

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung I (Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie,
Hämatologie/Onkologie)

**In vitro Differenzierung V δ 1-positiver T-Zellen in $\alpha\beta$ T-Zellen
aus der $\alpha\beta$ T-Zell-depletierten mononukleären Zellfraktion
des Peripherblutes gesunder Spender**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von

Cin, Harun

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schilbach
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Schluesener

Tag der Disputation: 18.07.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung	6
1.1 Das (adaptive) Immunsystem	6
1.2 Zellen des adaptiven Immunsystems.....	7
1.3 T-Lymphozyten und MHC-Klassen	8
1.4 T-Zell-Rezeptor-Generierung durch somatische DNA-Rekombination.....	10
1.5 $\alpha\beta^+$ TCR.....	11
1.6 Complementary-determining regions.....	12
1.7 Public TCRs und ihre Entstehung	12
1.7.1 „private“ und „public“ TCRs.....	12
1.7.2 Eigenschaften von public TCRs.....	13
1.7.3 Konvergierende Rekombination	14
1.7.4 Public T-Zell-Antworten im Rahmen von chronischen Erkrankungen	14
1.8 $\gamma\delta$ -TCR-tragende T-Lymphozyten	15
1.8.1 Entwicklung und Diversität von $\gamma\delta$ -TCR	15
1.8.2 Aufbau und Vorkommen der $\gamma\delta$ -TCR	17
1.8.3 Antigenerkennung von $\gamma\delta$ -TCR	17
1.8.4 Funktionen und Aufgaben von $\gamma\delta^+$ T-Zellen.....	18
1.8.5 $\gamma\delta$ -T-Zellen bei infektiösen, Tumor- und Autoimmun-Erkrankungen.....	19
1.9 T-Zell-Rezeptor und CDR3-Region.....	20
1.10 $CD4^+ V\delta 1^+$ T-Zell-Progenitor	24
1.11 Fragestellung.....	25
2 Materialien und Methoden.....	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Allgemeine Materialien.....	27
2.1.2 Zellkulturmedium und Puffer-Lösungen	31
2.1.3 Antikörper	31

2.1.4	Kits.....	32
2.1.5	Enzyme.....	33
2.1.6	Softwares zur Auswertung.....	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Gewinnung von mononukleären Zellen des Peripherblutes	34
2.2.2	Zellzahl-Bestimmung und Ausplattierung.....	34
2.2.3	Mediumwechsel.....	35
2.2.4	RNA-Isolation	36
2.2.5	Herstellung der komplementären DNA	37
2.2.6	Durchflusszytometrie – FACS.....	38
2.2.7	Magnetische Zellseparation - Anti-PE MicroBeads.....	40
2.2.8	Magnetische Zellseparation von V δ 1 ⁺ γ δ T-Zellen mit Anti-FITC MultiSort Kit 42	
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion.....	43
2.2.10	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	49
2.2.11	BigDye [®] Termination und Aufreinigung zur DNA-Sequenzierung	50
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Generierung von $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen aus V δ 1 ⁺ T-Zellsubpopulationen.....	53
3.1.1	Analyse des $\alpha\beta$ TCR-Repertoires im FACS.....	55
3.2	Spectratyping der V α - und V β -Familien im Zellkultur-Verlauf	64
3.2.1	Human T-cell receptor α chain variable regions und human T-cell receptor β variable regions.....	64
3.2.2	Complexity scores der V α -Familie und der V β -Familie über die Zeit der Kultivierung von 4 Wochen.....	74
3.2.3	TRAV- und TRBV-Expression	82
3.3	DNA-Sequenzierung zur Detektion der Aminosäuresequenz der CDR3 Region der T-Zell-Rezeptor V α -Kette	101
3.3.1	Zusammenstellung der ermittelten CDR3-Sequenzen.....	102
3.4	Die CD4 ⁺ V δ 1 ⁺ T-Zell-Precursor-Frequenz und die Anzahl der generierten $\alpha\beta$ ⁺ T- Zellen korrelieren in Peptid-gepulsten Zellkulturen	104

4	Diskussion	106
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	114

1 Einleitung

1.1 Das (adaptive) Immunsystem

Der menschliche Organismus ist permanent potenziell krankheitsauslösenden und tödlichen Erregern aus der Umwelt ausgesetzt. Trotz dessen ist das menschliche Immunsystem in der Lage den Organismus vor diesen pathogenen Keimen und Mikroorganismen dauerhaft und erfolgreich zu schützen. Nur selten kommt es bei einem funktionsfähigen und gesunden Immunsystem zum Ausbruch einer Erkrankung. Dabei sind vier Hauptaufgaben zu nennen die das Immunsystem auszuführen imstande sein muss: a) Die Erkennung von Pathogenen, b) ihre Bekämpfung bzw. Elimination, c) das sich merken der jeweiligen Erreger und der spezifischen Antwort auf diese (immunologisches Gedächtnis), und mindestens genauso wichtig: d) die Immunregulation zur Selbst-Kontrolle des Immunsystems um Allergien und autoimmune Erkrankungen zu verhindern.

Systematisch wird das Immunsystem eingeteilt in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem. Das Charakteristikum des angeborenen Immunsystems ist, dass es unverzüglich auf Pathogene reagieren kann, während das adaptive (erworbene) Immunsystem Tage bis Wochen dafür braucht. Andererseits ist Letzteres in der Lage mögliche Erreger spezifischer zu bekämpfen und zu eliminieren, da es Antigen-spezifisch fungiert. Die T-Lymphozyten die dem erworbenen Immunsystem angehören, reagieren auf individuelle Antigene mit einem jeweils hochspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR). Diese hochspezifischen TCRs führen somit zu hochspezifischen Immunantworten. Das Immunsystem besitzt die Fähigkeit 10^{15} - 10^{20} verschiedene TCRs zu generieren. Jede $\alpha\beta$ T-Zelle, die entsteht, besitzt einen einzigarten TCR. Erst wenn diese T-Zelle auf das für ihren TCR passende Antigen trifft, beginnt die T-Zelle zu differenzieren und zu proliferieren.

Hierbei entstehen identische Tochterzellen. Dieser Vorgang wird als klonale Expansion bezeichnet. Aufgrund der enormen TCR-Diversität im naiven T-Zell-Pool, ist das menschliche Immunsystem imstande auf nahezu alle Antigene mit denen der Organismus in Kontakt kommen kann, adäquat zu reagieren. Auf diese Weise werden pathogene Keime, die das angeborene Immunsystem nicht ausschalten konnte, durch die adaptive Immunantwort eliminiert. Dabei können Antikörper und aktivierte Lymphozyten des adaptiven Immunsystems nach einer erfolgten Infektion im immunologischen Gedächtnis weiterhin persistieren. Dadurch wird bei einer Reinfektion sofort reagiert und eine längerfristige Immunität gegen das jeweilige Pathogen bzw. das spezifische Antigen aufrechterhalten. Zudem hilft das immunologische Gedächtnis dabei, auch nach Jahren der Infektfreiheit, im Rahmen einer Sekundärinfektion eine schnellere und effektivere Immunantwort in Gang zu setzen.¹

1.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

T- und B-Lymphozyten entstehen aus Progenitorzellen, die im Knochenmark ansässig sind. Aus sogenannten gemeinsamen lymphoiden Vorläufern entstehen je nach Umgebung und einwirkenden Reizen T- und B-Zellen. Während B-Lymphozyten im Knochenmark heranreifen, findet die Reifung der T-Lymphozyten dagegen im Thymus statt. Nach der Ausreifung wandern sie in periphere Gewebe, wo sie über den Eintritt von Keimen, die Entstehung von Tumorzellen und degenerierte dysfunktionale Zellen wachen. Dabei verbleiben einige T-Zellen im Gewebe selbst, während andere im Blut- und Lymphsystem zirkulieren. B-Lymphozyten und T-Lymphozyten übernehmen jeweils unterschiedliche Rollen und exprimieren verschiedene Antigen-spezifische Rezeptoren. Bindet ein Antigen an den B-Zell-Rezeptor auf der B-Zell-Oberfläche, proliferiert diese B-Zelle und differenziert sich in eine Plasmazelle, welche die aktivierte Form der B-Zelle

darstellt. Die Plasmazelle produziert Antigen-spezifische Antikörper, welche die sezernierte Version des B-Zell-Rezeptors darstellen. Auf diese Weise wird das aktivierende Antigen zum Ziel der sezernierten Antikörper. TCRs werden auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert und sind mit den Immunglobulinen verwandt, jedoch in ihren strukturellen und Erkennungsmerkmalen unterschiedlich. Die T-Zelle kann nach Erkennen ihres spezifischen Antigens je nach Kostimuli und anwesenden Zytokinen in verschiedene aktivierte T-Zellen differenzieren: a) Zytotoxische T-Zellen, die infizierte Zellen (viral, bakteriell) abtöten, b) Helfer T-Zellen, die B-Zellen und Makrophagen unterstützen und ihre Effektivität steigern indem sie Signale in Form von Zytokinen ausschütten und ferner c) Regulatorische T-Zellen, die eine kontrollierte Immunantwort ermöglichen und eine Autoimmunität verhindern.¹

1.3 T-Lymphozyten und MHC-Klassen

Im menschlichen Körper befinden sich näherungsweise 10^{12} T-Zellen.^{2,3} Nach der Entwicklung im Thymus verlassen die naiven T-Zellen dieses Organ mit einem von zwei sogenannten T-Zell-Korezeptoren: CD4 oder CD8. Die zytotoxischen T-Zellen tragen das CD8-Protein und die Helfer T-Zellen tragen das CD4-Protein auf ihrer Oberfläche. Diese beiden T-Lymphozyten-Arten unterscheiden sich dadurch in ihrem Bindungsverhalten bezüglich der Peptid-präsentierenden MHC-Moleküle (Abk. MHC von engl. major histocompatibility complex). Die MHC-Moleküle werden in zwei Hauptklassen unterteilt: MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. CD4 und CD8 fungieren als Korezeptoren bei der Bindung Peptid-beladener MHC-Moleküle. Dabei binden $CD8^+$ T-Zellen selektiv MHC-Klasse-I- und $CD4^+$ T-Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle. MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren zytosolisch verarbeitete Peptide, was sie vor allem zur Virus-Protein-Präsentation befähigt und werden auf den Oberflächen der meisten Körperzellen (Ausnahme: Erythrozyten) exprimiert. MHC

Klasse-II-Moleküle verarbeiten vor allem durch Endozytose aufgenommene Proteine und werden hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Dendritischen Zellen, Makrophagen, Thymus-Epithelzellen, B- und (humanen) T-Zellen exprimiert. Zwei Mechanismen verhindern, dass Pathogene die MHC-abhängige Präsentation umgehen: einerseits der Polymorphismus der MHC-Moleküle und andererseits die Polygenie der MHC-Moleküle. Der Polymorphismus stellt sicher, dass die interindividuelle MHC-Merkmalsausprägung hochgradig variant ausfällt, da mehrere allelische Varianten sowohl von MHC-Klasse-I- als auch von MHC-Klasse-II-Genen vorliegen. Die Polygenie sorgt dafür, dass MHC-Klasse-I und -II sowohl Epitope, die aus dem intra- als auch extrazellulären Kompartiment stammen, erfassen und präsentieren können. Die MHC-Gene gehören unter anderem (u.a.) zu den polymorphsten der bekannten Gene. Die Eigenschaft von T-Zellen, dass sie Antigene nur in Verbindung mit einer bestimmten allelischen Variante eines MHC-Moleküls erkennen können, wird als MHC-Restriktion bezeichnet.

