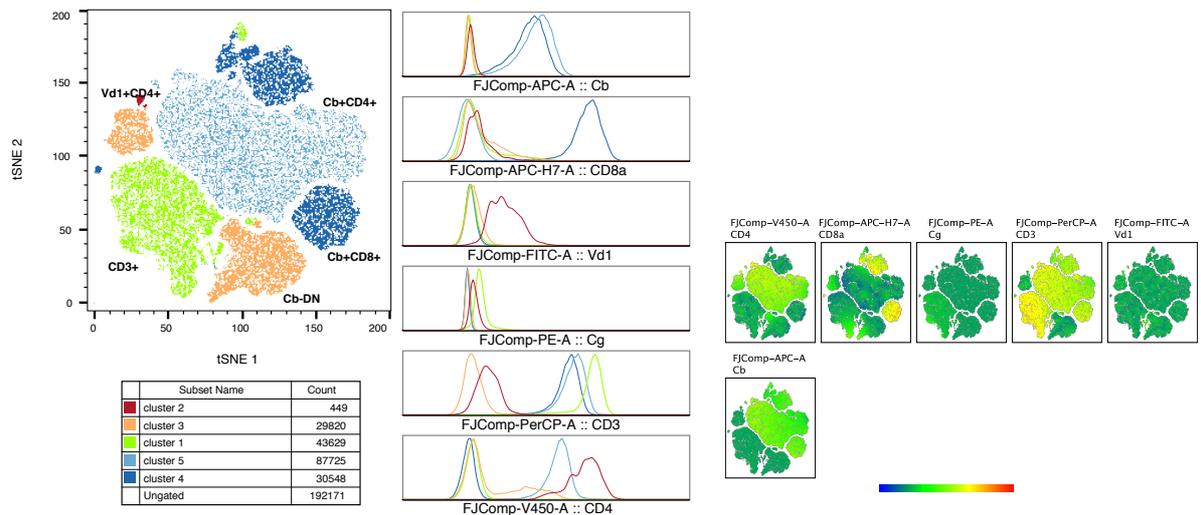
3.2.20. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS20

Die potentielle Induktion der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Transdifferenzierung durch Anwesenheit von Stromazellen (MS-5) im PBMC-, $V\delta 2$ -PBMC und $TZR\alpha\beta$ -depletiertem PBMC-Kontext wurde in Experiment UeS20 für zwei Spender analysiert. Die Ergebnisse dieses Assays erlauben eine Einschätzung, ob das Fehlen von $V\delta 2^+$ oder $\alpha\beta$ T-Zellen in PBMCs eine Transdifferenzierung über einen Kompensationseffekt induziert. Das Verhältnis von $V\delta 1^+$ T-Zellen zu MS-5 Stromazellen betrug 1:20 für Spender 1 und, aufgrund des geringen $V\delta 1^+$ -Anteils der PBMCs, 1:120 für Spender 2.

Tabelle 3.24.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS20 für beide Spender. Zellkulturüberstände wurden von MS-5-Zellen in RB27-Medium und 5 mM Glukose durch 6-tägige Inkubation generiert. Jedes Well enthielt $3 \cdot 10^5$ Zellen des angegebenen PBMC-Isolates. M - 100 μ l RB27-Medium mit 5mM Glukose pro Well, MS-5 - MS-5-Zellen kultiviert in DMEM-Medium als Feederzellen ($1,5 \cdot 10^5$ MS-5 Zellen/Well = PBMC:MS-5 ca. 2:1); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte bei einem finalen Volumen von 200 μ l pro Well.

ID	Klon/Zellen	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	PBMC	M	V	0, 7, 18
s 1	$V\delta 2$ PBMC	M	V	0, 7, 18
s 2	$\alpha\beta$ PBMC	M	V	0, 7, 18
s 3	PBMC	+MS-5	V	7, 18
s 4	$V\delta 2$ PBMC	+MS-5	V	7, 18
s 5	$\alpha\beta$ PBMC	+MS-5	V	7, 18

Donor 1

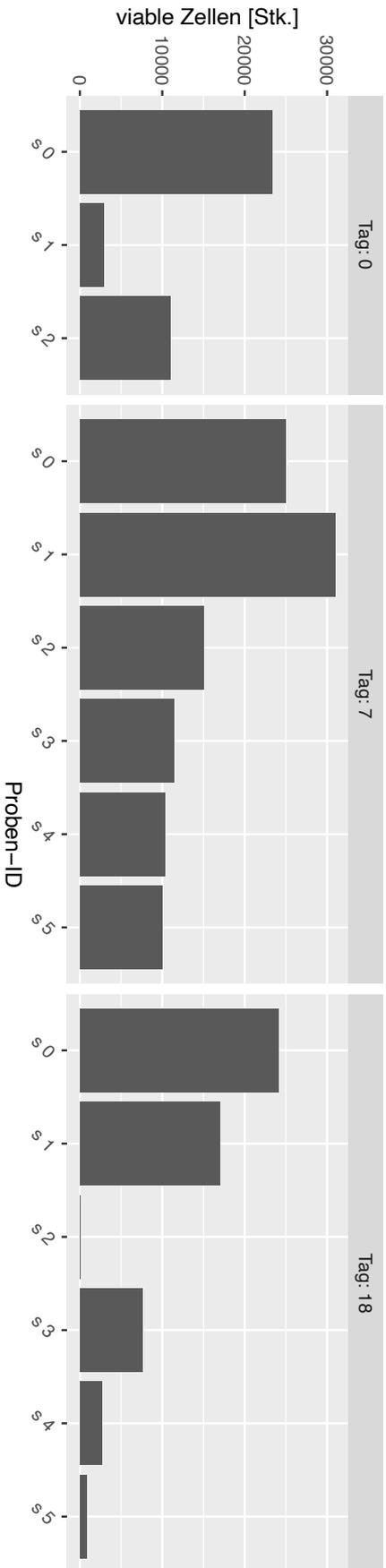


(a) TSNE-Plot mit Clustern.

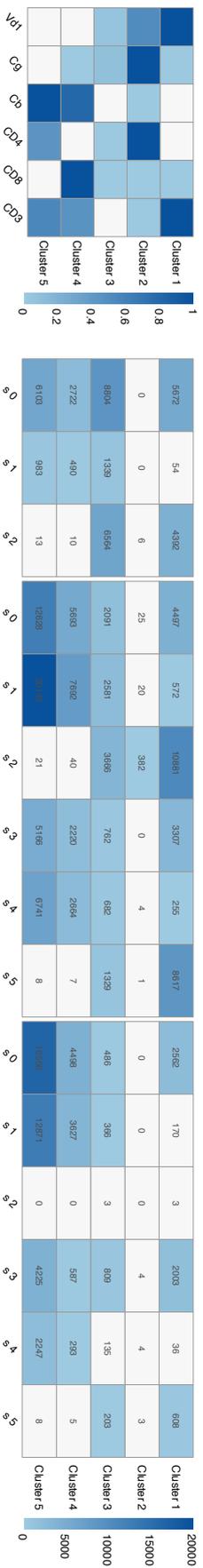
(b) Markerspezifisch farbkodierte tSNE-Plots.

Abbildung 3.76.: TSNE-Analyse des Experiments UeS20 Donor 1.

Bei Spender 1 waren bereits an Tag 0 11,7% aller viablen PBMCs (s0) und 17,1% der viablen $V\delta 2$ -PBMC (s1) $C\beta^+$ (s. Cluster 2+4 in Abb. 3.77). $\alpha\beta$ -PBMCs (s2) wiesen, wie er-



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(c) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

Abbildung 3.77.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues20 Donor 1.

wartet, initial die wenigsten $C\beta^+$ Zellen auf (0,2% an Tag 0), wobei für in dieser Probe der höchste Anteil $C\beta^+$ Zellen (2,8%) an Tag 7 nachgewiesen wurde. Die Gesamtanteile der $C\beta^+$ Zellen sind bei den Proben s0 und s1 an Tag 18 am höchsten, wobei Probe s0 an diesem Zeitpunkt mit ca. doppelt so vielen $C\beta^+$ Zellen, im Vergleich zu Tag 0, den stärksten Zuwachs verzeichnet. Der MS-5-Support der Proben (s3 und s4) steigerte den Anteil $C\beta^+$ Zellen nie und entsprach den Proben ohne MS-5-Support (s0 und s1). Nur bei Probe s5 ($\alpha\beta$ -PBMc+MS-5) wirkte sich der MS-5-Kontext an Tag 18 positiv auf den Anteil $C\beta^+$ Zellen aus und lag bei 1,3%, was dem 1,5-Fachen des Nullwertes (Tag 0 s2) entspricht. Diese prozentuale Zunahme $C\beta^+$ Zellen liegt vermutlich an der geringen Gesamtzellzahl dieser Probe. Die Viabilität wurde durch Anwesenheit der MS-5-Zellen in allen Proben verringert (vgl. Abb. 3.77a).

Donor 2

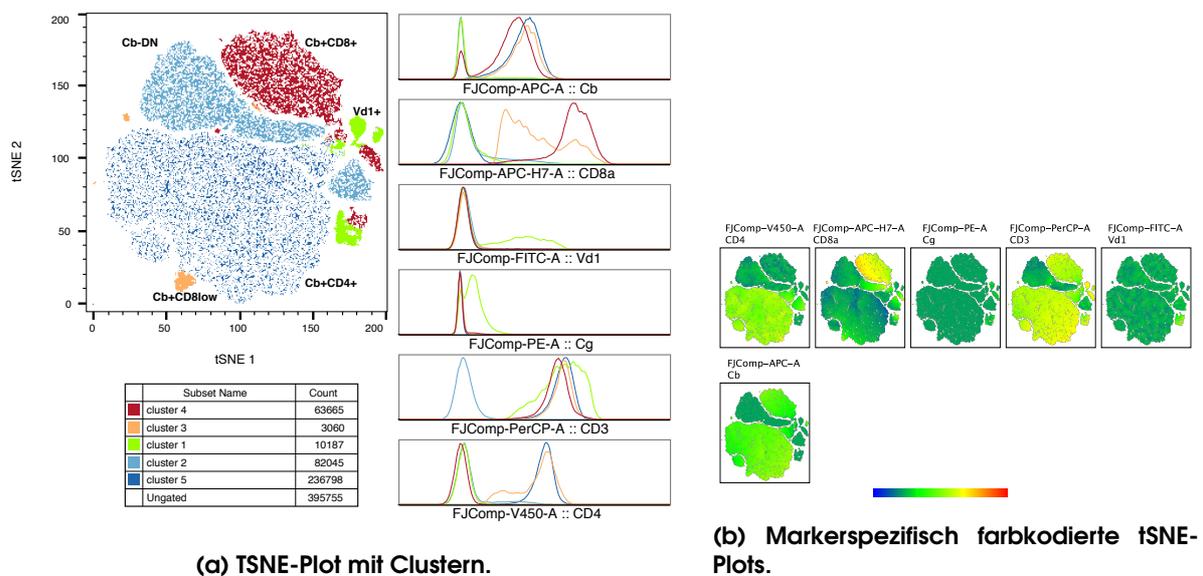
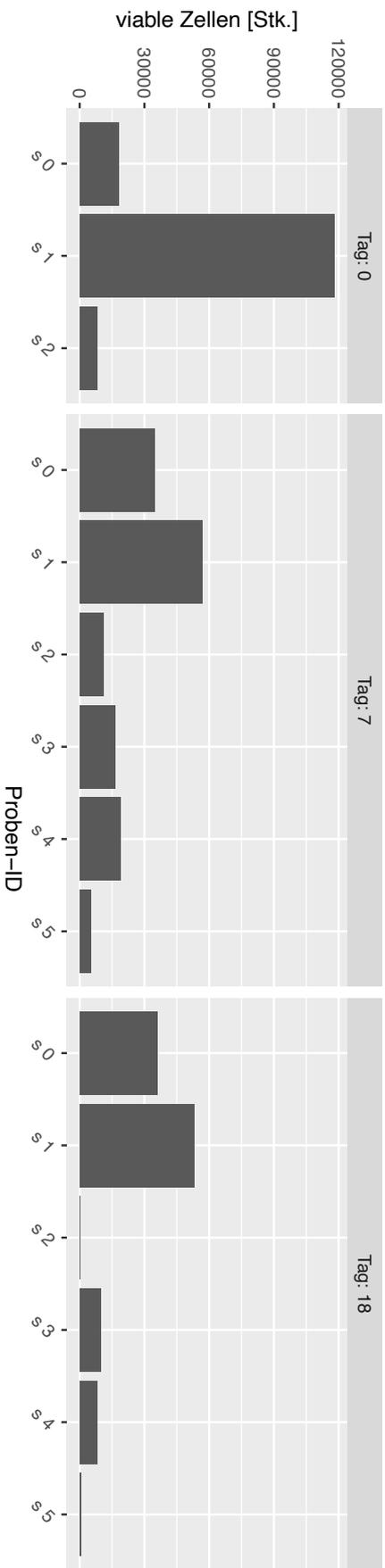
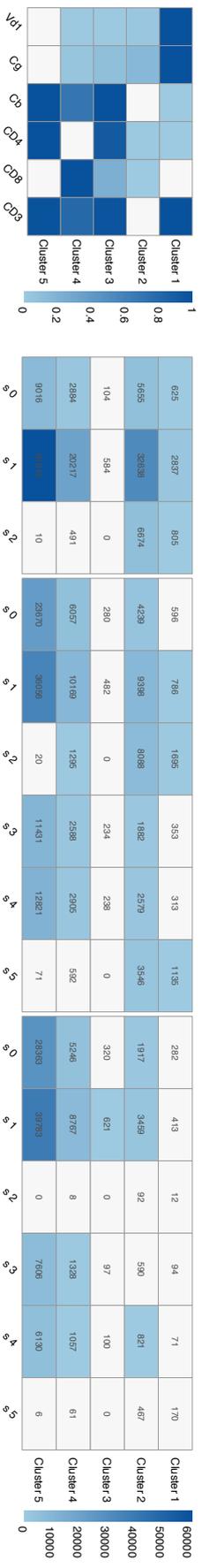