Die MHC-Gene beim Menschen werden als human leukocyte antigens (HLA) bezeichnet. Dabei werden drei humane Klasse-I α -Ketten-Gene unterschieden, die sogenannten HLA-A, -B und -C, sowie drei MHC-Klasse-II α - und β -Ketten-Gen Paare, die als HLA-DR, -DP und -DQ bezeichnet werden. Zudem gibt es noch sogenannte nonclassical MHC-Gene, die strukturelle Ähnlichkeit mit MHC-Klasse-I-Genen zeigen. Die α -Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle und die α - und β -Ketten der MHC-Klasse-II-Moleküle befinden innerhalb eines MHC Komplexes. Die Gene für das β_2 -Mikroglobulin, welches mit den drei α -Ketten von MHC I assoziiert ist und das invariant chain (Ii; CD74) befinden sich auf den (humanen) Chromosomen 15 bzw. 5. Ii verhindert durch nicht-kovalente Bindung an die Peptid-Bindungsfurche eines im Endoplasmatischen Retikulum entstehenden MHC-Klasse-II $\alpha\beta$ -Heterodimers, die Bindung von Peptiden und den Verschluss der Peptid-Bindungsfurche.¹

1.4 T-Zell-Rezeptor-Generierung durch somatische DNA-Rekombination

Es ist nicht möglich, dass jede Rezeptor-Kette im Genom einzeln kodiert ist, da es dann weitaus mehr Gene geben würde, als im gesamten Genom vorhanden sind. Stattdessen sind die V-Regionen der Rezeptor-Ketten (bestehend aus V(D)J-Segmenten) jeweils in mehreren Teilstücken kodiert, die als Gensegmente bezeichnet werden. Während der Lymphozyten-Reifung können die einzelnen Gensegmente unterschiedlich zusammengefügt werden, um eine vollständige einzigartige V(D)J-Region zu bilden. Diesen Vorgang bezeichnet man als DNA- oder V(D)J-Rekombination. Die V(D)J-Rekombination ist ein Vorgang der TCRs betrifft und während der T-Zell-Reifung im Thymus stattfindet. Die Auswahl der einzelnen Gensegmente während der DNA-Rekombination geschieht zufällig und ist u.a. für die enorme Diversität des TCR-Repertoires verantwortlich.

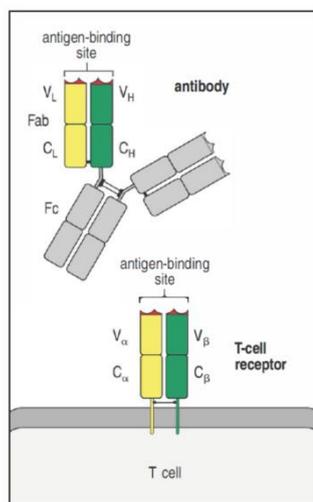
Während der TCR α -Lokus die V, J und C Gensegmente V α , J α sowie C α beherbergt, hat der TCR β -Lokus außer den Gensegmenten V β , J β und C β zusätzlich das D β -Gensegment. Hierbei kodieren die C-Regionen der TCRs für den konservierten Part der transmembranen Polypeptidkettendomäne. Die Keimbahn-kodierten V-, J- und D-Gensegmente kommen zudem in multiplen Kopien im Genom vor, wobei zwei bis drei Gensegmente (V, J und evtl. D) zusammengefügt die Sequenz der V-Region bilden.¹ Der T-Zell-Rezeptor-Alpha(TRA)-Ketten Locus liegt auf Chromosom 14 (14q11.2) und besitzt 47 TRAV-, 57 TRAJ- und ein TRAC-Gensegment. Der T-Zell-Rezeptor-Beta(TRB)-Ketten-Lokus liegt auf Chromosom 7 (7q35) und beherbergt 54 TRBV-, 2 TRBD-, 13 TRBJ- und 2 TRBC-Gensegmente. Die Kombination dieser TRA- und TRB-Gensegmente trägt zu 5-10 % zur Diversität des TCR-Repertoires bei.^{1,4}

Biochemische Grundlage für die Neuordnung einzelner DNA-Bruchstücke sind, in den beiden sogenannten recombination-activating genes (RAG1 und RAG2) kodierte

Enzyme, die eine Bruchstelle innerhalb chromosomaler DNA erzeugen und somit die V(D)J-Rekombination ermöglichen.^{1,5} Maximale Diversität wird letztendlich über die Exonuklease-Aktivität des Enzyms terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) erzielt, die beim Rekombinationsprozess nicht-kodierte Nukleotide in den neukombinierten Strang an den Bruchstellen einbaut. Da sowohl Anzahl als auch Typ der eingebauten Nukleotide zufällig sind, wird die Diversität enorm gesteigert und liegt bei 10^{15} einzigartiger und jeweils unterschiedlicher TCRs.^{4,6-8} Bei TCR α -Gensegmenten findet diese Addition zwischen den V- und J-Regionen und bei TCR β -Gensegmenten zwischen den V-, D- und J-Regionen statt.¹

1.5 $\alpha\beta^+$ TCR

Bei $\alpha\beta$ -TCRs handelt es sich um in die Zellmembran integrierte, heterodimere Proteine, die sich auf der Oberfläche von T-Zellen befinden. Sie bestehen aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit, die über eine Disulfidbrücke miteinander



verbunden sind.^{1,9} Sie sind in ihrem Aufbau der Fragment-antigen-binding(-FAB)-Region von Antikörpern ähnlich (Abb. 1-1). $\alpha\beta$ -TCRs erkennen ausschließlich MHC-gebundene Fremd-Peptid-Fragmente.¹ Bei der Kontaktaufnahme zum Peptid-beladenen MHC-Molekül

Abbildung 1-1 – Der Aufbau eines TCRs entspricht dem der FAB-Region eines Antikörpers. Es handelt sich hierbei um Heterodimere die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Dabei besteht jede Kette jeweils aus einer V- und einer C-Domäne, wobei die V-Regionen beider Ketten für die Antigenerkennung zuständig sind.¹

(pMHC) spielen TCR α -Ketten im Vergleich zu TCR β -Ketten eine größere Rolle.¹⁰⁻¹³ Neben den $\alpha\beta$ -TCRs, welche den größten Anteil an TCRs stellen, gibt es auch $\gamma\delta^+$ TCRs, die nur einen geringen Anteil am TCR-Pool ausmachen (siehe 1.8).¹

1.6 Complementy-determining regions

Die strukturelle Diversität der $\alpha\beta$ -TCRs ist auf den Vorgang der somatischen Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente zurückzuführen. Dabei enthalten die TCR-V α - und -V β -Regionen je drei hypervariable Regionen, die den complementarity-determining regions (CDR) der Immunglobuline entsprechen. Während CDR1- und CDR2-Regionen ausschließlich Keimbahn-kodiert sind und konservierte Abschnitte der MHC-Moleküle erkennen, enthalten CDR3-Regionen sowohl Keimbahn-kodierte Reste aus den V(D)J-Segmenten, als auch N-Nukleotid-Additionen im Bereich der V(D)J-Verbindungsstellen, die während der Rekombination entstanden sind.⁷ Die CDR3-Region ist die Region des TCR die spezifisch für das zu bindende Antigen ist.^{1,14,15} Die TCRs von unterschiedlichen T-Zell-Klonen bestehen aus unterschiedlichen CDR3-Regionen, die sich in Sequenz, Spezifität und Länge unterscheiden.^{16,17}

1.7 Public TCRs und ihre Entstehung

1.7.1 „private“ und „public“ TCRs

Der Prozess der Rekombination verleiht Immunglobulin- und TCR-Genen die Fähigkeit auf verschiedenste Antigen-Moleküle hochspezifisch zu antworten. Die Zufälligkeit des Prozesses und die dabei entstehende enorme Diversität ermöglichen es, dass beispielsweise mehrere unterschiedliche TCRs ein spezifisches Antigen-Epitop zu binden in der Lage sind. In den meisten T-Zell-Antworten sind diese sogenannten private TCRs zu finden^{18,19}, d.h. sie kommen ausschließlich in diesem Individuum vor. Immunantworten mit TCRs die eine solche individuelle Spezifität zeigen, werden als private T-Zell-Antworten bezeichnet.

Im Gegensatz dazu gibt es sogenannte public T-Zell Antworten, d.h. Immunantworten die von sogenannten public TCRs ausgehen. Diese zeigen eine Antigen-Spezifität und werden von mehreren Individuen exprimiert. In diesen public Immunantworten gehen Zufälligkeit und Diversität scheinbar verloren, da die spezifische Antwort einerseits sehr fokussiert ist, d.h. dominiert durch einen oder wenige TCRs, und andererseits in mehreren Individuen vorkommt.²⁰ Da es sehr unwahrscheinlich ist, dass derselbe TCR-Klon, in mehreren Individuen vorkommt, wurden Aminosäure-Sequenzen von public TCRs¹⁸ lange als unübliches Phänomen betrachtet. Studien konnten jedoch die Relevanz der public TCRs in public T-Zell Antworten aufzeigen, da diese in akuten und chronischen Infektionen, sowie autoimmunen und allereaktiven Antworten vorkommen.²⁰ Außerdem werden Keimbahn-kodierte public TCRs während der V(D)J-Gen-Rekombination häufiger produziert, als andere TCRs, und finden sich folglich auch häufiger im naiven Zell-Pool.²¹⁻²³

1.7.2 Eigenschaften von public TCRs

Eine wichtige Eigenschaft von public TCRs ist ihre klonale Dominanz innerhalb einer Immunantwort²⁴ in einem Individuum und einer Bevölkerung. Klonale Dominanz bedeutet, dass der jeweilige Klonotyp anderen Klonotypen in einer Immunantwort gegen ein bestimmtes Epitop überlegen ist. Folglich wird dieser Klonotyp im Vergleich zu anderen Klonotypen in höherer Anzahl in einem T-Zell-Antwort-Repertoire vorhanden sein.²⁰ Die Vorläufer-Frequenz, welche ein bestimmender Faktor der klonalen Dominanz ist²⁴, wird selbst durch die Produktionsfrequenz im Thymus und durch die post-thymische Expansion bestimmt. Da die Produktionsfrequenz an sich ein ausschlaggebender Faktor gleichzeitig für das TCR sharing und die klonale Dominanz ist, bedeutet das, dass das TCR sharing und die klonale Dominanz miteinander verknüpft sind.²⁰ Auch können strukturelle