Abbildung 3.78.: TSNE-Analyse des Experiments UeS20 Donor 2.

Bei den untersuchten Zellen des 2. Spenders lag der Anteil $C\beta^+$ Zellen (Cluster 3-5) an Tag 0 bei 65,7% der viablen PBMCs (s0) und 70% der viablen $V\delta 2^+$ -PBMc (s1) (s. Abb. 3.77). Auch hier wiesen die $\alpha\beta$ -PBMCs (s2), wie erwartet, an Tag 0 die wenigsten $C\beta^+$ Zellen auf (6,3%), wobei auch für Spender 2 der höchste Anteil mit 11,8% an Tag 7 nachgewiesen wurde. Die Gesamtanteile der $C\beta^+$ Zellen sind bei den Proben s0 und s1 an Tag 18 am höchsten, wobei Probe s0 an diesem Zeitpunkt mit dem 1,4-Fachen an $C\beta^+$ Zellen, im Vergleich zu Tag 0, den höchsten Anteil verzeichnet. Auch beim 2. Spender ähnelten sich die Anteile $C\beta^+$ Zellen in den Proben mit MS-5-Support (s3 und s4) und ohne MS-5-Support (s0 und s1) stark: mit Stromasupport liegt der Anteil $C\beta^+$ Zellen beim 0,96–1,03-Fachen der Proben ohne Stromasupport. Für Spender 2 ist ebenfalls nur bei Probe s5 ($\alpha\beta$ -PBMc+MS-5) an Tag 18 ein positiver Effekt durch den MS-5-Kontext zu



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.79.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues20 Donor 2.

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

erkennen, was allerdings an der geringen Gesamtzellzahl liegen dürfte. Auch für den 2. Donor ist zu erkennen, dass die Viabilität durch Anwesenheit der MS-5-Zellen verringert ist (vgl. Abb. 3.79a).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Gesamtviabilität der untersuchten Zelltypen durch Gegenwart von MS-5-Stromazellen bei beiden Spendern verringert wurde (s0-3 vs. s4-6, Abb. 3.77a und 3.79a). Zusätzlich zeigten $\alpha\beta$ -PBMCs und unfraktionierte PBMCs sehr ähnliche Clusterprofile, das Fehlen von $\alpha\beta$ T-Zellen innerhalb der PBMCs wurde bis Tag 18 nicht kompensiert und führte insgesamt zu einer geringeren Viabilität der Zellen (Proben s2 und s5, Abb. 3.77c und 3.79c).

3. ERGEBNISSE

3.2.21. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS21

In ihrer Publikation aus dem Jahre 2015 berichteten Wegner und Kollegen, dass eine dichte PBMC-Vorkultur (10^7 Zellen/ml für 2 Tage) die Sensitivität von CD8⁺T-Zellen für die Antigen-induzierte Aktivierung *ex vivo* wiederherstellen würde, die durch den Verlust des Zell-zu-Zell-Kontaktes in der klassischen *ex vivo* PBMC-Kultur bei einer Dichte von 10^6 Zellen/ml verloren ginge (114). Zusätzlich wurde von Beer und Kollegen das Potential des PBMC-Sekretoms im Kontext der Wundheilung und Angiogenese beschrieben (s. (32, 33)), wobei hervorgehoben wurde, dass das Sekretom bestrahlter PBMCs die Wundheilung signifikant verbesserte (34). Vor diesem Hintergrund sollten in Experiment UeS21 die Einflüsse einer dichten Vorkultur zur Generierung der Überstände und des Sekretoms bestrahlter PBMCs auf die Induktion der Transdifferenzierung von V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen untersucht werden. Dazu wurden frisch isolierte PBMCs von zwei Spendern (autolog und allogene) jeweils in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine davon wurde vor Ansetzen der Vorkultur (bei hoher Zelldichte ($2,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml) in RB27-Medium für 24 Stunden bei 37 °C) mit 80 Gy bestrahlt. Die hohe Zelldichte der Vorkultur führte zu einem durch gelben Farbumschlag gekennzeichneten hohen Nährstoffverbrauch durch die PBMCs. Nach den ersten 10 Tagen des Experiments wurde jede Vertiefung mit 5 μ l RB27 inkl. IL-2 ($c_{\text{end}}=200 \mu\text{l/ml}$) und IL-7 ($c_{\text{end}}=10 \text{ ng/ml}$) supplementiert.

Tabelle 3.25.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS21. Zellkulturüberstände wurden aus einer PBMC-Kultur mit hoher Zelldichte von $2,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml in RB27-Medium mit 5 mM Glukose für 24 h generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27-Medium pro Well, Ue - 100 μ l Zellkulturüberstände pro Well, auto - autolog, allo - allogene, i - Bestrahlung (80 Gy) an Tag 0, P - PBMCs als Feederzellen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonmix:Feederzellen ca. 1:20); V - V-bottom 96-Well-Zellkulturplatte mit einem finalen Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon/Zellen	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	Klonmix	M	V	0, 7, 14, 21
s 1	Klonmix	auto Ue	V	7, 14, 21
s 2	Klonmix	auto Ue+P	V	7, 14, 21
s 3	-	auto iP	V	7
s 4	Klonmix	auto iUe	V	7, 14, 21
s 5	Klonmix	auto iUe+iP	V	7, 14, 21
s 6	Klonmix	allo Ue	V	7, 14, 21
s 7	Klonmix	allo Ue+P	V	7, 14, 21
s 8	-	allo iP	V	7
s 9	Klonmix	allo iUe	V	7, 14, 21
s 10	Klonmix	allo iUe+iP	V	7, 14, 21

Unter dem Mikroskop hatten V δ 1⁺CD4⁺T-Zellklone, die mit Überständen (UeS) exponiert wurden, eine sphärische, non-adhärenente Form, während V δ 1⁺CD4⁺Z-Zell-Klone in RB27-Medium (M) teilweise adhärenent wurden (Daten nicht gezeigt). Im Falle eines optimalen Clusterings des tSNE-Plots, also bei optimal gewählter Clusteranzahl, entsprechen die Markerexpressionskurven der Histogramme einer Gauß-Verteilung. Da das

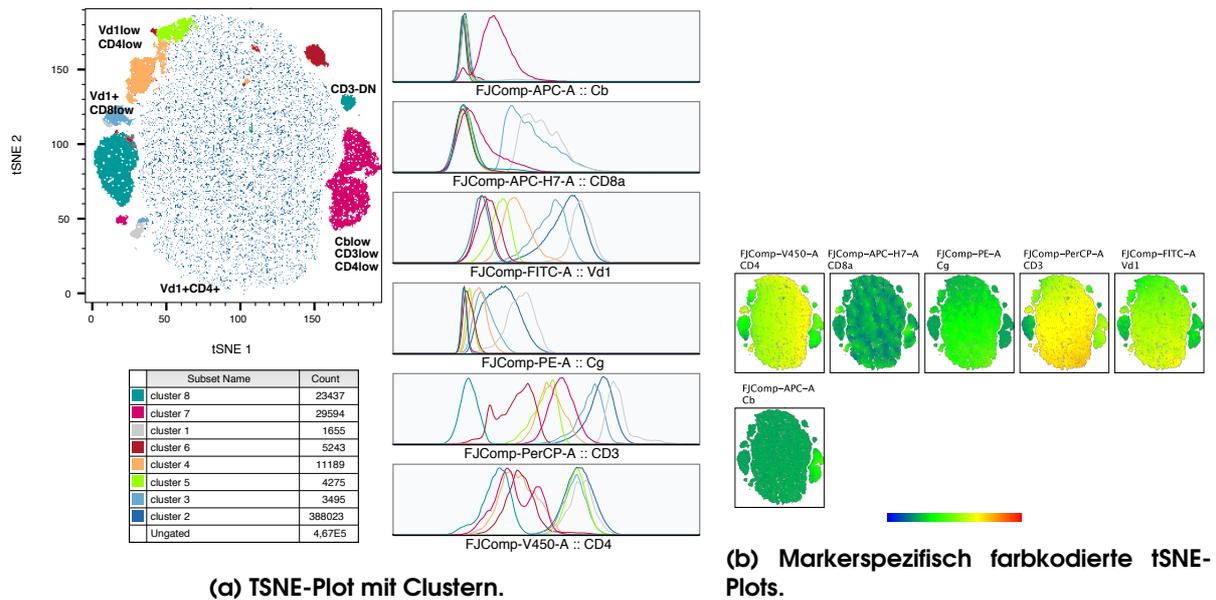
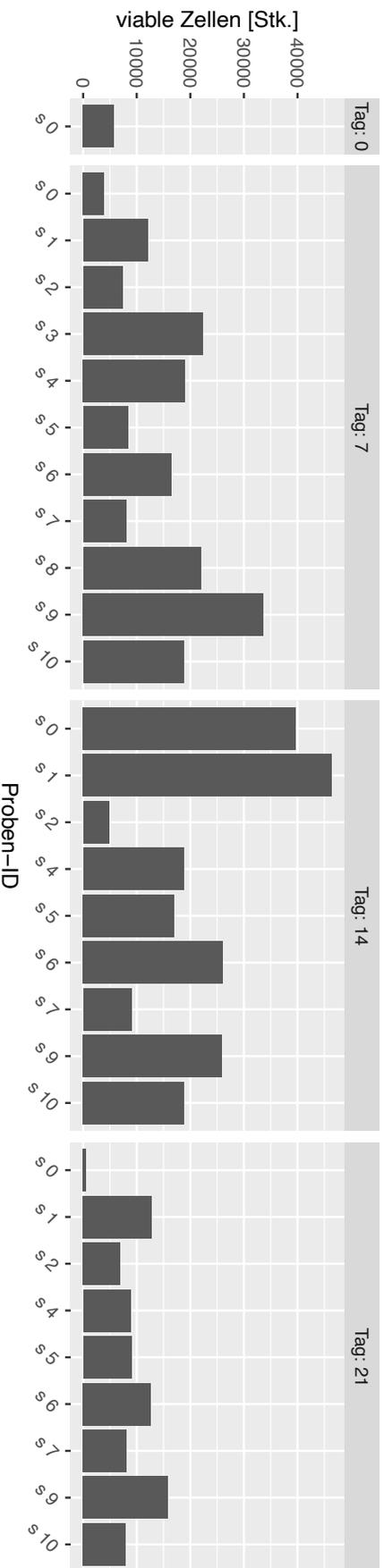


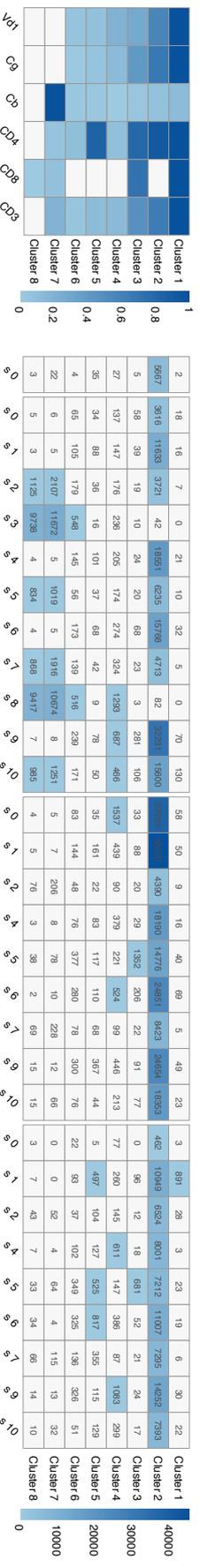
Abbildung 3.80.: tSNE-Analyse des Experiments UeS21.

tSNE-Clustering mit fünf Clustern nicht zu den Daten von Experiment UeS21 passte (keine Bildung von Gauß-Kurven in den Histogramm-Plots der einzelnen Marker möglich), wurde die Clusteranzahl in diesem Experiment auf acht erhöht.

Interessanterweise konnte in Bezug auf die Lebensfähigkeit der Klone (Abb. 3.81a) kein klarer Trend im Vergleich zwischen den „unbestrahlten“ (s1/2 und s6/7) und den Settings im Bestrahlungskontext (i: s4/5 und s9/10) beobachtet werden. Vor allem an Tag 7 waren in allen Proben, die mit Feederzellen supplementiert worden waren (s2/3/5/7/8/10), sowohl in der autologen als auch in der allogenen Einstellung $\text{C}\beta^+$ Zellen nachweisbar (Cluster 7), jedoch mit ähnlichen Markerexpressionsmustern, wie sie für die beiden Feeder-only-Kontrollen s3 und s8 erkennbar sind (Abb. 3.81c). Daher konnte in Experiment UeS21 keine Transdifferenzierung nachgewiesen werden, die Viabilität nahm insgesamt nach Tag 14 ab. Über alle Zeitpunkte sind keine klaren Viabilitätsunterschiede zwischen den autologen (s1/2/4/5) und allogenen Settings (s6/7/9/10) bzw. den den „unbestrahlten“ (s1/2/6/7) und „bestrahlten“ (s4/5/9/10) Ansätzen erkennbar.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(c) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

Abbildung 3.81.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues21.

3.2.22. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS22

Die Einflüsse einer Vorkultur bei hoher Zelldichte auf die Transdifferenzierung (s. Experiment UeS21) wurden in einem weiteren Experiment untersucht. Zellkulturüberstände wurden aus nicht bestrahlten und bestrahlten PBMCs dreier Spender generiert. Um die Nährstoffe des Mediums nicht komplett während der Vorinkubation zu verbrauchen, wurden alle PBMCs bei einer moderaten Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml und ein Aliquot von Spender 2 zusätzlich bei halber Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml für 7 Tage in RB27-Medium mit 5 mM Glukose kultiviert. Als Feederzellen wurde ausschließlich die unbestrahlte PBMC-Fraktion der Vorkulturen verwendet.

Tabelle 3.26.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS22. Zellkulturüberstände wurden von PBMCs bei einer moderaten Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml über 7 Tage in RB27-Medium mit 5 mM Glukose generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen. M - 100 μ l RB27-Medium pro Well, Ue - 100 μ l Zellkulturüberstände pro Well, auto - autolog, allo - allogene, i - Bestrahlung mit 80 Gy an Tag 0, P - PBMCs als Feederzellen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonmix:Feederzellen ca. 1:20), $_{low}$ - PBMCs aus Vorkultur mittlerer Dichte ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte mit einem finalen Volumen von 100 μ l pro Well.

ID	Klon/Zellen	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	Klonmix	M	V	0, 7, 14, 21
s 1	Klonmix	auto Ue	V	7, 14, 21
s 2	Klonmix	auto Ue+P	V	7, 14, 21
s 3	Klonmix	auto iUe	V	7, 14, 21
s 4	Klonmix	auto iUe+P	V	7, 14, 21
s 5	Klonmix	allo Ue Donor 1	V	7, 14, 21
s 6	Klonmix	allo Ue+P Donor 1	V	7, 14, 21
s 7	Klonmix	allo iUe Donor 1	V	7, 14, 21
s 8	Klonmix	allo iUe+P Donor 1	V	7, 14, 21
s 9	Klonmix	allo Ue Donor 2	V	7, 14, 21
s 10	Klonmix	allo Ue+P Donor 2	V	7, 14, 21
s 11	Klonmix	allo iUe Donor 2	V	7, 14, 21
s 12	Klonmix	allo iUe+P Donor 2	V	7, 14, 21
s 13	Klonmix	allo $_{low}$ Ue Donor 2	V	7, 14
s 14	Klonmix	allo $_{low}$ Ue+P Donor 2	V	7, 14, 21
s 15	-	P only	V	7, 14

Anhand der Daten des Experiments UeS22 muss vom Ausbleiben der Transdifferenzierung ausgegangen werden, da in der tSNE-Analyse weder C β^+ Zellen noch größere tSNE-Cluster erkennbar sind. Hinsichtlich der Viabilität führte die Bestrahlung der PBMCs (Vorkultur) bis Tag 14 in allen Proben zu höheren Zellzahlen, während sich dieses Verhalten bis an Tag 21 weitgehend umkehrte (Abb. 3.83a). Darüber hinaus war kein Unterschied zwischen den autologen (s0-4) und allogenen (s5-8 und s9-12) Settings feststellbar.

3. ERGEBNISSE

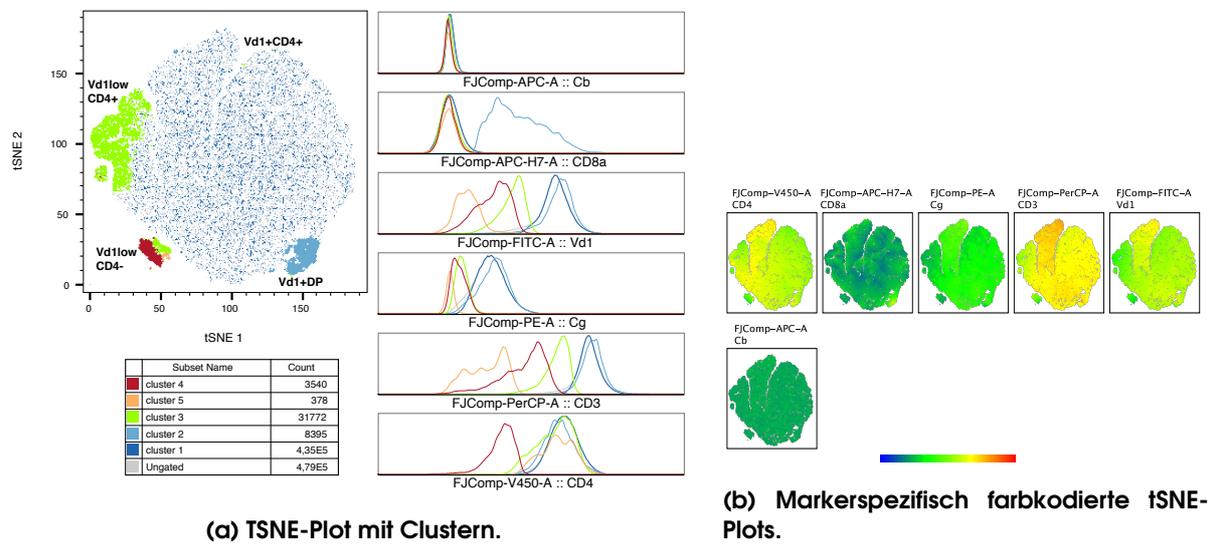
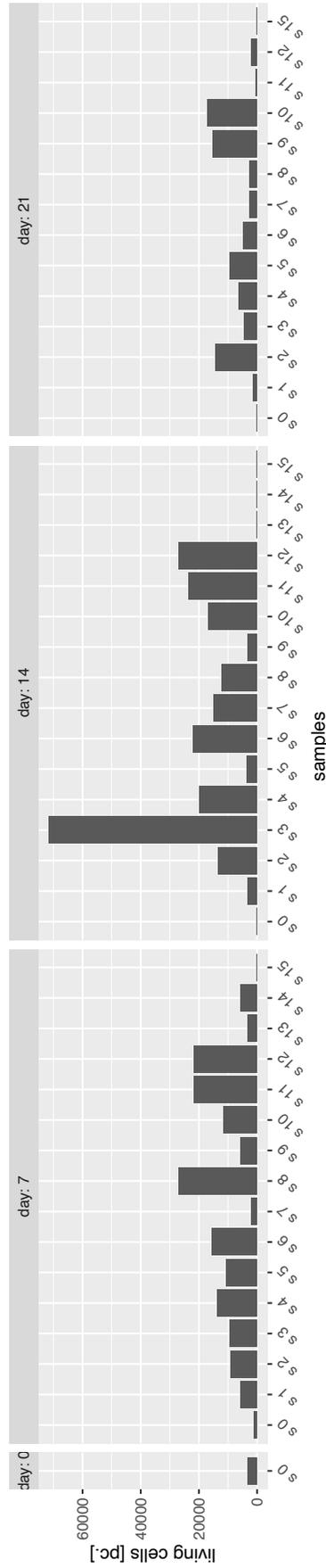
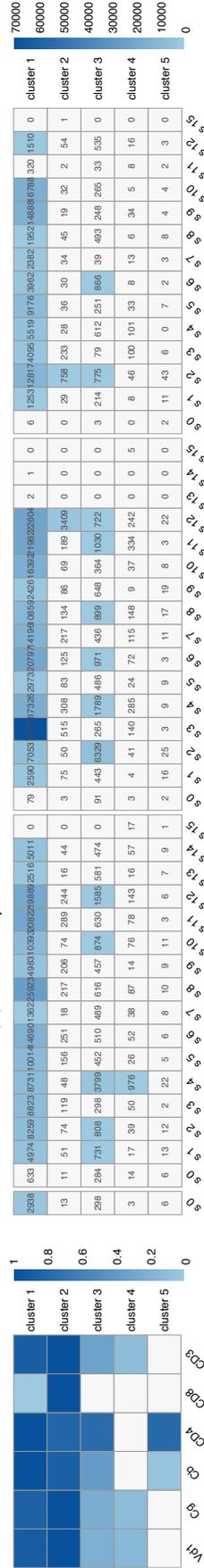


Abbildung 3.82.: TSNE-Analyse des Experiments Ues22.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptor-gnalmidiane.

(c) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

Abbildung 3.83.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues22.

3. ERGEBNISSE

3.2.23. Transdifferenzierungsexperiment mit Zellkulturüberständen - UeS23

Ein weiteres Experiment mit hoher Zelldichte der Vorkultur wurde im autologen und allogenen Setting mit Überständen und Feederzellen unbestrahlter als auch bestrahlter PBMCs durchgeführt. Dazu wurden PBMCs für 3 Tage bei einer Dichte von 10^7 Zellen/ml in RB27-Medium mit 5 mM Glukose kultiviert. Zusätzlich wurde der Einfluss von MS-5 auf die Transdifferenzierung von panV δ 1⁺ und $\alpha\beta$ -depletierten panV δ 1⁺T-Zellen im allogenen Setting untersucht.