Determinanten²⁵, wie z.B. unterschiedliche pMHC-Konformationen die zu einer TCR-Repertoire-Bias führen^{10,26–29}, für eine T-Zell-Selektion verantwortlich sein.²⁵ Trotz allem können diese Gegebenheiten und Annahmen die Präsenz von public TCRs im naiven Zell-Pool nicht befriedigend erklären. Bevor es zu jeglichem Antigen-Kontakt kommt, sind die public TCRs nämlich bei den meisten Individuen bereits in der Peripherie vorhanden.²⁰

1.7.3 Konvergierende Rekombination

Man geht davon aus, dass public TCRs, welche bereits im naiven T-Zell-Pool vorkommen, nach dem Prinzip der konvergierenden Rekombination entstehen. Hierbei wird durch Neuordnung eine neue Nukleotid-Sequenz generiert. Durch die Degeneration des genetischen Codes, können unterschiedliche Nukleotid-Sequenzen ein und dasselbe Protein kodieren.^{9,20} Beispielsweise gibt es für die Aminosäuren Arginin, Leucin und Serin je 6 verschiedene Kodons.^{30–32} Mit dem Prinzip der Konvergierenden Rekombination lässt sich die Vielfalt der public T-Zell-Antworten und das gleichzeitige Vorhandensein der public TCRs in mehreren Individuen, weitestgehend erklären.²⁰

1.7.4 Public T-Zell-Antworten im Rahmen von chronischen Erkrankungen

Public T-Zell-Antworten von CD8⁺ T-Zellen gegen Cytomegalievirus (CMV) und Epstein-Barr-Virus (EBV) wurden in strukturellen^{10,26,33–38} und TCR-Repertoire-Studien^{39–43} nachgewiesen. Darüber hinaus wurden CD8⁺ T-Zellen im Rahmen von public T-Zell Antworten gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)^{44,45}, Simianes Immundefizienz-Virus (SIV)³⁰ und im Zusammenhang mit alloreaktiven

Antworten⁴⁶⁻⁴⁸ nachgewiesen. Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen public CD4⁺ T-Zellantwort und experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, hergestellt werden.⁴⁹⁻⁵¹ Dieses Wissen könnte in Zukunft hilfreich sein bei der Entwicklung von Immuntherapie und Impfstoffen.^{25,52,53}

1.8 $\gamma\delta$ -TCR-tragende T-Lymphozyten

Ein geringer Anteil der T-Zell-Population besteht aus $\gamma\delta$ -TCR-tragenden T-Zellen.¹ Während $\alpha\beta$ -TCRs bei über 90 % der T-Zellen im peripheren Blut vorkommen, tragen weniger als 10 % $\gamma\delta$ -TCRs.^{54,55} $\gamma\delta$ -T-Zellen gehören zu den sogenannten innate-like lymphocytes (ILLs), die definitionsgemäß dem adaptiven Immunsystem zuzuordnen sind, jedoch Eigenschaften des angeborenen Immunsystems aufweisen. ILLs sind Zellen, die RAG-1 und RAG-2 exprimieren und deren Rezeptoren durch DNA-Rekombination gebildet werden, jedoch trotzdem eine geringe Diversität aufweisen. Diese Eigenschaften führen zu einer Unabhängigkeit von Proliferation bzw. klonaler Expansion um effektiv auf ein Antigen zu reagieren, genau wie beim angeborenen Immunsystem. $\gamma\delta$ -T-Zellen kommen u.a. im Epithel, wie z.B. der Haut vor. Es werden zwei Anteile von $\gamma\delta$ -T-Zellen unterschieden: Die einen zeigen eine hohe TCR-Diversität, ähnlich den $\alpha\beta$ -T-Zellen, und kommen im Lymphgewebe aller Wirbeltiere vor, die anderen, intraepithelialen $\gamma\delta$ -T-Zellen kommen in unterschiedlichen Wirbeltieren vor und zeigen eine eingeschränkte TCR-Diversität.¹

1.8.1 Entwicklung und Diversität von $\gamma\delta$ -TCR

Auch die $\gamma\delta$ -TCRs entstehen im Rahmen der somatischen Rekombination. Dabei sind die TCR γ - und TCR δ -Loki den TCR α - und TCR β -Loki bezüglich ihrer

Organisation sehr ähnlich. Dennoch bestehen Unterschiede, wie z.B. dass das komplette Gensegment-Cluster der TCR δ -Kette sich innerhalb des TCR α -Lokus befindet. Der TCR δ -Lokus befindet sich zwischen den $V\alpha$ und $J\alpha$ Gensegmenten. Die 6 $V\delta$ -Gensegmente liegen verstreut innerhalb der $V\alpha$ -Gensegmente (Abb. 1-2).

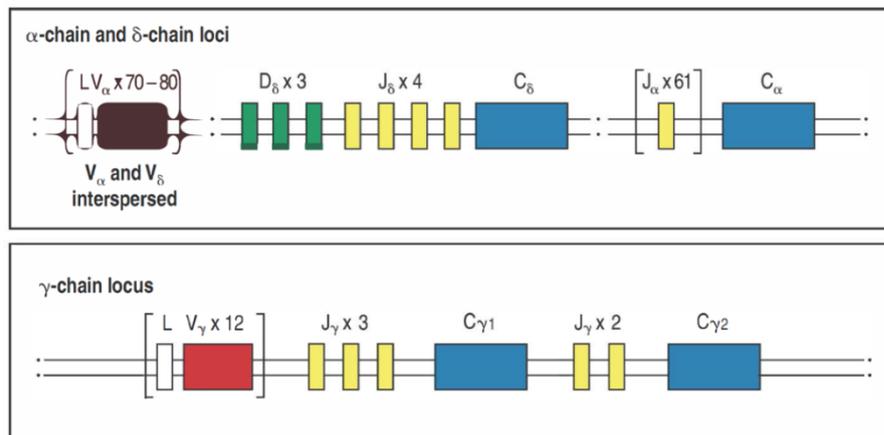
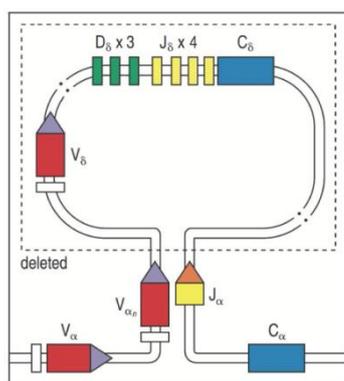


Abbildung 1-2 – Der Aufbau der TCR γ - und TCR δ -Loki im menschlichen Genom. Diese Loki besitzen V-, D- und J-Gensegmente. Einzigartig ist, dass der Locus der δ -Kette sich innerhalb des α -Ketten-Lokus befindet. Dabei befinden sich die 3 $D\delta$ -, 4 $J\delta$ -Gensegmente und das $C\delta$ -Gensegment zwischen den $V\alpha$ - und $J\alpha$ -Clustern. Der TCR γ -Locus entspricht dabei dem TCR β -Locus, da er über 2 $C\gamma$ -Gensegmente verfügt, die jeweils einen eigenen Satz an $J\gamma$ -Gensegmenten besitzen.¹

Jegliches Rekombinationsereignis im α -Lokus führt unweigerlich zum Verlust des δ -Lokus (Abb. 1-3). Da die TCR γ - und TCR δ -Loki weniger V-Gensegmente besitzen als die TCR α - und TCR β -Loki, liegt der Fokus für die Diversität der $\gamma\delta$ -TCRs



jeweils in den Verbindungsregionen der $V\gamma$ - und $V\delta$ -Regionen. Wie bei den $\alpha\beta$ -TCRs liegen bei den $\gamma\delta$ -TCRs die in den Verbindungsregionen kodierten Aminosäuren im Bindungszentrum der TCR-Ketten.¹

Abbildung 1-3 – Deletion des TCR δ -Lokus durch Rekombinationsereignisse zwischen $V\alpha$ - und $J\alpha$ -Gensegmenten. Hierbei geht das $V\delta$ -Gensegment vollständig verloren.¹

1.8.2 Aufbau und Vorkommen der $\gamma\delta$ -TCR

Bei den $\gamma\delta$ -TCRs handelt es sich genau wie bei den $\alpha\beta$ -TCRs um TCR Heterodimere. Strukturell zeigen $\gamma\delta$ -TCRs einen ähnlichen Aufbau wie die $\alpha\beta$ -TCRs. Untersuchungen der V-Regionen von $\gamma\delta$ -TCRs haben jedoch gezeigt, dass diese eine größere Ähnlichkeit mit der V-Region von Antikörpern haben.¹ Die V δ -Kette von humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen ist in den meisten Fällen entweder eine V δ 1- oder eine V δ 2-Kette.⁵⁴ Bei einem Erwachsenen beträgt der Anteil an V δ 2⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut >70%, während V δ 1⁺ T-Zellen etwa 30% ausmachen. Umgekehrt sind die Verhältnisse im Thymus und Nabelschnurblut, wo V δ 1⁺ T-Zellen überwiegen. V δ 2-Ketten der T-Zellen im peripheren Blut werden häufig mit V γ 9-Ketten koexprimiert, während V δ 1-Ketten mit verschiedenen V γ -Ketten kombiniert werden.⁵⁶ Humane $\gamma\delta$ -T-Zellen werden nach ihrer V δ -Gensegment-Nutzung (V δ 1, V δ 2 oder V δ 3) klassifiziert und unterscheiden sich in ihrer Sequenz innerhalb einer Familie nur wenig.⁵⁷ Es wird angenommen, dass die V δ 1-Untergruppe den naiven und die V δ 2-Untergruppe den Gedächtnis-Zell-Pool bildet.⁵⁸ $\gamma\delta$ -T-Zellen die einen V δ 1-Rezeptor tragen, sind mit dem Intraepithelialen Lymphozyten (IEL) Kompartiment, welches 70-90% der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Epithel beherbergt, assoziiert und kommen gehäuft bei tumor-infiltrierenden Lymphozyten vor.⁵⁹ Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Immunüberwachung von Tumoren, der Abwehr viraler Infektionen und der Reparatur beschädigten Gewebes⁵⁹⁻⁶² (siehe 1.8.4 und 1.8.5).