Tabelle 3.27.: Detaillierte Informationen zu den Proben des Experiments UeS23. Zellkulturüberstände wurde mittels PBMC-Kultur in RB27-Medium mit 5 mM Glukose bei einer Dichte von 10^7 Zellen/ml und 3-tägiger Inkubation generiert. Alle Wells wurden mit IL-2 und IL-7 zu finalen Konzentrationen von 30 units/ml IL-2 und 1 ng/ml IL-7 supplementiert. Jedes Well enthielt ca. $7,5 \cdot 10^3$ Klonzellen/panV δ 1⁺/ $\alpha\beta$ -depletierte panV δ 1⁺T-Zellen. M - 100 μ l RB27-Medium pro Well, Ue - 100 μ l Zellkulturüberstände pro Well, auto - autolog, allo - allogene, i - Bestrahlung mit 80 Gy an Tag 0, P - PBMCs als Feederzellen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well = Klonmix/panV δ 1⁺/ $\alpha\beta$ -depletierte panV δ 1⁺T-Zellen:Feederzellen ca. 1:20), MS-5 - murine Stromazelllinie ($6,4 \cdot 10^4$ Zellen/Well Zell: MS-5-Verhältnis ca. 1:8,5); V - V-bottom 96-Well Zellkulturplatte mit 100 μ l finaleml Volumen pro Well.

ID	Klon/Zellen	Kondition	Oberfläche	Zeitpunkte (Tag)
s 0	Klonmix	M	V	0, 4, 7, 14
s 1	Klonmix	auto Ue	V	4
s 2	Klonmix	auto Ue+P	V	4
s 3	Klonmix	auto iUe	V	4
s 4	Klonmix	auto iUe+iP	V	4
s 5	Klonmix	auto P	V	4, 7, 14
s 6	Klonmix	auto iP	V	4, 7, 14
s 7	Klonmix	allo Ue	V	7, 14
s 8	Klonmix	allo Ue+P	V	7, 14
s 9	Klonmix	allo iP	V	7, 14
s 10	Klonmix	allo iUe+iP	V	7, 14
s 11	panV δ 1 ⁺	M	V	7, 14
s 12	panV δ 1 ⁺	+MS-5	V	7, 14
s 13	panV δ 1 ⁺ $\alpha\beta$ ⁻	M	V	7, 14
s 14	panV δ 1 ⁺ $\alpha\beta$ ⁻	+MS-5	V	7, 14

In Experiment UeS23 waren nur sehr wenige (siehe Histogramme der tSNE-Cluster 3 und 5 in Abb. 3.84) und auf die Proben mit Feederzell-Support oder panV δ 1⁺-Zellen an den Tagen 4 und 7 beschränkt C β ⁺Ereignisse nachweisbar (3.85c). Die allogenen Settings (s7-10), v. a. im Kontext der bestrahlten Zellen der Vorkultur (s9 und s10), verzeichnen an allen Zeitpunkten die höchste Zellviabilität, obwohl die Viabilität aller Proben (außer Probe s10) zwischen Tag 7 und 14 tendenziell abnahm (Abb. 3.85a). Bei den Proben mit panV δ 1⁺T-Zellen (s11 und s12) war die Viabilität im MS-5-Kontext (s12) höher, wobei sich dieses Verhältnis bei den $\alpha\beta$ -depletierten panV δ 1⁺-Proben s13 und s14 umkehrte. Auch bei diesem Experiment konnte die Anwesenheit von MS-5-Zellen die Transdifferenzierung nicht initiieren.

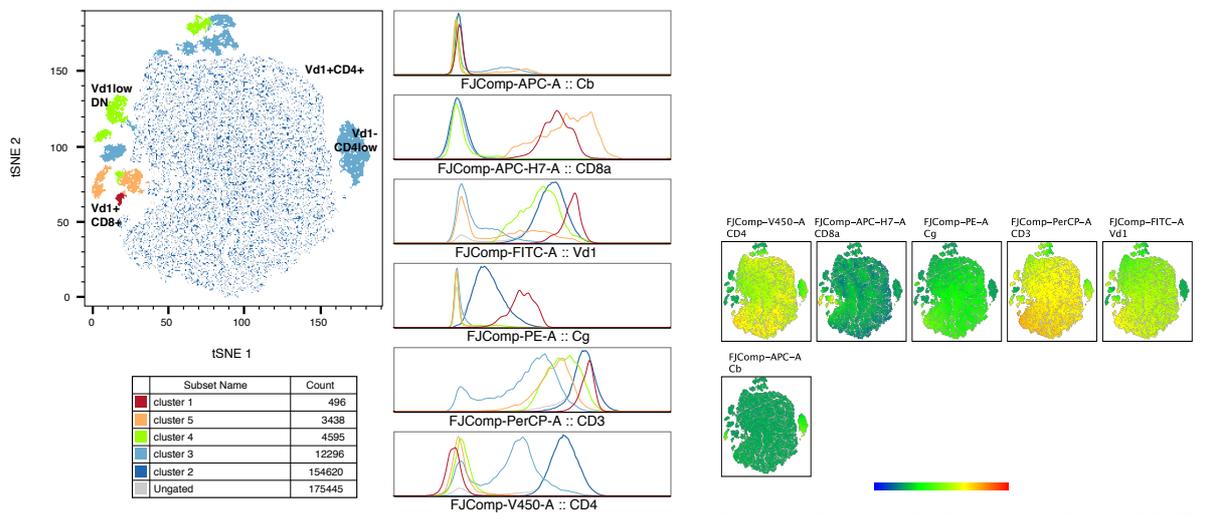
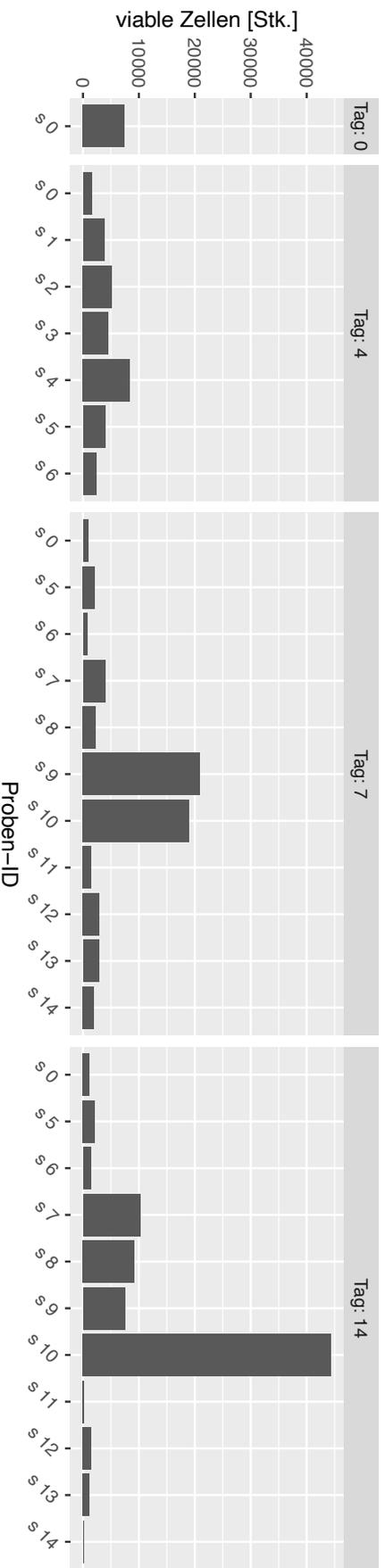
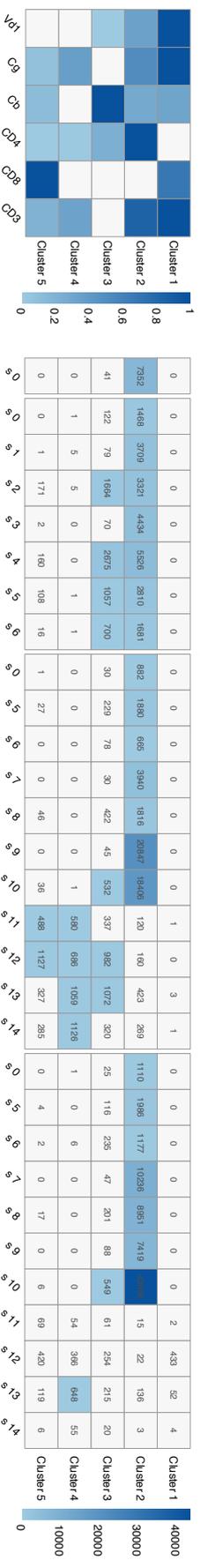


Abbildung 3.84.: TSNE-Plot Analysis of Experiment UeS23.



(a) Probenspezifische Zellviabilität über die Zeit.



(b) Probenspezifische Heatmap-Darstellung der Anzahl lebender Zellen und ihrer Verteilung in tSNE-Clustern.

(c) Heatmap-Darstellung der clusterspezifischen Rezeptorsignalmidiane.

Abbildung 3.85.: Transdifferenzierungsanalyse des Experiments Ues23.

3.2.24. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit ist eine Studie zur weiterführenden phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen. Weil die Transdifferenzierung dieser Progenitoren selbst höchstwahrscheinlich ein multidimensionaler, sequenzieller Prozess ist (s. unten) und die Analyse der generierten $\alpha\beta$ T-Zellen keinen Aufschluss über mögliche Transdifferenzierungstrigger erlaubt, kann sie nur retrospektiv verstanden werden.

Die auf den Ergebnissen von Schillbach und Kollegen (20) aufbauende molekulare Charakterisierung des $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Progenitors zeigte, dass

- ex vivo kultivierbare $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone nur teilweise den fokussierten, aber heterogenen Pool peripherer $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen repräsentieren und dass davon ausgegangen werden kann, dass intrinsische Faktoren die Kultivierbarkeit der Progenitoren bestimmen.
- $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen, auf Basis der molekularen Profile bekannter Schlüsselkomponenten (Transkriptionsfaktoren und Targets) der frühen thymischen Entwicklung, dem Stadium D1-2 entsprechen und damit vor der bifurkalen Entscheidung $\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$ stehen.
- pan $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen auf Basis der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Gene (u. a. Transkriptionsfaktoren und Targets der frühen thymischen Entwicklung, Rag1/2, Notch, Notch-Liganden und Notchtargets, MMPs, Integrine), wie Thymozyten im DN2-Stadium, ein heterogener Progenitorpool sind. Diese Heterogenität lässt vermuten, dass jeder einzelne Progenitor individuelle Trigger braucht, um die Transdifferenzierung zu initiieren.
- $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitoren in der Standardkultur möglicherweise über Notch1 und Notch2 stimulierbar sind. Darüber hinaus wurde bei den Progenitoren die Genexpression der Notch-Liganden *jag1*, *jag2*, *dll1* und *dll4* nachgewiesen. Demnach wäre Notch-Signaling theoretisch sowohl über cis- als auch trans-Präsentation (Progenitor und/oder akzessorische Zellen) möglich. Basierend auf Genexpressionsanalysen der Notch-Targets und Notch-Antagonisten (Sharp, Numb Zbtb7a) ist in der Standardkultur kein bzw. eher noch von der Inhibition des Notch-Signalings auszugehen.
- $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone auf Transkriptionsebene positiv für die MMPs ADAM10 und ADAM17 sind und somit MMP-vermittelte Prozesse wie Notch-Signaling, MICA/B-Shedding und die Regulation von TZR-Signalen grundsätzlich möglich sind.
- $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen mehrere Integrinuntereinheiten exprimieren und positiv für LFA-1, VLA-5, LFA-3 und teilweise VLA-4 sind. Integrin-vermittelte ECM- und Zell-Zell-Interaktionen sind somit möglich.

3. ERGEBNISSE

- $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen den TZR-Signaling-Antagonisten Lair-1 tragen, in/nach der *ex vivo* Kultur jedoch in geringerem Maße als direkt nach der Isolation aus Peripherblut. Das Kollagen-vermittelte Dämpfen des TZR-Signalings und anderer Integrin-mediierter Signale ist somit möglich.