1.8.3 Antigenerkennung von $\gamma\delta$ -TCR

Auch wenn bisher wenig bekannt ist über die Funktion der $\gamma\delta$ -TCR-tragenden T-Lymphozyten oder über die Liganden die sie binden, weiß man, dass sie Antigene direkt, d.h. ohne vorherige Antigen-Prozessierung und anschließende Antigen-Präsentation, erkennen und binden können. Liganden die durch $\gamma\delta$ -TCR erkannt

werden sind u.a. Hitzeschockproteine (HSPs), MHC-Klasse-Ib-Moleküle (CD1; nonclassical MHC-like molecules), „unorthodox nucleotides“, Phospholipide (PL) und nicht-Peptid-Liganden wie phosphorylierte Liganden oder mykobakterielle Lipid-Antigene.¹ Humane (und murine) $\gamma\delta$ -T-Zellen sind zwar in der Lage Antigene konventionell über MHC-I bzw. -II Moleküle zu erkennen^{1,63-66}, jedoch wird ein Großteil der Antigene MHC-unabhängig, also direkt von den $\gamma\delta$ -TCR gebunden.¹ Im Falle der $\gamma\delta$ -T-Zell-Aktivierung spielen zwei Liganden eine besondere Rolle: Phospholiganden und HSPs. Zum einen sind sie ubiquitär, zum anderen führen sie zur oligoklonalen Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen.⁵⁶

Die einzigen bisher für V δ 1-TCR identifizierten spezifischen Liganden sind MHC-Klasse-I-homologe sogenannte MIC-Self-Antigene (MICA/MICB: MHC class I polypeptide-related sequence A/B)^{59,67,68} und CD1 Moleküle, wobei zur Bindung dieser keine Fremdlipide oder Glykolipid-Antigene vorhanden sein müssen.⁶⁹ Die MIC-Antigene werden als Antwort auf zellulären Stress in Zellen produziert.^{70,71} MIC-Proteine sind aufgebaut wie MHC-Klasse-I-Proteine, jedoch werden sie nicht durch β_2 -Mikroglobulin stabilisiert und präsentieren kein Antigen.⁷² Sie fungieren als Liganden für die stimulierenden Immunrezeptoren NKG2D, die von $\gamma\delta$ -T-Zellen, natürlichen Killerzellen und CD8⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen exprimiert werden.^{59,68,73}

1.8.4 Funktionen und Aufgaben von $\gamma\delta^+$ T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen sezernieren unterschiedliche Zytokine und haben zytolytische Eigenschaften. Stimulierte $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten schütten T_H1-typische Zytokine, genauer IFN- γ aus.⁷⁴⁻⁷⁸ Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Erreger $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten zur Ausschüttung verschiedener Zytokine stimulieren. $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten die mit den intrazellulären Erregern *L. monocytogenes* in Kontakt gekommen sind, sezernieren T_H1-spezifisches IFN- γ . Der Enhelminth *Nippostrongylus brasiliensis* induziert dagegen die Ausschüttung T_H2-spezifischer

IL-4-Zytokine.⁷⁹

Zudem zeigen $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nach Stimulation zytolytische Aktivität.^{54,78,80–82} Eine weitere Vermutung ist, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen u.a. Zellintegrität-erhaltende, homöostatische und immunregulatorische Eigenschaften besitzen.⁵⁶ Beispielsweise sind murine Makrophagen ohne $\gamma\delta$ -T-Zellen eingeschränkt in ihrer TNF- α -Produktion.⁸³ Die homöostatische Funktion wurde sowohl für $\gamma\delta$ - als auch für $\alpha\beta$ -T-Zellen beschrieben. Beide T-Zell-Arten regulieren sich scheinbar gegenseitig. Eine Behandlung von immunkompetenten Mäusen mit spezifischen monoklonalen Anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörpern, führte zu einer Aktivierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen.⁸⁴ In Mäusen mit einem $\alpha\beta$ -T-Zell-Mangel konnte eine unkontrollierte Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen beobachtet werden.⁸⁵

1.8.5 $\gamma\delta$ -T-Zellen bei infektiösen, Tumor- und Autoimmun-Erkrankungen

Da sich $\gamma\delta$ -T-Zellen u.a. in Epithelien befinden, wird angenommen, dass sie eine Überwachungsfunktion an diesen Orten des ersten Bakterien-Kontakts übernehmen.⁸⁶ Weiterhin geht man davon aus, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen die erste Schutz-Barriere (noch vor $\alpha\beta$ -T-Zellen) bilden.^{74,87} Bei sekundären Infektionen ist der Einfluss klein bis vernachlässigbar.⁵⁶ Außerdem wird die frühzeitige Abwehr gegen intrazelluläre Erreger, wie z.B. *Salmonella* spp. und *Mycobacteria* spp.⁸⁸ durch $\gamma\delta$ -T-Zellen unterstützt^{74,87,89}, wobei Mykobakterien als starke Stimulatoren von $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Rolle spielen.^{65,90–93}

Darüber hinaus können $\gamma\delta$ -T-Zellen direkt, z.B. durch ein Protein des Herpes-Virus stimuliert werden.⁹⁴ Bei Patienten mit bakteriellen Infektionen konnten Akkumulationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen in Regionen mit mikrobieller Replikation und spezifischer $\gamma\delta$ -T-Zell-Expansion im peripheren Blut oder Lymphorganen nachgewiesen werden.^{89,95–110} Beim Menschen ist davon auszugehen, dass Bakterien

spezifisch die $\gamma\delta$ -T-Zellen, welche V γ 9V δ 2 exprimieren, stimulieren.^{111–114} Der ständige Kontakt zu unterschiedlichen Mikroorganismen führt in der Peripherie zur selektiven Expansion dieser spezifischen V γ 9⁺V δ 2⁺ T-Zellen.¹¹⁵ Die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der antimikrobiellen Immunität konnte in Mausmodellen nachgewiesen werden. Hierbei wurde Mäusen mit Infektionen, ausgelöst durch verschiedene Pathogene, spezifische monoklonale anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper verabreicht, woraufhin die Infektionen exazerbierten.^{87,110,116–118} Eine Akkumulation von HSP-reaktiven $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde sowohl in infektionsbedingten als auch autoimmunen Entzündungsprozessen beschrieben.^{65,96} Bei Lebensmittelvergiftungen scheinen $\gamma\delta$ -IELs in der lokalen Abwehr eine größere Rolle zu spielen als $\alpha\beta$ -IELs.^{119–121} Außerdem werden hämatopoetische Tumorerkrankungen durch $\gamma\delta$ -T-Zellen überwacht.¹²²

$\gamma\delta$ -T-Zellen scheinen den Schutz der Körperoberfläche als eine Hauptaufgabe innezuhaben und zeigen eine eingeschränkte Spezifität ihrer TCR, sowie gleichzeitig eine hohe Effektivität der Immunantwort. Diese Eigenschaften lassen sich möglicherweise deuten wie folgt: nämlich dass es sich bei den $\gamma\delta$ -T-Zellen um eine repräsentative T-Zell-Art für die Übergangsphase von dem angeborenen Immunsystem in das adaptive Immunsystem handelt.¹

1.9 T-Zell-Rezeptor und CDR3-Region

Zum besseren Verständnis der Methodologie und aufgeführten Ergebnisse ab 3.2.1 werden die folgenden zwei Abschnitte mit Erläuterungen zum T-Zell-Rezeptoraufbau, der CDR3-Region und über die Methodik des CDR3-Spectratypings aus der Habilitationsschrift von Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach-Stückle zitiert:

T-Zell-Rezeptor und CDR3-Region

T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR), einem heterodimeren Molekül, das nichtkovalent mit dem für T-Zellen spezifischen CD3-Molekül assoziiert ist und fest in der Zytoplasmamembran der T-Zellen verankert ist.¹²³ Der TCR erkennt und bindet sein passendes Antigen, das ihm von Antigenpräsentierenden Zellen auf MHC-Molekülen präsentiert wird. Bei gleichzeitiger Kostimulation (second signal) und Ablauf einer intrazellulären Signalkaskade lysiert die daraufhin differenzierte und proliferierte T-Zelle entsprechende antigentragende Zielzellen unter Mitwirkung von Proteasen, Zytotoxinen und Perforin.¹²⁴ Die Immunantwort von $\alpha\beta$ -T-Zellen ist polyklonal. Die Antigenerkennung ist zentral für die Entwicklung und Regulierung einer physiologischen effektiven Immunantwort.¹²⁵

Das TCR-Heterodimer der meisten T-Zellen ist aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut, die in ihrer Peptidsequenz zwischen dem konstanten und transmembranären Teil durch zwei Disulphidbrücken verbunden sind.¹²⁵⁻¹²⁷ N-terminal in der α - und β -Kette liegt die hochvariable CDR3-Region, die für die Erkennung und Bindung ans Fremdepitop verantwortlich ist.⁷

Die T-Zelle stellt ihren TCR nach somatischem Rearrangement der α - und β -Kette zusammen.¹²⁸ Die maximale TCR-Diversität von 10^{15} wird erreicht durch die Kombination unterschiedlicher Segmente in der variablen Region (V-Region) der α - und β -Kette. Der variable Teil der β -Kette besteht bei Mensch und Maus aus vier Segmenten: V-, D-, J- und C-Region^{7,128,129} (siehe Abb. 3-11), die gemeinsam die CDR3-Region (complementary-determining region) bilden. Jede dieser vier Regionen besitzt eine unterschiedliche Anzahl gleichwertiger Segmente auf genomischer Ebene, deren Anzahl je nach Spezies differiert. Die β -Kette eines murinen TCR besteht aus einem der 24 unterschiedlichen möglichen V β -Segmente, einer der beiden möglichen D-Regionen, sowie einer der beiden Subfamilien der J β -Familie, die jeweils aus 6 möglichen Untersegmenten bestehen. Die VDJ-Region geht über in eine C-Region, die, relativ konserviert, nur zwei Sequenzvarianten

aufweist. Die Rearrangements haben keine fest definierten Bruchpunkte, sondern Regionen, in denen sich Neukombinationen ergeben können, so dass theoretisch

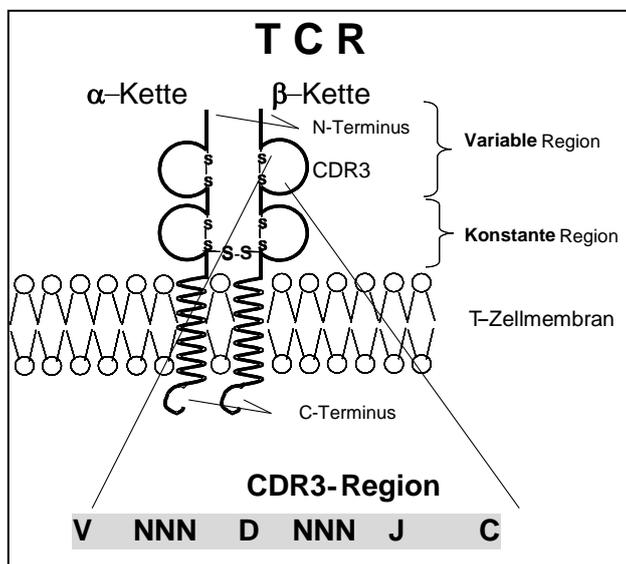


Abbildung 1-4 - Aufbau der CDR3-Region, gebildet durch somatisches Rearrangement der VDJC Segmente beispielhaft für die β -Kette. (übernommen aus der Habilitationsschrift von Prof. Dr. rer. nat. K. Schilbach-Stückle)

10^{10} bis 10^{15} neue TCRs entstehen können.¹²⁸ Die Diversität wird weiter erhöht durch extratranslationale Integration von n Nukleotiden zwischen V-, D- und J-Segment.¹⁶

Die außerordentlich große CDR3-Varianz stellt sicher, dass das Immunsystem auf zellulärer Ebene auf eine Vielzahl von Antigenen reagieren kann. Lage und

Länge der CDR3-Region wurde durch Candeias et al. (1991)¹³⁰ definiert. Sie beginnt am Serinrest der Peptidkette N-FCAS-C der $V\beta$ -Kette und endet bei Phenylalanin im konservierten Teil der mJ β -Region N-FGXG-C. Die CDR3-Region jedes TCR ist einzigartig (unique). Nach CDR3-Spectratyping, Subspezifizierung der $V\beta$ -C β Amplifikate nach ihrem J β -Gebrauch durch semi-nested PCRs, Klonierung dieser Amplifikate und Sequenzierung der Klone kann jeder TCR identifiziert werden, der sich in einem untersuchten T-Zell-Pool befindet.⁷⁸

Methodik: CDR3-Spectratyping

Das Verfahren, 1992 von Cochet¹³¹ entwickelt und später von Gorski¹⁶ als Spectratyping bezeichnet, ermöglicht die Analyse des T-Zell-Repertoires auf molekularer Ebene.¹³² Maslanka schlug vor, diese anhand der Identifikation der CDR3-Region der β -Kette des T-Zell-Rezeptors durchzuführen.¹³³ Sowohl die

Anzahl exprimierter V β -Familien als auch die Anzahl, Intensität und Anordnung der Banden innerhalb einer Familie lässt eine Aussage über die Komplexität des TCR-Repertoires zu.¹⁶ Das CDR3-Spectratype der Milz eines immunkompetenten Individuums zeigt typischerweise den Gebrauch aller V β -Familien und eine Gauß'sche Normalverteilung der Banden innerhalb einer Familie. Die 6 bis 10 Banden unterschiedlicher Länge sind jeweils durch einen Abstand von 3 Nukleotiden voneinander getrennt. Diese Abstände resultieren aus dem „clonal neglect“ von T-Zellen, die nach „out-of-frame“-Rearrangements in der β -Kette des TCR und durch Instabilitäten ihrer „out-of-frame“-mRNA verloren gehen¹⁶ (Abb. 3-12).

Eine Bande innerhalb einer V β -Familie setzt sich aus bis zu 2000 verschiedenen Amplifikaten unterschiedlicher Sequenz, jedoch gleicher Länge zusammen. Diese Amplifikons können wenige bis Tausende von Klonen repräsentieren. Fehlende Expression mehrerer V β -Familien, sowie Abweichungen von einem „normalen“ Gauß'schen Muster innerhalb einer Familie, durch Lücken oder abweichende Bandenintensitäten gekennzeichnet, können Hinweise auf eine aberrante Immunkompetenz oder Erkrankung sein.¹⁶ Ein komplettes Set aller V β -Familien mit allen Banden wird nur in der Milz beobachtet, dem Pool peripherer T-Zellen.

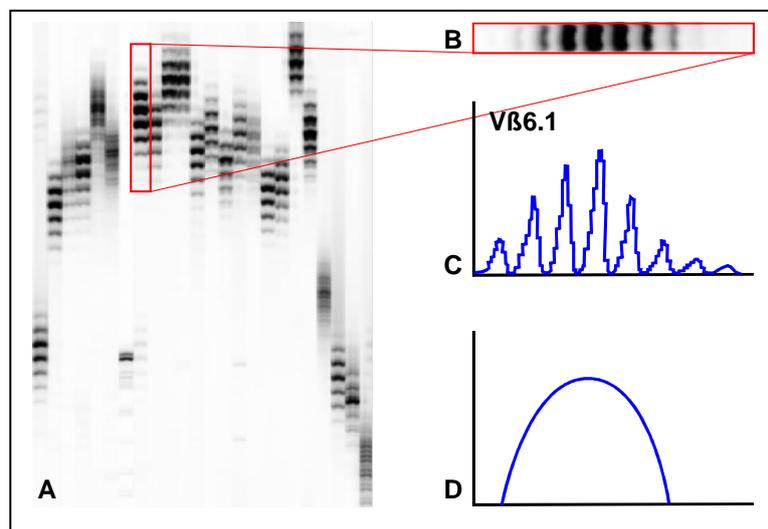


Abbildung 1-5 - CDR3-Spectratype der Milz einer gesunden Balb/c Maus. A) Zu sehen sind die exprimierten Familien V β 1-V β 24, die mit jeweils einer Bandenzahl von 6-8 pro V β -Familie imponieren (Ausnahme bildet in diesem Mausmodell (Balb/c) die Familie V β 5.3 (lane 7), die die thymische Negativ/Positivselektion nicht übersteht). B) Banden stärkster Intensität zeigen sich in der Mitte, Banden schwächerer Intensitäten sind ihrer zugrunde liegenden Fragmentlänge zu oder abnehmend nach oben bzw. unten gestaffelt.⁸⁹ C) zeigt Abbildung B in Saggitalebene, D) zeigt schematisch die daraus abgeleitete Gauß'sche Normalverteilung der Bandenintensitäten innerhalb einer V β Familie. (übernommen aus der Habilitationsschrift von Prof. Dr. rer. nat. K. Schilbach-Stückle)

1.10 CD4⁺ Vδ1⁺ T-Zell-Progenitor

Unser CD4⁺ Vδ1⁺ T-Zell-Progenitor, der, was seinen T-Zell-Rezeptor angeht, der gewebeständigen Vδ1⁺ γδ-T-Zell-Population zuzuordnen ist, kommt typischerweise in erhöhter Anzahl im peripheren Blut von Patienten mit Virusinfektion vor. Er ist im Blut signifikant erhöht während HIV Infektionen^{134–138}, sowie autoimmunen Erkrankungen wie beispielsweise Rheumatoider Arthritis¹³⁹ und multipler Sklerose¹³⁵ um nur zwei Beispiele zu nennen. Interessanterweise ist seine Frequenz streng reguliert, das heißt innerhalb des Vδ1-Kompartiments bleibt seine Frequenz konstant (niedrig), jedoch ist sein Verhältnis zu der Gesamtheit aller T-Zellen im Blut bei inflammatorischen Prozessen variabel, was über einen insgesamt höheren Anteil an Vδ1ern an CD3⁺ T-Zellen geschieht. Nur so steigt die absolute Zahl dieses Progenitors im Blut an. Zudem exprimieren CD4⁺ Vδ1⁺ γδ-T-Zellen einige der Marker, die früheste hämatopoetische Progenitorzellen, wie z.B. CLPs, TSPs und ELPs und tragen 6 Chemokinrezeptoren, die die Zellen an Orte der Inflammation dirigieren. Dass Hämatopoetische Stammzellen direkt auf Inflammation reagieren und aus ihrer Nische im Knochenmark zu Orten der Inflammation mobilisiert werden, ist seit einiger Zeit bekannt.¹⁴⁰ Die hier untersuchte Vδ1⁺ Zell-Population ist außerdem in der Lage die rekombinationsrelevanten Moleküle RAG und TdT zu exprimieren, genau wie DN2- und DN3-Thymozyten. Somit besitzen sie die Eigenschaft von thymischen Zellreifungsintermediaten die in αβ-T-Zellen differenzieren. Im Gegensatz zu diesen bevorzugen sie jedoch ein inflammatorisches Milieu um sich in reife CD4⁺ oder CD8⁺ αβ-T-Zellen zu entwickeln.¹⁴¹

1.11 Fragestellung

T-Zellen sind Lymphozyten, die nach dem Ort ihrer Reifung benannt werden, dem Thymus. Der Thymus beginnt jedoch bereits ab dem 1. Jahr nach der Geburt mit der Involution, sodass seine Produktion an naiven T-Zellen post-adoleszent praktisch zum Erliegen kommt. Gleichzeitig reduzieren Infektionen und Kontakte mit Myriaden fremder und Pathogen-assoziiertes Antigene den Pool an naiven T-Zellen drastisch und damit auch die Diversität des T-Zell-Rezeptor Repertoires, das zur Kennung von Epitopen bereitsteht. Trotzdem ist der Mensch ein Leben lang in der Lage Immunität gegenüber Pathogenen aufzubauen. Neben der Homöostatischen Proliferation, die aber nur den zahlenmäßigen Verlust an naiven T-Zellen ausgleicht sind bisher nur 2 Mechanismen bekannt, die neue Diversität kreieren: als erstes sei hier die T-Zell-Rezeptor Revision genannt, als zweites die Transdifferenzierung einer Subpopulation von $\gamma\delta$ T-Zellen, den $CD4^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen, in $\alpha\beta$ T-Zellen.

Während über die TCR Revision bereits trotz hinreichend erbrachter wissenschaftlicher Belege unterschiedlichster Gruppen auf internationaler Ebene immer noch kontrovers diskutiert wird, gilt die Transdifferenzierung noch als orchideenhaft. Im Hinblick auf die zahlreichen klinischen T-Zell-assoziierten Pathophysiologien wie Autoimmunerkrankungen und im transplantationsmedizinischen Bereich den Immundefizienzen, aber auch den Abstoßungsreaktionen gegen hämatopoetische Transplantate oder solide Organe ist eine genaue Kenntnis der Entstehung von T-Zellen im Erwachsenen wünschenswert. Dies sowohl für die Prophylaxe unerwünschter T-Zellantworten als auch für die Generierung von T-Zellen für eine adoptive T-Zellbasierte Therapie in prekären immundefizienten Situationen alter, chronisch kranker, immunsupprimierter oder stammzelltransplantierte Patienten.

Es wäre daher nicht nur von akademischem Interesse die zur Transdifferenzierung fähige Population näher zu untersuchen und als Ausgangspopulation zur Herstellung

autologer Virus-spezifischer T-Zellen heranzuziehen. Daher ist die Zielsetzung dieser Arbeit zu klären ob die Generierung von Virus-spezifischen, bzw. Epitop-spezifischen $\alpha\beta$ T-Zellen aus dem $CD4^+ V\delta 1^+$ T-Zell-Progenitor möglich ist. Dies soll durch im autologen Setting mit Peptid-gepulsten peripheren Mononukleären Zellen, die $\alpha\beta$ -T-Zell-depletiert sind jedoch die komplette $V\delta 1^+$ T-Zell-Subpopulation enthalten, geklärt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Materialien

Geräte und Laborzubehör

Bezeichnung	Hersteller
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystem®
BD Mircolance TM 3 20G	Becton Dickinson
Kanüle Sterican®	Braun
Beheizbares Wasserbad WB 14	Memmert
BD LSR II Flow Cytometer (FACS)	Becton Dickinson
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG
Brutschrank B6060	Heraeus
Butterfly 21	Abbott
Deckglas	Menzel
Einfrierbehälter, 5100 Cryo 1°C Freezing Container, „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific
Eismaschine	Scotsman
FACS-Röhrchen (5 ml)	Greiner Bio-One/Sarstedt
Flow Cytometry Tubes	Sarstedt
Gefrierschrank: 20°C	Froster Labex® 95, Kirsch
80°C	Model 917, Thermo Fisher
GeneAmp® PCR System 9700 (PCR)	Applied Biosystem®
Handschuhe Peha-soft nitrile white	Hartmann