Das Ziel die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen reproduzierbar zu induzieren ist nicht erreicht worden, der Rahmen in dem sie stattfindet konnte jedoch durch die Experimente mit vorkonditionierten Zellkulturüberständen enger umrissen werden. Wir wissen jetzt, dass:

- konditionierte Zellkulturüberstände die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellklonen im autologen und allogenen Setting ermöglichen können, wobei eine lange Präkonditionierungsphase des Zellkulturmediums (ca. > 7 Tage) die Viabilität der Progenitoren senkt.
- das Zeitfenster der Transdifferenzierung im Kontext mit konditionierten Zellkulturmedien zwischen Tag 0 und Tag 14 zu erwarten ist, danach nimmt die Viabilität des Progenitors und die Wahrscheinlichkeit, dass eine TD stattfindet, ab.
- allein die Standardkulturbedingungen (IL-2, IL-7, PHA, sowie 10% FCS) und proinflammatorische Zytokine die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen nicht initiieren können.
- Feederzellen in manchen Assays die Transdifferenzierung „erlaubten“ bzw. in anderen Assays jedoch nicht notwendig waren, um die Transdifferenzierung zu induzieren.
- bestrahlte PBMCs und $\alpha\beta$ T-Zellen beide das Potential haben über ihr Sekretom und Zell-zu-Zell-Kontakte die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen zu induzieren.
- die Zugabe von Laktat oder verschiedenen Zytokinen der akuten Inflammation in den Transdifferenzierungsexperimenten die Viabilität der Progenitoren senkt und allein die Transdifferenzierung nicht initiieren können.
- der intrinsische Zustand des $V\delta 1^+CD4^+$ Klons an Tag 0 bedingt, ob eine Transdifferenzierung erfolgen kann, weil ein und derselbe Klon nicht reproduzierbar zur Transdifferenzierung gebracht werden konnte. Ebenso transdifferenzierte nicht jeder frisch isolierte Klon.
- $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen in Überständen CD3/38-stimulierter PBMCs/ $\alpha\beta$ T-Zellen eine höhere Viabilität aufweisen als in Zellkulturüberständen ruhender PBMCs/ $\alpha\beta$ T-Zellen.
- die α CD3/28-Stimulation bei $\alpha\beta$ T-Zellen und PBMCs die Konzentration an gesheddetem MICA/B erhöht, ruhende Zellen aber auch in geringeren Maße MICA/B shedden (s. UeS7).

3.2. Transdifferenzierungsexperimente

- die Depletion von $\alpha\beta$ -Zellen aus PBMCs die Viabilität der $\alpha\beta$ -PBMCs senkt und dadurch allein die Neubildung von $\alpha\beta$ -T-Zellen durch Transdifferenzierung nicht initiiert werden kann.
- sich Überstände aus Präkonditionierung durch PBMCs bei erhöhter Dichte, unabhängig von einer vorangehenden Bestrahlung der PBMCs, positiv auf die Viabilität der $V\delta 1^+CD4^+$ -T-Zell-Klone auswirken.
- auch der Stromazellsupport durch MS-5-Zellen die Viabilität von $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen tendenziell erhöht, was jedoch allein keine Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen initiiert.
- obwohl $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellen mehrheitlich Lair-1 positiv sind, die Inhibition/Dämpfung des TZR-/Integrin-Signalings auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten die Transdifferenzierung nicht unterbindet (s. UeS1).
- weder die direkte Stimulation des TZR über den starken $\gamma\delta$ -TZR-Liganden Immu510, noch die Bypass Stimulation über IL-12/18 die Transdifferenzierung ermöglicht.
- durch mechanische Kräfte, wie z. B. Pipettieren (s. UeS1), die Transdifferenzierung weder inhibiert noch induziert wird.

4. DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen durch das Sekretom anderer Immunzellen wahrscheinlicher wird, dass der Kontakt zu akzessorischen Zellen nicht zwingend vorhanden sein muss und dass die (direkte/indirekte) TZR-Stimulation allein diesen Prozess weder initiiert noch unterbindet. Weil die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen durch Überstände verschiedener Immunzellentitäten (unfraktionierte/fraktionierte PBMCs sowie $\alpha CD3/28$ -stimulierte oder ruhende $\alpha\beta$ T-Zellen) initiiert werden kann, kann vermutet werden, dass die Schlüsselkomponenten, die die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen ermöglichen, universelle Moleküle sind, die hochkonservierte Signalkaskaden aktivieren. Dies ist sowohl mit der in der Literatur berichteten Erfahrung des positiven Effekts von murinem Stromasupport (xenogenes Setting über MS-5-hDII1) auf die *in vitro* Genese naiver humaner $\alpha\beta$ T-Zellen (112) als auch mit dem „innate-like“ Charakter der $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitoren gut vereinbar.

Die molekularen Charakterisierungen der $V\delta 1^+CD4^+$ Progenitoren und die Vielzahl an Ligand/Rezeptor-Paaren (s. Notch/Notch-Liganden, CD54/CD2, MICA/B-TZR $\delta 1$) auf den Progenitoren lässt vermuten, dass $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen über homotypische Interaktion miteinander in Kontakt stehen können. Der Netto-Schwellenwert, der zur Initiation der Transdifferenzierung überwunden werden muss, könnte somit auch multifaktorieller Natur sein und entspräche der Summe aller durch Kreuzpräsentation ermöglichten und durch Sekretomkomponenten verursachten Signale. So könnte auch erklärt werden,

- warum manche $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen bereits in der Standardkultur transdifferenzieren konnten (s. (20)) und weshalb Feederzellen für die Transdifferenzierung nicht obligat sind.
- dass nicht alle Klone im Experiment transdifferenzierten und die Transdifferenzierung bei ein und demselben Klon nicht reproduzierbar initiiert werden konnte (heterogener intrinsischer Zustand der Klone an Tag 0)
- wie bereits geringe Mengen stimulatorischer Liganden/Rezeptoren (s. Notch1/2, MICA/B (58)) bei gleichzeitiger Inhibition/Dämpfung (z. B. über Kollagen/Lair-1) bei $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen ausreichen können, um die Transdifferenzierung zu induzieren.

Sollte die Transdifferenzierung, wie vermutet, durch einen multifaktoriellen Trigger bzw. eine sequenzielle Abfolge verschiedener Trigger ausgelöst werden können wäre die Identifikation einzelner Schlüsselkomponenten sehr schwer. Ein multifaktorieller, sequenzieller Trigger ist jedoch wahrscheinlich, weil

- viele Signalmoleküle die im Thymus eine Rolle spielen (u. a. Notch, IL-2/IL-7-R) auch vom Progenitor exprimiert werden. Wie durch die klare spatio-temporale Lokalisation der verschiedenen thymischen Reifestadien gezeigt, erhält auch im Thymus jeder Progenitor multifaktorielle, sequenzielle Stimulationen (37).
- die Neogenese neuer $\alpha\beta$ T-Zellen, zur Prävention autoimmuner Reaktionen, streng reguliert sein muss. Ein monokausaler Trigger wäre damit kontrainduziert. Dabei

kommt theoretisch sowohl eine Aktivierung der Transdifferenzierung über stimulatorische Signale als auch über den Wegfall inhibitorischer Signale in Frage.

- auch die Homöostase über multiple Signalwege beeinflusst wird, die sich gegenseitig filtern und modulieren können und in Kombination (Nettoeffekt) wirken (z. B. (115)).

Ob diese Faktoren sequentiell als Trigger fungieren oder konzertiert agieren ist in dieser Arbeit nicht geklärt worden. Die Analyse ist erschwert, wenn die Transdifferenzierung das Endergebnis des Nettoeffekts multipler Signalweginteraktionen darstellt, welches rückwirkend nicht nachvollziehbar ist solange die einzelnen Parameter unbekannt sind.

Studien über die Aktivierbarkeit naiver CD4⁺T-Zellen durch einen TZR-Bypass (Zytokinkombination IL-12/18) deuten auf eine enge Verflechtung und Interaktion des erworbenen und adaptiven Immunsystems hin (12). Dies lässt vermuten, dass es unter Umständen verschiedene wirksame Trigger-Kombinationen (Mikroenvironments) gibt, d. h. über unterschiedliche Signalwege würde in Summe dasselbe Outcome provoziert werden können. So ermöglichen die Integrine (LFA-1, VLA-5, LFA-3 und VLA-4), die V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen auf Ihrer Oberfläche tragen, neben der Diapedese und Migration in entzündetes Gewebe, auch die stabile Interaktion mit ICAM-1-positiven APCs (s. Review (62)) und der ECM (z. B. Fibronectin, Kollagen (116)). Insbesondere für die T-Zell-APC-Interaktion konnte gezeigt werden, dass durch Chemokin-vermittelte Aktivierung von LFA-1 auf T-Zellen die Bindung zu aktivierten APCs sowie die Ausbildung der immunologischen Synapse ermöglicht und die Interaktionsdauer (TZR-mediertes Signaling) verlängert werden kann (s. (117) und Review (62)). Diese Rolle der Integrine als Stabilisatoren wäre theoretisch auch im Kontext der Interaktion von Progenitoren untereinander oder mit myeloiden Zellen denkbar, wo die als Amplifier für Signale von Notch/Notch-Liganden, LFA-3/CD2- oder MICA/TZR-Interaktion wirken könnten (s. auch (28)). Die Präsenz von Integrinen auf V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen ist jedoch nur ein Faktor aus dem Spektrum möglicher Komponenten eines multidimensionalen Dialogs (ECM) den der Progenitoren mit seiner Umwelt führt (118–120).

Wie bereits in (20) beschrieben entsprechen V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen dem thymischen Reifestadium D1-2 vor der bifurkalen Entscheidung (s. Genexpressionsanalysen der thymischen Schlüsselkomponenten) und exprimieren kein/sehr wenig Rag in der Standardkultur. Zusätzlich konnte durch den Support mit murinem Stroma allein (MS-5) keine Transdifferenzierung initiiert werden. Im dichten 3D-Kontext der Transdifferenzierungsexperimente mit Zellkulturüberständen von Immunzellen wurde die Transdifferenzierung jedoch wahrscheinlicher. Das deutet darauf hin, dass selbst in einem „Thymus-like“ Mikroenvironment vor allem intrinsische Gegebenheiten determinieren, ob und wann ein V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klon transdifferenziert.

Weil V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen in der Standardkultur kein CD40 exprimieren, welches als essenziell für die Rag-Induktion bei der TZR-Revision berichtet wurde (103), ist in der Standardkultur auch nicht von der Initiation der TZR-Revision auszugehen. Basierend auf den

4. DISKUSSION

in silico Untersuchungen zur spenderindividuellen TZR δ 1-MICA-Affinität (s. (59)) kann zudem davon ausgegangen werden, dass die TZR δ 1-MICA-Bindung nicht spenderindividuell ist (s. auch (23, 121)). Kristallographische Analysen der räumlichen Anordnung des murinen Liganden T22 oder von CD1d-Sulfatid mit dem entsprechenden $\gamma\delta$ TZR (T8 oder DP10.7) zeigen, dass nur die CDR3-Region der TZR δ -Kette mit dem Liganden interagiert (122–124). Weil somit davon auszugehen ist, dass $\alpha\beta$ TZR und $\gamma\delta$ TZR ihre Liganden unterschiedlich binden (28, 123, 125) wäre auch möglich, dass die beiden TZR-Ketten des $\gamma\delta$ TZR keine gemeinsame Bindungsregion (wie für den $\alpha\beta$ TZR bekannt) bilden, sondern dass neben MICA über die TZR δ -Kette noch ein weiterer Ligand durch die CDR3-Region der TZR γ -Kette gebunden werden muss um den Rezeptor zu aktivieren (23, 28).

Da $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen auch Chemokinrezeptoren, die zur Inflammation leiten, exprimieren und zudem vermehrt in entzündetem Gewebe nachgewiesen werden konnten (20), pro-inflammatorische Zytokine allein die Transdifferenzierung aber nicht initiieren konnten, könnte ein möglicher physiologischer Kontext der Transdifferenzierung, wie Eingangs erwähnt (1.3.3), das Milieu der Wundheilung sein.