Bezeichnung	Hersteller
Handschuhe Safeskin	Kimberley-Clark
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One
Kühlschrank	FKU 1800, Liebherr
Laborwaage BP121S	Sartorius
Laborzentrifugen: Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen
Rotanta 46 RSC	Hettich Zentrifugen
Micro centrifuge	Carl Roth
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Gen-Sequenzierung)	Applied Biosystem®
Mikroskope (IX50, CX40)	Olympus
Mikrotiterplatten (96-well)	Falcon®
Mikrowelle	Delonghi-Perfecto
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
NanoDrop ND-2000	PEQLAB
Neubauer Zählkammer	Assistent
Odyssey	Li-Cor BioSciences
Parafilm M	Bemis Company
Pasteur-Pipetten	Fortuna
PCR-Reaktionsgefäße	
Thermo-Strips™	PEQLAB
8-Tube Strips, white	Bio-Rad
Pipetten:	
P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson
0,5-10 µl	Eppendorf Reference®
2-20 µl	Transferpette®-12

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen 10, 20, 100, 200, 1000µl (steril und unsteril)	Greiner Bio-One; Biozym; PEQLAB; TipOne® Starlab
Pipetierhilfen: Pipetboy acu	Integra Biosciences
Accu-Jet®	Brand
Plastikpipetten, steril (1, 5, 10, 25 ml)	Costar
Plate Septa 96-Well (PCR)	Applied Biosystem®
QIAshredder™ (RNA-Isolierung)	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Separationssäulen Typ MS ⁺ , LS ⁺	Miltenyi Biotec
Softasept®N	Braun
Stabpipetten	Greiner Bio-One
Spritze BD Plastipak TM (50 ml)	Becton Dickinson
Sterile Spritzen (2, 10, 20 ml)	Braun, Luer Solo
Sterilfilter Minisart® (20 µm, 40 µm)	Sartorius
Trockeneis	
Tube 8-Cap Strips, domed (PCR)	PEQLAB
Verschiedene Glaswaren	Schott Duran®
Vortexer REAX top	Heidolph
Werkbank Hera safe (steril)	Heräus
Zelletten	Lohmann & Rauscher
Zellkulturflaschen (versch. Größen)	Falcon®
Zellsieb	Falcon®

Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
AlexaFlur 350	Life Technologies
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bovine Serumalbumin (7,5%)	Sigma-Aldrich
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK-Chemie Medical GmbH
DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen
DMEM	GIBCO®
DNA Ladder (50 bp)	Qiagen
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) w/o Ca²⁺/Mg²⁺	GIBCO®
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roth®
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Universitätsapotheke Tübingen
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
GelPilot DNA Loading Dye, 5x	Qiagen
GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard	Life Technologies
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm®
Hi-Di™ Formamid	Life Technologies
Interleukin-2 (Il-2) [30 U/ml]	Immunotools GmbH
Interleukin-7 (Il-7) [2 ng/ml]	Immunotools GmbH
L-Glutamin	Biochrom AG
Lyse-Puffer	Becton Dickinson
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat (1,5 M)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Phytohaemagglutinin (PHA) [0,25µg/ml]	Thermo Fisher Scientific

Bezeichnung	Hersteller
RNase/DNAase freies Wasser	GIBCO®
RPMI 1640	Biochrom AG
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich

2.1.2 Zellkulturmedium und Puffer-Lösungen

Bezeichnung

FACS-Puffer: 1x D-PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) plus FCS (2 %) plus EDTA (2 mM)

MACS-Puffer: 1x D-PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) plus BSA (10 %) plus EDTA (2 mM)

Zellkulturmedium: RPMI 1640, FCS* 10 %, L-Glutamin-Lösung 1 % (2 mM), Penicillin/Streptomycin-Lösung (104 U/ml, 104 µg/ml)

*Das FCS wurde bei 56 °C für 50 Min. inaktiviert und danach in Aliquots á 50 ml bei -20 °C aufbewahrt. Die Antibiotika und das Glutamin wurden gebrauchsfertig zu 5 ml aliquotiert und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2-1 – Liste der verwendeten Primär-Antikörper für die FACS-Analyse

Humanes Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD137	PE	4B4-1	Miltenyi Biotech
CD3	FITC/PerCP	SK7	Becton Dickinson
CD4	VioBlue, (PE, PerCP)	VIT 4	Miltenyi Biotech
CD8 α	APC-H7 (APC, FITC, PerCP)	SK1	Becton Dickinson
CD8 β	APC	2ST8.5H7	Becton Dickinson
TCR- $\alpha\beta$	FITC /PE	T10B9.1A-31 (auch bekannt als T10B9)	Becton Dickinson
TCR- $\alpha\beta$ (C β)	unlabeled	BMA031 / VH31	Genzyme

Materialien

Humanes Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
TCR- $\gamma\delta$ (C δ)	PE / FITC	5A6.E9	Life technologies
TCR- $\gamma\delta$ (C γ)	PE / FITC	11F2 (CE/IVD)	Becton Dickinson
TCR-V δ 1	FITC	TS8.2	Endogen

Tabelle 2-2 – Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper für die FACS-Analyse

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Ratte anti-Maus IgG1	A85-1	FITC	Becton Dickinson
Ratte anti-Maus IgG1	A85-1	PE, APC	Becton Dickinson
Streptavidin	-	PE, APC	Becton Dickinson

Tabelle 2-3 - Liste der Antikörper für die Isotyp-Kontrollen in den FACS-Analysen

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Maus IgG1	X40	FITC, PE, APC	Becton Dickinson
Maus IgG2a	X39	PerCP	Becton Dickinson

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Anti-FITC MicroBeads und Multisort Kit (MACS)	Miltenyi Biotec
Anti-PE MicroBeads (MACS)	Miltenyi Biotec
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit:	Applied Biosystem®
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen
Superscript® III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen

2.1.5 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (PCR)	Applied Biosystem®
BigDye® Terminator v3.1 Master Mix	Life Technologies
Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (inkl. 10X PCR-Puffer, MgCl₂ (50 mM))	Invitrogen

2.1.6 Softwares zur Auswertung

Bezeichnung	Hersteller
3130xl Genetic Analyzer Data Collection Version 3.0	Applied Biosystem®
Sequencing Analysis 5.3	Applied Biosystem®
FACSDiva™ Version 7.0	Becton Dickinson
Microsoft Office 2010: Word, Excel, PowerPoint	Microsoft Corporation
GeneMapper® v4.0	Applied Biosystem®
Image Studio Ver4.0.21	Li-Cor BioSciences

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von mononukleären Zellen des Peripherblutes

Für die Gewinnung von mononukleären Zellen aus dem Peripherblut (Abk. PBMC von engl. peripheral blood mononuclear cell) wurde frisch entnommenes peripheres Vollblut von vier freiwilligen gesunden Spendern benutzt. Das Blut wurde zuerst 1:3 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt (35 ml) und anschließend auf eine Ficoll-Separationslösung (15 ml) geschichtet. Dann wurde es bei 800 g für 15 Minuten (Min.) ausschwingend zentrifugiert (Dichtegradientenzentrifugation). Vorsichtig wurde die Leukozytenschicht abpipettiert, in ein Falcon überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Dann wurde die Lösung für 12 Min. bei 500 g zentrifugiert und der Überstand anschließend bis zum Konus vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde mit der verbleibenden Lösung resuspendiert und in ein neues Falcon überführt. Mit 1 ml PBS wurde erneut gespült und wiederum in das neue Falcon pipettiert. Dieses wurde mit PBS auf 14 ml aufgefüllt und 10 Min. bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, anschließend wurden 2 ml Lyse-Puffer hinzugegeben und für 4 Min. inkubiert. Danach wurde wieder mit PBS auf 14 ml aufgefüllt und für 10 Min. bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert und auf 10 ml aufgefüllt.

2.2.2 Zellzahl-Bestimmung und Ausplattierung

10 μ l des Zell-PBS-Gemisches wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 90 μ l reines PBS hinzugefügt und mittels eines Vortexmischers durchmischt (gevortext). 10 μ l von diesem Gemisch wurden mit 10 μ l Trypanblau versetzt, dieses Gemisch wurde gevortext und vorsichtig zwischen die Neubauer-Zählkammer und das Deckglas pipettiert. Innerhalb der vier Quadranten wurden die lebenden Zellen

ausgezählt (lebende Zellen werden von Trypanblau nicht angefärbt und erscheinen in der mikroskopischen Vergrößerung weiß). Die endgültige Zellzahl wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\frac{X}{4} * 20 = Y * \frac{10^6}{ml}$$

Hierbei gibt „X“ die gezählte Lebend-Zellzahl, „4“ die Anzahl der ausgezählten Quadranten und „20“ den Verdünnungsfaktor mit dem das Zell-PBS-Gemisch verdünnt wurde an. Die Zellen wurden in 96-Well Mikrotiterplatten ausplattiert, und zwar zu maximal 100.000 pro Well (bei geringerer Zellzahl nach Isolation auch 50.000 pro Well). Diese wurden mit 100.000 bzw. 50.000 80-Gy-bestrahlten Feeder-Zellen versetzt. Für jeden Spender wurden mindestens 4 Wells angesetzt. Das Endvolumen betrug 200 µl pro Well.

2.2.3 Mediumwechsel

Dem Zellkulturmedium wurden (je 1 ml) Medium mit Feeder-Zellen hinzugefügt und bei 400 g für 10 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.2). Rechnerisch (Dreisatz) wurde das pro Ansatz benötigte Volumen ermittelt. Beispiel-Rechnung: Betrag die Anzahl der Zellen in der Zell-Medium-Suspension beispielsweise $7,95 * 10^6$ pro ml und die benötigte Zellzahl $1,5 * 10^6$, wurden 2 mal 0,188 ml entnommen, in je zwei Falcons überführt und mit Medium auf jeweils 1 ml aufgefüllt. Eine Zellsuspension wurde mit 10 µl BZLF-1 versetzt, während die andere kein Peptid erhielt. Beide wurden 1 Stunde im Brutschrank inkubiert, anschließend mit 1 ml PBS versetzt, 10 Min. bei 300 g zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Die Zellen wurden erneut mit 1 ml PBS

resuspendiert, 10 Min. bei 300 g zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und in jeweils 0,5 ml Medium gelöst. Anschließend wurden die Zytokine Interleukin-2 (IL-2) [30 U/ml], Interleukin-7 (IL-7) [2 ng/ml] sowie Phytohaemagglutinin (PHA) [0,25 µg/ml] der Medium-Zell-Suspension hinzugefügt. Aus den Wells mit den ausplattierten Zellen wurde Medium-Lösung bis auf 100 ml abgesaugt und die frisch hergestellte mit Zytokinen versetzte Medium-Zell-Suspension (100 ml pro Well) hinzugefügt. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.2.4 RNA-Isolation

Bei Isolierung der RNA wurde mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet. Nach abgeschlossener Lymphozyten-Isolation wurde aus dem Zell-PBS-Gemisch ein Volumen das 5×10^6 Zellen entspricht, in ein Falcon überführt und bei 300 g für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet gelockert und in 350 µl β-RLT-Plus-Puffer (plus β-Mercaptoethanol (10µl/1ml β-RLT)) resuspendiert. An diesem Punkt wurde die Probe entweder bei -80°C eingefroren und gelagert, um mit der Isolierung zu einem späteren Zeitpunkt fortzufahren oder sie wurde zur endgültigen Isolierung direkt weiterverwendet. Es wurde nach dem RNeasy® Plus Mini Handbook (Seite 19 ff.) verfahren. Die hier angegebenen Zentrifugationszeiten wurden jeweils um 20 Sek. verlängert da die Zentrifuge 20 Sek. benötigt um die genannten Umdrehungen pro Min. (UpM) zu erreichen.