Mit dem Abklingen der Inflammation sterben T-Effektorzellen ab und werden abgebaut (106). Die durch diesen Verlust verursachte Notwendigkeit neuer naiver $\alpha\beta$ T-Zellen ist eine Änderung des Mikroenvironments die einen möglichen Transdifferenzierungstrigger darstellen könnte. Laut Ellis und Kollegen wird die Remodellierungsphase unter anderem initiiert durch die Apoptose und Phagozytose von Effektorzellen (Neutrophilen) sowie weiteren Signalen (Glukocortikoiden, IL-10, Prostaglandine, T_{reg} -Zellen, miRNA), wodurch die Transition von Makrophagen in einen anti-inflammatorischen Aktionsmodus (M2) bewirkt wird ((126) und im Review (106)). Anti-inflammatorische Makrophagen aktivieren wiederum Keratinozyten und Fibroblasten und stimulieren sie zur Proliferation (106, 126). Die Kommunikation zwischen anti-inflammatorischen Makrophagen, Keratinozyten und Fibroblasten findet dabei unter anderem über EGF, TGF- α , VEGF sowie PDGF, IL-1, IL-6, KGF und Fibronectin statt (106). MMPs spielen dabei eine Rolle für den Abbau von Kollagen III des Granulationsgewebes (106). Durch diese Veränderungen der Mikroumgebung könnten möglicherweise auch $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen zur Differenzierung gebracht werden. Weil $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen zudem selbst phagozytieren können, könnte die Phagozytose von z. B. seneszenten/apoptotischen $\alpha\beta$ T-Effektorzellen (*Activation Induced Cell Death*), analog zur Umprogrammierung von Makrophagen durch die Effektorlyse in der Remodellierungsphase (s. oben und Review von (126))), eine Komponente der Initiation der Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen darstellen.

Physiologisch sind Immunzellen nur im Gewebe in Kontakt mit ECM (Kollagen), was bedeutet, dass eine Lair-1-medierte Inhibition/Dämpfung aktivierender TZR-vermittelter Signale erst hier stattfinden kann bzw. notwendig ist (60). Es wurde berichtet, dass über Lair-1 möglicherweise ein Mechanismus zur Selektion aktivierender Signale gebildet wird (60): der Threshold für unspezifische (schwächere) Aktivierungen wird erhöht, wohingegen spezifische (stärkere) Aktivierungen diesen Threshold übersteigen und damit unbeeinflusst bleiben (60). Weil wir zeigen konnten, dass die Transdifferenzierung durch

Kultur von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen auf Kollagen nicht verhindert wird, kann man davon ausgehen, dass entweder der Wegfall inhibitorischer Signale für die Initiation der Transdifferenzierung von $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen notwendig ist, oder dass in diesem Setting stark aktivierende (spezifische) Signale den Lair-1-medierten Threshold übersteigen. Weil geringe Mengen an gesheddetem MICA auch im Sekretom ruhender PBMCs und $\alpha\beta$ T-Zellen nachweisbar waren, kann von einer permanenten niedrigschwelligen Inhibition des TZR-Signalings im nicht-inflammatorischen Zustand ausgegangen werden (30). Die permanente Präsenz von gesheddetem MICA/B im gesunden physiologischen Kontext kann somit analog zum oben beschriebenen Selektionsmechanismus der Signalstärke durch Lair-1 interpretiert werden (s. Abschnitt 1.3.2). Die von Steinbrück und Kollegen berichtete TZR-Signaling-induzierte Aktivierung des Notch-Signalwegs könnte erklären, wie auch unabhängig von der Anwesenheit von Notch-Liganden das für die thymische T-Zell-Entwicklung als essenziell beschriebene Notch-Signaling initiiert werden könnte (52).

Im Kontext der Proliferation/Remodellierung einer Wunde wird Kollagen sowohl abgebaut (Kollagen III) als auch aufgebaut (Kollagen I) und Lair-1 unterschiedlich hoch exprimiert (127). Im Mausmodell der Wundheilung wurde außerdem gezeigt, dass die Lair-1-Konzentration nach der Verletzung möglicherweise durch Infiltration von Makrophagen anstieg, an Tag 3 maximal war und nach ca. 10 Tagen wieder auf das Ausgangsniveau zurückging (127). Somit wäre die stärkste Lair-1-vermittelte Dämpfung und Filterung der Signalstärke in der Inflammationsphase (Tag 1-3) zu erwarten (106). Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Expression von MICA bei $\alpha\beta$ T-Zellen durch Stimulation über PHA oder über CD3 bzw. CD28 und PMA induzierbar ist (128)). Es wäre somit denkbar, dass $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen in der Inflammationsphase über MICA, ihren spezifischen Liganden, zunächst sehr spezifisch stimuliert werden. Weil MMPs vor allem nach der Inflammationsphase aktiv sind (129), kann man annehmen, dass bei der Auflösung der Inflammation gesteigerte Mengen an gesheddetem MICA vorhanden sind und das TZR-medierte Signaling in $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen dadurch wiederum stark abnimmt. Diese sequenzielle Abfolge einer spezifischen Aktivierung und nachfolgender Inhibition/Dämpfung könnte in Kombination mit den zuvor genannten Faktoren das physiologische Korrelat zum experimentellen Setting der Transdifferenzierungsexperimente sein: erst Stimulation zur Proliferation in der Standardkultur, die einer milden Inflammation entspricht, dann im Experiment nur noch minimale Stimulation (Sekretomkomponenten von Immunzellen, niedrige Konzentration von IL-2 und IL-7). Auch der frühe Zeitpunkt, an dem die Entscheidung getroffen wird, ob eine Transdifferenzierung erfolgt entspricht, mit 3-10 Tagen, in etwa der Dauer einer „kompletten“ Wundheilung (106).

In den Experimenten mit präkonditionierten Medien zeigte sich, dass nicht jeder frisch isolierte Klon und insgesamt auch nicht jeder Klon reproduzierbar zur Transdifferenzierung gebracht werden konnte. Durch die auf molekularer Ebene (Genexpressions- und Proteinebene) nachgewiesene Heterogenität der $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Klone (s. oben) und basierend auf dem Vergleich der CDR3-Sequenzen der TZR $V\delta 1$ -Kette peripherer und

4. DISKUSSION

kultivierter $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen muss davon ausgegangen werden, dass die Isolation und Kulturbedingungen auf verschiedene Klone unterschiedliche Auswirkungen haben. Bei der Isolation werden die Zellen sowohl unspezifischen mechanischen Kräften (Pipettieren oder das Spülen aus der MACS-Säule) als auch spezifischen (TZR-medierten) Signalen, durch die Verwendung von $\alpha TZR/V\delta 1$ -Antikörpern, ausgesetzt. Obwohl möglich, zeigen die Klone nach (langer) *ex vivo* Kultur ($CD27^-CD28^-$), aber auch im Verlauf der Transdifferenzierungsexperimente (wachsende Population mit geringer Markerexpression), Zeichen der replikativen Seneszenz (s. sinkende Telomeraseaktivität in (109)). Der Einsatz frischer, möglichst wenig stimulierter Zellen (evtl. Untersuchung und Monitoring von CD31 als Marker von „truly naive“T-Zellen (109)) für zukünftige Transdifferenzierungsexperimente wäre deshalb sicherlich von Vorteil.

Weil die thymische T-Zellentwicklung komplex und speziesspezifisch ist (z. B. Notch und TZR), primäres Thymusstroma jedoch nur unzureichend von Progenitoren depletiert (schlechte Reproduzierbarkeit durch hohe experimentelle Varianz) und außerdem nicht im autologen System gearbeitet werden kann, wären experimentelle Ansätze im physiologischen spatio-temporalen Kontext des Thymus zwar vielversprechend, aber nicht machbar (130–140). In anderen *in vitro* Systemen, unter Verwendung von murinem Stroma (OP9-hDL), autologen Fibroblasten oder noch weiter reduzierten Ansätzen (definierte Mengen an oberflächengebundenem Dll4 + Supplementen), konnten zwar aus hämatopoetischen Vorläuferzellen oder DN3-Thymozyten proT-Zellen und DP Thymozyten generiert werden, allerdings war die Differenzierungsbereitschaft gering und teilweise nur aus bereits differenzierten Progenitorstadien und nicht direkt aus HSPCs induzierbar (49–51).

Für das experimentelle Setting der *in vitro* Untersuchungen der Transdifferenzierung stellte sich heraus, dass der Einsatz von Zellkulturüberständen (basierend auf unterschiedlichen Zellkulturmedien), die Dauer der Präkonditionierungsphase und die Zelldichte während der Präkonditionierung den Zustand (Morphologie, Viabilität, Transdifferenzierung) des $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zell-Progenitors beeinflusst. Zum Erhalt der Reproduzierbarkeit sollten zukünftige Experimente deshalb durch 5-7-tägige Präkonditionierung von standardisierbarem (da FCS-freiem s. (112)) RB27-Zellkulturmedium aus frisch isolierten, ruhenden PBMCs/ $\alpha\beta$ T-Zellen generiert werden. Basierend auf den Ergebnissen von (112) und den in dieser Arbeit berichteten Untersuchungen sollten künftige Experimente in einer hohen räumlichen Nähe der Zellen (3D-Kontext ermöglicht (homotypische) Assoziation) angesetzt werden. Da die Transdifferenzierung auch ohne Einsatz von Feederzellen ablaufen kann, wäre in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit indiziert, keine Feederzellen einzusetzen und anstelle dessen auf xenogenen Stromasupport zurückzugreifen (MS-5). Zur Untersuchung ob und inwiefern der intrinsische Zustand einzelner Progenitoren ihre Bereitschaft zur Transdifferenzierung bestimmt, wäre der Ansatz eines größeren Volumens Zellkulturüberstände, aus dem folglich einzelne kryokonservierte Aliquots entnommen werden können, eine vielversprechende Option. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass evtl. einzelne Komponenten des Sekretoms empfindlich

auf die Kryokonservierung reagieren können. Zur Kontrolle könnten einzelne Aliquots per Proteomanalyse analysiert und für künftigen Analysen gemonitored werden.

Darüber hinaus wäre die Untersuchung mehrerer V δ 1⁺CD4⁺Klone aus verschiedenen Settings auf Proteom- (z. B. via Massenspektrometrie oder CyTOF) und Transkriptomebene ((single-cell)RNA-Seq) interessant, weil so neben den bereits identifizierten potentiellen Targetmolekülen auch unbekannte Moleküle für retrospektive Analysen untersuchbar wären. Dabei ist vor allem von Interesse, auch post-transkriptionelle (miRNA bei der thymischen T-Zellentwicklung s. (141)) und post-translationale Regulationsmechanismen zu untersuchen (z. B. gesheddetes MICA, Notch-Liganden über MMPs), weil diese bei reinen Transkriptomanalysen auf mRNA-Ebene im Verborgenen bleiben (47). Beispielsweise könnten aus dem Vergleich (und der Kombination) der Standardkultur, der Exposition mit Zellkulturüberständen bzw. reinem Zellkulturmedium oder einem engen 3D-Kontext Rückschlüsse auf die Auswirkungen der einzelnen Konditionen auf V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone gemacht werden. Auch die Heterogenität der V δ 1⁺CD4⁺T-Zell-Klone könnte so umfassender charakterisiert werden.

Die Untersuchung der Transdifferenzierung von V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen im ATO-System nach (112) hat das Potential viele funktionale naive T-Zellen zu generieren, welche durch autologe MHC-Moleküle selektioniert werden können. Die Entwicklung einer reproduzierbaren, standardisierbaren Methode zur Generierung eines naiven T-Zellpools aus V δ 1⁺CD4⁺T-Zellen wäre sowohl für die Grundlagenforschung als auch im Kontext der personalisierten Therapie immunsupprimierter (T-Zell-deprivierter) Patienten von herausragender Bedeutung.