- Die Lösung wurde in einen QIAshredder überführt und 2 Min. bei 14.000 UpM zentrifugiert.
- Der Durchfluss wurde in den gDNA Eliminator Mini Spin Column überführt und 30 Sek. bei 14.000 UpM zentrifugiert.
- Dem Durchfluss wurden 350µl (entsprechend der zu Beginn der Isolation hinzugegebenen β-RLT-Plus-Puffer-Menge) 70%iges

Ethanol hinzugefügt, gut durchmischt, die gesamte Lösung in ein RNeasy Mini Spin Column überführt und bei 14.000 UpM für 15 Sek. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

- Es wurden 700 µl RW1-Puffer hinzugefügt und 15 Sek. bei 14.000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- 500 µl RPE-Puffer wurden hinzugegeben und 15 Sek. bei 14.000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, diesmal für 2 Min. bei 14.000 UpM zentrifugiert.
- Optionaler Schritt: Die Säule wurde in ein 2 ml Auffangröhrchen gewechselt und 1 Min. bei 14.000 UpM zentrifugiert.
- Die Säule wurde in ein 1.5 ml Sammelröhrchen gewechselt und es wurden 30-50 µl RNase-freies Wasser vorsichtig direkt auf die Säule pipettiert und 1 Min. bei 14.000 UpM zentrifugiert.
- Die Säule wurde verworfen, das Gefäß mit dem Durchfluss (enthält die isolierte RNA) wurde sofort auf Trockeneis gelegt und falls nicht im Anschluss damit weitergearbeitet wurde, bei -80°C gelagert.

2.2.5 Herstellung der komplementären DNA

Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte das Umschreiben der RNA-Proben in komplementäre DNA (Abk. cDNA, von engl. complementary DNA). Hierbei handelt es sich um DNA, die mit Hilfe von Reverse Transkriptase Enzymen aus RNA hergestellt wird. Hierfür wurde das SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix Kit benutzt. Je nach benötigtem cDNA-Endvolumen wurden die einzelnen Komponenten mit demselben Faktor multipliziert. Die Mengen in der folgenden Beschreibung gelten für 10 µl Endvolumen:

- Pro Ansatz wurden 3 μl der RNA-Probe, je 0.5 μl Oligo(dT)₂₀ (50 μM) und Annealing-Puffer in ein Reaktionsgefäß pipettiert, gevortext und kurz (<1 Min.) zentrifugiert.
- Die Ansätze wurden 5 Min. im Thermozykler bei 65°C inkubiert und anschließend 2 Min. auf Eis gelegt.
- Zu jedem Ansatz wurden 5 μl 2X Reaction Mix und 1 μl SuperScript® III Enzyme Mix hinzupipettiert, gevortext und kurz (<1 Min.) zentrifugiert.
- Die Ansätze wurden ein weiteres Mal im Thermozykler, diesmal für 50 Min. bei 50°C und für 5 Min. bei 85°C inkubiert.
- Die gewonnenen cDNA-Produkte wurden im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

2.2.6 Durchflusszytometrie – FACS

FACS-Analysen (Abk. FACS von engl. fluorescence-activated-cell-sorting) wurden durchgeführt, um die prozentuale Zusammensetzung verschiedener Lymphozyten-Populationen in den PBMCs der gesunden Probanden sowie die Reinheit der isolierten Fraktionen nach MACS-Separation (Abk. MACS von engl. magnetic cell separation) zu bestimmen. Darüber hinaus wurde auch die prozentuale Zusammensetzung ausgesuchter Antigene im Laufe der Zellkulturen (4 bzw. 5 Wochen) bestimmt.

Mithilfe des FACS werden Zellantigene mit Antikörpern markiert und im BD LSR II Flow Cytometer nachgewiesen.

- Es wurden 2x5 Ansätze (ein Ansatz für Peptid-gepulste und ein weiterer für nicht-Peptid-gepulste Zellproben) in Reaktionsgefäßen vorbereitet: Zum einen die Antikörper gegen die humanen Antigene TCR- $\alpha\beta$, TCR- $\gamma\delta$ (C δ), TCR- $\gamma\delta$ (C γ) und CD137, zum anderen ein

Isotyp als Negativ-Kontrolle. Der Isotyp ist Gesamt IgG der Spezies in dem der verwendete Antikörper generiert wurde. Dieses Gesamt IgG wurde mit jeweils 1 Fluorochrom gelabelt.

- Zu jedem Reaktionsgefäß wurde je 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben, 2 Min. bei 660 g zentrifugiert und der Überstand abgekippt.
- 2 µl FCR-Blocking Reagent pro Reaktionsgefäß wurden hinzugefügt, kurz gevortext und 5 Min. im Kühlschrank inkubiert.
- Falls zusätzlich eine C β (-VH31)-Färbung (C δ und C γ) erfolgte:
 - Es wurde eine Primär-Färbung hergestellt: 18 µl FACS-Puffer + 2 µl Anti-C β .
 - 2 µl dieser Lösung wurden zu den jeweiligen Reaktionsgefäßen hinzupipettiert, kurz gevortext und 10 Min. im Dunkeln inkubiert.
 - Es wurde 1 ml FACS-Puffer pro Reaktionsgefäß hinzugegeben, bei 660 g für 2 Min. zentrifugiert und der Überstand abgekippt (waschen).
 - Pro Reaktionsgefäß wurde 1.5 µl APC-Antihuman IgG hinzupipettiert und 10 Min. im Dunkeln inkubiert.
 - Die Proben wurden dreimal mit FACS-Puffer gewaschen.
- Als Negativ-Kontrolle wurde ein Isotyp-Ansatz hergestellt. Die restlichen Ansätze erhielten jeweils 2 µl Anti-V δ 1 (FITC), 2 µl Anti-CD3 (PerCP), 3 µl Anti-CD4 (Pacific Blue) und 1,5 µl Anti-CD8 α (APC-H7). Ansätze mit Antikörpern gegen TCR- $\alpha\beta$ (PE), erhielten zusätzlich 1,5 µl des mit APC-Fluorochrom beladenen Anti-CD8 β , Ansätze mit Anti-TCR-C δ (PE) oder Anti-TCR-C γ (PE), erhielten jeweils 1 µl des mit APC-Fluorochrom beladenen Anti-C β und Ansätze mit Anti-CD137 (PE) Antikörpern, erhielten keinen weiteren Fluorochrom-beladenen Antikörper.
- Die Proben wurden 10 Min. im Dunkeln inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen.

- AlexaFlur 350 (AF350) wurde 1:10 mit PBS verdünnt, kurz gevortext und zu je 1 µl auf alle Reaktionsgefäße verteilt.
- Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden alle Reaktionsgefäße erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Die darin enthaltenen Proben wurden anschließend am BD LSR II Flow Cytometers analysiert und mit FACSDiva™ Version 7.0 (BD) ausgewertet.

2.2.7 Magnetische Zellseparation - Anti-PE MicroBeads

Es wurde nach dem Handbuch „MACS Anti-PE Microbeads“ des Herstellers Miltenyi Biotec verfahren.

Magnetische Markierung

Zu Beginn wurde die Zellzahl im Zell-PBS-Gemisch bestimmt (siehe 2.2.2), anschließend bei 300 g für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Pro 10^7 Zellen wurden 100 µl MACS-Puffer und 10 µl PE-Konjugat hinzugefügt. Diese Puffer-Zell-Suspension wurde gut durchmischt und 10 Min. im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurden 1-2 ml gekühlte Puffer-Lösung pro 10^7 Zellen hinzugefügt und bei 300 g für 10 Min zentrifugiert (waschen). Optional wurde das Waschen wiederholt. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Pellet in 80 µl Puffer pro 10^7 Zellen gelöst. Anschließend wurden 20 µl Anti-PE MicroBeads pro 10^7 Zellen hinzugefügt, gut durchmischt und für 15 Min. im Kühlschrank inkubiert. Erneut wurden 1-2 ml Puffer-Lösung pro 10^7 Zellen hinzugefügt und bei 300 g für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde ein letztes Mal abgesaugt und das Pellet in 500 µl Puffer-Lösung (bei einer Zellzahl bis zu 10^8 Zellen) gelöst.

Magnetische Separation

Für die Magnetische Trennung wurden der MiniMACSTM Separator bzw. MidiMACSTM Separator und die dazu passenden Separationssäulen verwendet. Bei einer Gesamtzellzahl von 2×10^8 wurde die Typ MS-Säule und bei einer Gesamtzellzahl von 2×10^9 die Typ LS-Säule verwendet.

Zunächst wurde die MS- bzw. LS-Säule in einen passenden MACS Separator Magneten (innerhalb des magnetischen Feldes) platziert und einmalig mit 0,5 bzw. 3 ml MACS-Puffer durchgespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert. Der Durchfluss mit den ungelabelten Zellen wurde in einem Falcon gesammelt. Die Säule wurde weitere 3-mal mit je 0,5 bzw. 3 ml MACS-Puffer versetzt. Die Säule wurde auf ein passendes Reaktionsgefäß gesetzt, 1 bzw. 5 ml Puffer-Lösung wurden auf die Säule pipettiert und umgehend durch festes Drücken eines Kolbens am oberen Ende der Säule herausgepresst. Diese Zellsuspension erhielt die magnetisch markierten Zellen.

Depletion

Für die $\alpha\beta$ -T-Zell-Depletion wurde ausschließlich die Typ LD-Säule für eine Gesamtzellzahl von 5×10^8 verwendet. Die LD-Säule wurde in einen passenden MACS Separator (innerhalb des magnetischen Feldes) platziert. Die Säule wurde zu Beginn mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert. Daraufhin wurden zwei mal 1 ml Puffer auf die Säule gegeben. Der $\alpha\beta$ -depletierte Durchfluss mit der ungelabelten Zell-Fraktion wurde für den nächsten Schritt verwendet.

2.2.8 Magnetische Zellseparation von $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen mit Anti-FITC MultiSort Kit

Die Anti-FITC MultiSort Markierung und Sortierung erfolgte nach der Anti-PE MicroBeads Depletion. Für nachfolgende Schritte wurde MACS-Puffer verwendet. Hier wurde nach dem Handbuch „MACS Anti-FITC Multisort“ des Herstellers Miltenyi Biotec verfahren.