5. Literatur

1. K. Murphy, C. W. *Janeway Immunologie* (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2018).
2. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. & Cell. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (Feb. 2006).
3. Hollander, G. A., Krenger, W. & Blazar, B. R. Emerging strategies to boost thymic function. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 443–53 (Aug. 2010).
4. Arstila, T. P. u. a. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**, 958–61 (Okt. 1999).
5. Alberts, B. u. a. *Molecular Biology of the Cell - 5th edition* 5. Aufl. (Garland Science, New York, 2008).
6. Laydon, D. J., Bangham, C. R. & Asquith, B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, 20140291 (Aug. 2015).
7. Lefranc, M.-P. L. G. *The T Cell Receptor FactsBook* (Academic Press, San Diego, Calif, 2001).
8. <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/genetable/human/geneNumber.html>.
9. Chien, Y. H., Meyer, C. & Bonneville, M. gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol* **32**, 121–55 (März 2014).
10. Trickett, A. & Kwan, Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of immunological methods* **275**, 251–255 (1-2 Apr. 2003).
11. Ohtsuka, T., Kaziro, Y. & Satoh, T. Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. *Biochimica et biophysica acta* **1310**, 223–232 (2 Feb. 1996).
12. Munk, R. B. u. a. Antigen-independent IFN-gamma production by human naive CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18. *PLoS One* **6** (Hrsg. Klinman, D.) e18553 (Mai 2011).
13. Stone, J. D., Chervin, A. S. & Kranz, D. M. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* **126**, 165–76 (Feb. 2009).
14. Globerson, A. Thymocytopoiesis in aging: the bone marrow-thymus axis. *Arch Gerontol Geriatr* **24**, 141–55 (März 1997).
15. Ciofani, M. & Zuniga-Pflucker, J. C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 463–93 (Nov. 2007).

16. Steinmann, G. G., Klaus, B. & Muller-Hermelink, H. K. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* **22**, 563–75 (Nov. 1985).
17. Lynch, H. E. *u. a.* Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* **30**, 366–73 (Juli 2009).
18. Parker, C. M. *u. a.* Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *The Journal of experimental medicine* **171**, 1597–1612 (5 Mai 1990).
19. Chowers, Y., Holtmeier, W., Harwood, J., Morzycka-Wroblewska, E. & Kagnoff, M. F. The V delta 1 T cell receptor repertoire in human small intestine and colon. *J Exp Med* **180**, 183–90 (Juli 1994).
20. Ziegler, H. *u. a.* Human Peripheral CD4(+) Vdelta1(+) gammadeltaT Cells Can Develop into alphabetaT Cells. *Front Immunol* **5**, 645 (Dez. 2014).
21. Johnson, M. D., Witherden, D. A. & Havran, W. L. The Role of Tissue-resident T Cells in Stress Surveillance and Tissue Maintenance. *Cells* **9**, 686 (3 März 2020).
22. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* **13**, 88–100 (2 Feb. 2013).
23. Groh, V., Steinle, A., Bauer, S. & Spies, T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* **279**, 1737–40 (März 1998).
24. Spada, F. M. *u. a.* Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* **191**, 937–48 (März 2000).
25. Tanaka, Y. *u. a.* Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* **375**, 155–8 (Mai 1995).
26. Davey, M. S. *u. a.* Clonal selection in the human Vdelta1 T cell repertoire indicates gammadelta TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat Commun* **8**, 14760 (März 2017).
27. Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S. & Anderson, G. Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nature reviews. Immunology* **17**, 295–305 (5 Mai 2017).
28. Deseke, M. & Prinz, I. Ligand recognition by the $\gamma\delta$ TCR and discrimination between homeostasis and stress conditions. *Cellular & molecular immunology* **17**, 914–924 (9 Sep. 2020).
29. Hendriks, J. *u. a.* CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature Immunology* **1**, 433–440 (Nov. 2000).
30. Salih, H. R., Rammensee, H. G. & Steinle, A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* **169**, 4098–102 (Okt. 2002).

5. Literatur

31. Ferrari de Andrade, L. *u. a.* Inhibition of MICA and MICB Shedding Elicits NK-Cell-Mediated Immunity against Tumors Resistant to Cytotoxic T Cells. *Cancer immunology research* **8**, 769–780 (6 Juni 2020).
32. Beer, L. *u. a.* Analysis of the Secretome of Apoptotic Peripheral Blood Mononuclear Cells: Impact of Released Proteins and Exosomes for Tissue Regeneration. *Sci Rep* **5**, 16662 (Nov. 2015).
33. Beer, L., Mildner, M., Gyongyosi, M. & Ankersmit, H. J. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis* **21**, 1336–1353 (Okt. 2016).
34. Wagner, T. *u. a.* Different pro-angiogenic potential of gamma-irradiated PBMC-derived secretome and its subfractions. *Sci Rep* **8**, 18016 (Dez. 2018).
35. Al-Dabbagh, S. *u. a.* The lymphocyte secretome from young adults enhances skeletal muscle proliferation and migration, but effects are attenuated in the secretome of older adults. *Physiol Rep* **3**, e12518 (Nov. 2015).
36. Yarilin, A. A. & Belyakov, I. M. Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr Med Chem* **11**, 447–64 (Feb. 2004).
37. Petrie, H. T. & Zuniga-Pflucker, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* **25**, 649–79 (Apr. 2007).
38. Yui, M. A. & Rothenberg, E. V. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat Rev Immunol* **14**, 529–45 (Juli 2014).
39. Staal, F. J., Weerkamp, F., Langerak, A. W., Hendriks, R. W. & Clevers, H. C. Transcriptional control of T lymphocyte differentiation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **19**, 165–179 (3 2001).
40. Taghon, T. & Rothenberg, E. V. Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha-beta and TCR-gammadelta T cell development. *Semin Immunopathol* **30**, 383–98 (Okt. 2008).
41. Porritt, H. E. *u. a.* Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* **20**, 735–745 (6 Juni 2004).
42. Campese, A., Bellavia, D., Gulino, A. & Screpanti, I. Notch signalling at the crossroads of T cell development and leukemogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **14**, 151–157 (Apr. 2003).
43. Van de Walle, I. *u. a.* An early decrease in Notch activation is required for human TCR-alpha-beta lineage differentiation at the expense of TCR-gammadelta T cells. *Blood* **113**, 2988–98 (März 2009).
44. Garcia-Leon, M. J., Fuentes, P., de la Pompa, J. L. & Toribio, M. L. Dynamic regulation of NOTCH1 activation and Notch ligand expression in human thymus development. *Development* **145**, dev165597 (Juli 2018).

45. Reizis, B. & Leder, P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16**, 295–300 (Feb. 2002).
46. Groot, A. J. & Vooijs, M. A. The role of Adams in Notch signaling. *Adv Exp Med Biol* **727**, 15–36 (2012).
47. Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M. & Hammad, H. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nature reviews. Immunology* **18**, 745–758 (12 Dez. 2018).
48. Schmitt, T. M. & Zuniga-Pflucker, J. C. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* **17**, 749–56 (Dez. 2002).
49. Mohtashami, M., Shah, D. K., Kianizad, K., Awong, G. & Zuniga-Pflucker, J. C. Induction of T-cell development by Delta-like 4-expressing fibroblasts. *Int Immunol* **25**, 601–11 (Aug. 2013).
50. Gehre, N. *u. a.* A stromal cell free culture system generates mouse pro-T cells that can reconstitute T-cell compartments in vivo. *Eur J Immunol* **45**, 932–42 (Dez. 2015).
51. Tussiwand, R. *u. a.* The preTCR-dependent DN3 to DP transition requires Notch signaling, is improved by CXCL12 signaling and is inhibited by IL-7 signaling. *Eur J Immunol* **41**, 3371–80 (Okt. 2011).
52. Steinbuck, M. P., Arakcheeva, K. & Winandy, S. Novel TCR-Mediated Mechanisms of Notch Activation and Signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **200**, 997–1007 (3 Feb. 2018).
53. Lundberg, V. *u. a.* Thymic exosomes promote the final maturation of thymocytes. *Scientific reports* **6**, 36479 (Nov. 2016).
54. Fink, P. J. & McMahan, C. J. Lymphocytes rearrange, edit and revise their antigen receptors to be useful yet safe. *Immunol Today* **21**, 561–6 (Nov. 2000).
55. Hale, J. S. & Fink, P. J. T-cell receptor revision: friend or foe? *Immunology* **129**, 467–73 (Feb. 2010).
56. Higdon, L. E., Deets, K. A., Friesen, T. J., Sze, K. Y. & Fink, P. J. Receptor revision in CD4 T cells is influenced by follicular helper T cell formation and germinal-center interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5652–7 (März 2014).
57. Cerutti, A. *u. a.* CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **160**, 2145–2157 (5 März 1998).
58. Lim, K. *TCR Signaling in Vδ1+ CD4+ T Cell Clones* Magisterarb. (Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Sep. 2017).

5. Literatur

59. Heister, D. J. *Identifikation spenderindividueller MICA-Varianten und ihr Bindungsverhalten an invariante V delta 1+ gamma delta T-Zell-Rezeptoren in computer-gestützter Bindungssimulation* Dissertation (Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, Jan. 2020).
60. Lebbink, R. J. *u. a.* Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med* **203**, 1419–25 (Juni 2006).
61. Meyaard, L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J Leukoc Biol* **83**, 799–803 (Jan. 2008).
62. Pribila, J. T., Quale, A. C., Mueller, K. L. & Shimizu, Y. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* **22**, 157–80 (Apr. 2004).
63. Burbach, B. J., Medeiros, R. B., Mueller, K. L. & Shimizu, Y. T-cell receptor signaling to integrins. *Immunol Rev* **218**, 65–81 (Aug. 2007).
64. Eming, S. A., Krieg, T. & Davidson, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 514–525 (3 März 2007).
65. Burgess, R. J., Agathocleous, M. & Morrison, S. J. Metabolic regulation of stem cell function. *Journal of internal medicine* **276**, 12–24 (1 Juli 2014).
66. Kassambara, A. *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots* R package version 0.4.0 (2020).
67. Warnes, G. R., Bolker, B. & Lumley, T. *gtools: Various R Programming Tools* R package version 3.8.2 (2020).
68. Dowle, M. & Srinivasan, A. *data.table: Extension of 'data.frame'* R package version 1.12.8 (2019).
69. Dahl, D. B., Scott, D., Roosen, C., Magnusson, A. & Swinton, J. *xtable: Export Tables to LaTeX or HTML* R package version 1.8-4 (2019).
70. Wickham, H. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software* **40**, 1–29 (2011).
71. Wickham, H. & Seidel, D. *scales: Scale Functions for Visualization* R package version 1.1.1 (2020).
72. Kolde, R. *pheatmap: Pretty Heatmaps* R package version 1.0.12 (2019).
73. Ooms, J. *writexl: Export Data Frames to Excel 'xlsx' Format* R package version 1.3 (2020).
74. Pedersen, T. L. *ggforce: Accelerating 'ggplot2'* R package version 0.3.1 (2019).
75. Ram, K. & Wickham, H. *wesanderson: A Wes Anderson Palette Generator* R package version 0.3.6 (2018).
76. Wickham, H. & Bryan, J. *readxl: Read Excel Files* R package version 1.3.1 (2019).

77. Neuwirth, E. *RColorBrewer: ColorBrewer Palettes* R package version 1.1-2 (2014).
78. Wickham, H. *forcats: Tools for Working with Categorical Variables (Factors)* R package version 0.5.0 (2020).
79. Wickham, H. *stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations* R package version 1.4.0 (2019).
80. Wickham, H., François, R., Henry, L. & Müller, K. *dplyr: A Grammar of Data Manipulation* R package version 0.8.5 (2020).
81. Henry, L. & Wickham, H. *purrr: Functional Programming Tools* R package version 0.3.4 (2020).
82. Wickham, H., Hester, J. & François, R. *readr: Read Rectangular Text Data* R package version 1.3.1 (2018).
83. Wickham, H. & Henry, L. *tidyr: Tidy Messy Data* R package version 1.0.3 (2020).
84. Müller, K. & Wickham, H. *tibble: Simple Data Frames* R package version 3.0.1 (2020).
85. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer-Verlag New York, 2016).
86. Wickham, H. *u. a.* Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software* **4**, 1686 (2019).
87. Salles, A. *u. a.* Barcoding T cell calcium response diversity with methods for automated and accurate analysis of cell signals (MAAACS). *PLoS Comput Biol* **9** (Hrsg. Altan-Bonnet, G.) e1003245 (Sep. 2013).
88. Mane, V. P., Heuer, M. A., Hillyer, P., Navarro, M. B. & Rabin, R. L. Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. *J Biomol Tech* **19**, 342–7 (2008).
89. Bian, Z. *u. a.* RPL13A as a reference gene for normalizing mRNA transcription of ovarian cancer cells with paclitaxel and 10-hydroxycamptothecin treatments. *Mol Med Rep* **11**, 3188–94 (Dez. 2015).
90. Lefranc, M.-P. Immunoglobulin and T Cell Receptor Genes: IMGT(®) and the Birth and Rise of Immunoinformatics. *Frontiers in immunology* **5**, 22 (2014).
91. Lefranc, M.-P. *u. a.* IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic acids research* **43**, D413–D422 (Database issue Jan. 2015).
92. Di Lorenzo, B., Ravens, S. & Silva-Santos, B. High-throughput analysis of the human thymic Vdelta1(+) T cell receptor repertoire. *Sci Data* **6**, 115 (Juli 2019).
93. Shitara, S. *u. a.* IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **190**, 6173–6179 (12 Juni 2013).

5. Literatur

94. Laky, K., Lefrancois, L., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Puddington, L. The role of IL-7 in thymic and extrathymic development of TCR gamma delta cells. *J Immunol* **161**, 707–13 (1998).
95. Heufler, C. *u. a.* Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *The Journal of experimental medicine* **178**, 1109–1114 (3 Sep. 1993).
96. Curtis, K. M. *u. a.* EF1alpha and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *BMC Mol Biol* **11**, 61 (2010).
97. Morrow, M. A., Mayer, E. W., Perez, C. A., Adlam, M. & Siu, G. Overexpression of the Helix-Loop-Helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages. *Molecular immunology* **36**, 491–503 (8 Juni 1999).
98. Zhang, B., Lin, Y.-Y., Dai, M. & Zhuang, Y. Id3 and Id2 act as a dual safety mechanism in regulating the development and population size of innate-like $\gamma\delta$ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **192**, 1055–1063 (3 Feb. 2014).
99. Oswald, F. *u. a.* SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *The EMBO journal* **21**, 5417–5426 (20 Okt. 2002).
100. Giebel, B. & Wodarz, A. Notch signaling: numb makes the difference. *Current biology : CB* **22**, R133–R135 (4 Feb. 2012).
101. Maeda, T. *u. a.* Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 860–866 (5826 Mai 2007).
102. Munroe, M. E. & Bishop, G. A. A costimulatory function for T cell CD40. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 671–682 (2 Jan. 2007).
103. Vaitaitis, G. M., Poulin, M., Sanderson, R. J., Haskins, K. & Wagner, D. H. Cutting edge: CD40-induced expression of recombination activating gene (RAG) 1 and RAG2: a mechanism for the generation of autoaggressive T cells in the periphery. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**, 3455–3459 (7 Apr. 2003).
104. Jung, S. H. *u. a.* ARAP, a Novel Adaptor Protein, Is Required for TCR Signaling and Integrin-Mediated Adhesion. *J Immunol* **197**, 942–52 (Juni 2016).
105. Meyaard, L. *u. a.* LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* **7**, 283–290 (2 Aug. 1997).
106. Ellis, S., Lin, E. J. & Tartar, D. Immunology of Wound Healing. *Current dermatology reports* **7**, 350–358 (4 2018).
107. Li, N. *u. a.* Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *The EMBO journal* **26**, 494–504 (2 Jan. 2007).
108. Cardone, J., Le Friec, G. & Kemper, C. CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clinical and experimental immunology* **164**, 301–311 (3 Juni 2011).

109. Larbi, A. & Fulop, T. From "truly naïve" to exhausted senescent T cells: when markers predict functionality. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **85**, 25–35 (1 Jan. 2014).
110. Frigoul Aurélie; Lefranc, M.-P. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. *Recent Res. Devel. Human Genet.* **3**, 95–145 (2005).
111. Klussmeier, A. *u. a.* High-Throughput MICA/MICB Genotyping of Over Two Million Samples: Workflow and Allele Frequencies. *Frontiers in immunology* **11**, 314 (2020).
112. Seet, C. S. *u. a.* Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids. *Nat Methods* **14**, 521–530 (Apr. 2017).
113. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences* **41**, 211–218 (3 März 2016).
114. Wegner, J. *u. a.* High-density preculture of PBMCs restores defective sensitivity of circulating CD8 T cells to virus- and tumor-derived antigens. *Blood* **126**, 185–194 (2 Juli 2015).
115. Almeida, A. R. M., Rocha, B., Freitas, A. A. & Tanchot, C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Seminars in immunology* **17**, 239–249 (3 Juni 2005).
116. Roberts, A. I., Brolin, R. E. & Ebert, E. C. Integrin alpha1beta1 (VLA-1) mediates adhesion of activated intraepithelial lymphocytes to collagen. *Immunology* **97**, 679–85 (Aug. 1999).
117. Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M. & Germain, R. N. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 1873–1876 (5574 Juni 2002).
118. Shimaoka, M. *u. a.* Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* **112**, 99–111 (Jan. 2003).
119. Binnerts, M. E., van Kooyk, Y., Simmons, D. L. & Figdor, C. G. Distinct binding of T lymphocytes to ICAM-1, -2 or -3 upon activation of LFA-1. *Eur J Immunol* **24**, 2155–60 (Sep. 1994).
120. Hubbard, A. K. & Rothlein, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* **28**, 1379–86 (Mai 2000).
121. Steinle, A., Groh, V. & Spies, T. Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12510–12515 (21 Okt. 1998).

5. Literatur

122. Adams, E. J., Chien, Y.-H. & Garcia, K. C. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 227–231 (5719 Apr. 2005).
123. Champagne, E. $\gamma\delta$ T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **59**, 117–137 (2 Apr. 2011).
124. Luoma, A. M. *u. a.* Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells. *Immunity* **39**, 1032–42 (Dez. 2013).
125. Wingren, C., Crowley, M. P., Degano, M., Chien, Y. & Wilson, I. A. Crystal structure of a gammadelta T cell receptor ligand T22: a truncated MHC-like fold. *Science (New York, N.Y.)* **287**, 310–314 (5451 Jan. 2000).
126. Elliott, M. R., Koster, K. M. & Murphy, P. S. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **198**, 1387–1394 (4 Feb. 2017).
127. Carvalheiro, T. *u. a.* Leukocyte Associated Immunoglobulin Like Receptor 1 Regulation and Function on Monocytes and Dendritic Cells During Inflammation. *Frontiers in immunology* **11**, 1793 (2020).
128. Molinero, L. L., Fuertes, M. B., Rabinovich, G. A., Fainboim, L. & Zwirner, N. W. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol* **71**, 791–7 (2002).
129. Caley, M. P., Martins, V. L. C. & O'Toole, E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in wound care* **4**, 225–234 (4 Apr. 2015).
130. Freedman, A. R., Zhu, H., Levine, J. D., Kalams, S. & Scadden, D. T. Generation of human T lymphocytes from bone marrow CD34+ cells in vitro. *Nat Med* **2**, 46–51 (Jan. 1996).
131. Gardner, J. P. *u. a.* T-lymphopoietic capacity of cord blood-derived CD34+ progenitor cells. *Exp Hematol* **26**, 991–9 (1998).
132. Pawelec, G., Muller, R., Rehbein, A., Hahnel, K. & Ziegler, B. L. Extrathymic T cell differentiation in vitro from human CD34+ stem cells. *J Leukoc Biol* **64**, 733–9 (Dez. 1998).
133. Galy, A., Verma, S., Barcena, A. & Spits, H. Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J Exp Med* **178**, 391–401 (Aug. 1993).
134. Anderson, G., Jenkinson, E. J., Moore, N. C. & Owen, J. J. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* **362**, 70–3 (März 1993).

135. Barcena, A. *u. a.* Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T- and myeloid-cell development. *Blood* **82**, 3401–14 (1993).
136. Barcena, A. *u. a.* Lymphoid and myeloid differentiation of fetal liver CD34+lineage-cells in human thymic organ culture. *J Exp Med* **180**, 123–32 (Juli 1994).
137. Fisher, A. G. *u. a.* Human thymocyte development in mouse organ cultures. *Int Immunol* **2**, 571–8 (1990).
138. Yeoman, H. *u. a.* Human bone marrow and umbilical cord blood cells generate CD4+ and CD8+ single-positive T cells in murine fetal thymus organ culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10778–82 (Nov. 1993).
139. Res, P. *u. a.* CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* **87**, 5196–206 (Juni 1996).
140. Plum, J., De Smedt, M., Defresne, M. P., Leclercq, G. & Vandekerckhove, B. Human CD34+ fetal liver stem cells differentiate to T cells in a mouse thymic microenvironment. *Blood* **84**, 1587–93 (Sep. 1994).
141. Ghisi, M. *u. a.* Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood* **117**, 7053–62 (Juni 2011).

A. Anhang

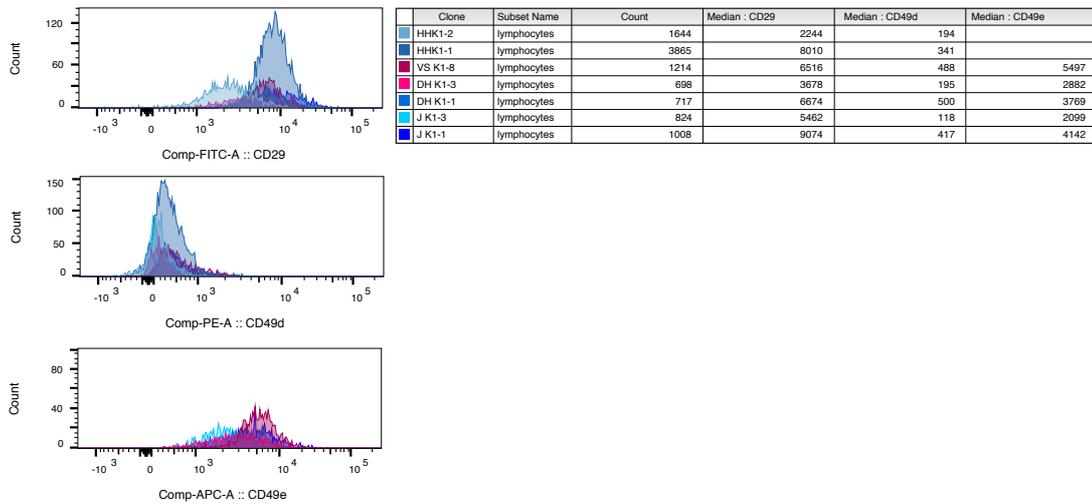


Abbildung A.1.: Untersuchung auf Vorhandensein von membrangebundenem VLA4 und VLA5. Histogramme von CD29, CD49d und CD49e Oberflächenmarkern auf $V\delta 1^+CD4^+$ -Zellklonen.

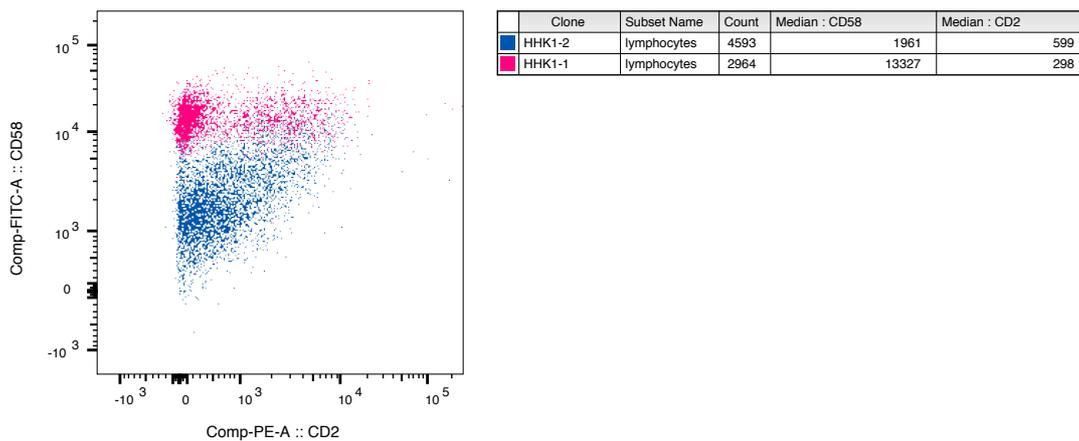


Abbildung A.2.: Dot-Plot der CD2- und CD58-Signale auf zwei $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klonen. Durchflusszytometrische Analyse auf das Vorhandensein von CD2 und CD58 (LFA-3) auf zwei $V\delta 1^+CD4^+$ -Zell-Klonen.