Magnetische Markierung

Zu Beginn wurde die Zellzahl ermittelt. Anschließend wurde die Zell-Suspension bei 300 g für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Pro 10^7 Zellen wurden 100 μ l Puffer-Lösung und unabhängig von der Zellzahl 20 μ l FcR Blocking Reagent hinzugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation im Kühlschrank wurden pro 10^7 Zellen 100 μ l Puffer-Lösung sowie 10 μ l FITC-konjugierter anti-humaner $V\delta 1^+$ TCR-Antikörper hinzupipettiert, dann gut durchgemischt und für weitere 10 Min. im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen, d.h. pro 10^7 Zellen wurden 1-2 ml Puffer-Lösung hinzugefügt, bei 300 g für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Optional wurde der Wasch-Schritt wiederholt. Das verbleibende Zell-Pellet wurde in einer Puffer-Beads-Lösung mit Anti-FITC MultiSort MicroBeads resuspendiert. Der Grad der Separation erfolgte auf der Stufe „dim“, d.h. für Zellen die das Antigen nur „dim“ exprimieren. Demnach wurde ein Bead-Antikörper-Verhältnis von 4:1 (80 μ l Puffer-Lösung und 20 μ l Anti-FITC MultiSort MicroBeads) verwendet. Diese Zellsuspension wurde gut durchgemischt und für 15 Min. im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit MACS-Puffer gewaschen und das verbleibende Pellet in 500 μ l Puffer-Lösung (bei einer Zellzahl bis zu 10^8 Zellen) resuspendiert.

Magnetische Separation

Für die Magnetische Trennung wurden der MidiMACS™ Separator bzw. MiniMACS™ Separator und die dazu passenden Separationssäulen verwendet. Die Typ LS-Säule wurde bei einer Gesamtzellzahl von 2×10^9 und die Typ MS-Säule bei einer Gesamtzellzahl von 2×10^8 verwendet. Die LS- bzw. MS-Säule wurde in den MidiMACS™ Separator bzw. MiniMACS™ Separator (innerhalb des magnetischen Feldes) platziert und zunächst mit 3 bzw. 0,5 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert und jeweils 3-mal mit 3 bzw. 0,5 ml Puffer-Lösung nachgespült. Die Säule wurde auf ein passendes Reaktionsgefäß gesetzt, 5 bzw. 1 ml Puffer-Lösung wurden auf die Säule pipettiert und umgehend durch festes Drücken eines Kolbens am oberen Ende der Säule herausgepresst. Diese Zellsuspension enthielt die magnetisch markierten Zellen. Um die Reinheit des Eluats zu erhöhen wurde mit dem erhaltenen Durchfluss die magnetische Separation erneut durchgeführt.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Auswahl der Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (Abk. PCR von engl. polymerase chain reaction) erfolgte auf der Basis von Publikationen, deren Sequenzen mit Hilfe der NCBI-Datenbank verifiziert wurde. Die Synthese vollzog die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland). Sie wurden als Lyophilisat geliefert, in DEPC-Wasser gelöst und aliquotiert (Konzentration 20 pmol/ μ l) und bei -20°C gelagert. Primersequenzen können bei der AG Schilbach nachgefragt werden:

Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach

Tel.: +49707129-84084

Email: karin.schilbach@med.uni-tuebingen.de

V α -PCR

Das untersuchte TRAV-Repertoire umfasste 34 unterschiedliche TRAV-Segmente. Die Primer-Sequenzen wurden von Han *et al*⁵² übernommen. Bei der V α -PCR wurden auf Basis der cDNA-Produkte V α -PCR-Produkte amplifiziert, welche die Sequenzierung von variablen Regionen der TCR α -Ketten ermöglichen. Folgende 11 Kombi-Mixe, je aus 2-4 Primer bestehend, wurden hergestellt:

Kombi-Mix 1:	V α 10, V α 15, V α 16, V α 20
Kombi-Mix 2:	V α 07, V α 17, V α 22, V α 27
Kombi-Mix 3:	V α 01A, V α 03, V α 06
Kombi-Mix 4:	V α 02, V α 08, V α 29
Kombi-Mix 5:	V α 04A, V α 19, V α 30
Kombi-Mix 6:	V α 01B, V α 13, V α 32
Kombi-Mix 7:	V α 05, V α 14, V α 28
Kombi-Mix 8:	V α 23, V α 25, V α 26
Kombi-Mix 9:	V α 09, V α 21, V α 24
Kombi-Mix 10:	V α 11, V α 12, V α 31
Kombi-Mix 11:	V α 04B, V α 18

Je 1 μ l der Kombi-Mixe wurden vorgelegt. Folgender Master-Mix wurde hergestellt:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [μ l]
RNase-freies H₂O	10
Primer TCA4 (20 pmol)	1,0
cDNA	0,5
AmpliAq Gold 360 Master Mix (62,6 U)	12,5

Primer TCA4: TCR constant alpha chain gene primer (reverse);

Jeder Kombi-Mix wurde jeweils mit 24 µl des beschriebenen Master-Mixes versetzt. Alle Ansätze wurden im Thermozykler denaturiert: 1 Zyklus mit 9 Min. und 30 Sek. bei 94°C, daraufhin 35 Zyklen à 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 55°C (Kombi-Mixe 1-2) bzw. bei 59°C (Kombi-Mixe 3-11) und 30 Sek. bei 72°C. Anschließend 1 Zyklus mit 7 Min. bei 72°C und abschließend Abkühlung auf 4°C (anschließend evtl. Lagerung bei -20°C). Im Anschluss wurden 5 µl des PCR-Produktes aus dem ersten Ansatz und je 1 µl der Kombi-Mixe vorgelegt. Ein weiterer Master-Mix wurde hergestellt:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [µl]
RNase-freies H₂O	9,75
10X PCR-Puffer	2
Gelabelter oder nicht-gelabelter Primer	1
MgCl₂ (50 mM)	0,75
dNTPs (0,2 mM)	0,25
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25

10X PCR-Puffer: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl; Primer TRAC1*FAM (TCRAC): TCR constant alpha chain gene primer (reverse); MgCl₂: Magnesium-Chlorid; dNTPs: Desoxyribonukleosidtriphosphate; Taq DNA Polymerase: thermostabile DNA-Polymerase;

Von diesem Master-Mix wurden zu jedem Ansatz 14 µl hinzupipettiert und die Ansätze erneut im Thermozykler denaturiert: 1 Zyklus mit 2 Min. bei 94°C, anschließend 3 Zyklen à 2 Min. bei 55°C (Kombi-Mixe 1-2) bzw. bei 59°C (Kombi-Mixe 3-11) und 10 Min. bei 72°C. Abschließend Abkühlung auf 4°C (anschließend evtl. Lagerung bei -20°C). Die mit TRAC1*FAM gelabelten PCR-Produkte wurden im nächsten Schritt zur Fragmentlängenanalyse vorbereitet. Die ungelabelten PCR-Produkte wurden für eine Sequenzierung weiterverwendet (siehe 2.2.11).

V β -PCR

Das untersuchte TRBV-Repertoire umfasste 27 unterschiedliche TRBV-Segmente. Falls im Anschluss an die PCR eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt werden sollte, wurden gelabelte Primer verwendet. War stattdessen eine DNA-Sequenzierung geplant, wurden für die PCR ungelabelte Primer benutzt.

Folgende Forward-Primer wurden verwendet: V β 1, V β 2, V β 3, V β 4, V β 5.1, V β 5.3, V β 6.1, V β 6.2, V β 7, V β 8, V β 9, V β 10, V β 11, V β 12, V β 13, V β 14, V β 15, V β 16, V β 17, V β 18, V β 19, V β 20, V β 22, V β 23, V β 24, TRBV11.2, TRBV-30.

Jeweils 3.75 μ l RNase-freies H₂O wurden zusammen mit je 1.25 μ l der genannten Forward-Primer (Primer 5'-TRBV) (20 pmol) vorgelegt. So bestand der erste Master-Mix aus folgenden Komponenten:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [μ l]
RNase-freies H₂O	5,7
10X PCR-Puffer	1,5
Reverse Primer (20 pmol)	1
cDNA	1
MgCl₂ (50 mM)	0,8

10X PCR-Puffer: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl; MgCl₂: Magnesium-Chlorid

Dieser Ansatz wurde zu den vorgelegten Forward-Primern (5 μ l) hinzupipettiert. Die Ansätze wurden im Thermozykler denaturiert: Jeweils 1 Zyklus mit 4 Min. bei 99°C, 1 Min. bei 80°C und 1 Min. bei 4°C bzw. auf Eis.

Aus einem zweiten Master-Mix wurden 5 μ l zu jedem Ansatz pipettiert:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [μ l]
RNase-freies H₂O	4,2
10X PCR-Puffer	0,5
dNTPs (0,2 mM)	0,2
Taq DNA Polymerase (0,5 U)	0,1

10X PCR-Puffer: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl; dNTPs: Desoxyribonukleosidtriphosphate; Taq DNA Polymerase: thermostabile DNA-Polymerase;

Die Ansätze wurden erneut im Thermozykler denaturiert: 1 Zyklus mit 4 Min. bei 94°C, daraufhin 40 Zyklen á 45 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 55°C und 45 Sek. bei 72°C. Anschließend 1 Zyklus mit 7 Min. bei 72°C und Abkühlung auf 4°C (evtl. anschließende Lagerung bei -20°C).

Fragmentlängenanalyse

Die V α - und V β -PCR-Produkte wurden 1:10 mit RNase-freiem H₂O verdünnt. Anschließend wurde ein Master-Mix hergestellt und vorgelegt (14 μ l pro PCR-Produkt-Ansatz):

Komponenten	Eingesetztes Volumen [μ l]
Formamid	13,7
GeneScanTM 600 LIZ® Size Standard	0,3

Von diesem Master-Mix wurden 14 μ l vorgelegt. 1 μ l des verdünnten PCR-Produktes wurden pro Ansatz hinzugefügt. Die Proben wurden im Thermozykler für 2 Min. bei 94°C und anschließend 2 Min. auf Eis inkubiert. Jeweils 2:3 des Gesamtgemisches wurden in ein Well einer Optical 96-Well Reaction Plate pipettiert. Die Platte wurde evtl. vorsichtig beklopft um Restbläschen in den gefüllten Wells aufzulösen, im Anschluss kurze Zeit (< 1 Min.) bei 250 g zentrifugiert und im DNA-Sequenzierautomaten analysiert. Die Analyse erfolgte mit der Software „AB

3130xl Genetic Analyzer Data Collection Version 3.0⁶ und die Auswertung mit der Software „AB Sequencing Analysis 5.3.

Konsensus-PCR und Gelelektrophorese

Für die zu analysierenden cDNA-Proben wurden zwei Ansätze vorbereitet und für beide Ansätze wurde je ein Master-Mix hergestellt. Es wurden die degenerierten Primer VP1/2/3/4 und CP1/2 verwendet wie in der Arbeit von Dun Zhou (2006) publiziert.¹⁴² Vom ersten Master-Mix wurden 19 µl pro Proben-Ansatz hergestellt:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [µl]
RNase-freies H₂O	6,8
VP1	2,0
CP1	0,2
Jumpstart	10

VP1: degenerierter Primer; CP1: sequence of the constant region primer 1;

Vom zweiten Master-Mix wurden auch 19 µl pro Proben-Ansatz hergestellt:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [µl]
RNase-freies H₂O	2,8
VP2/3/4	2,0 µl/2,0 µl/2,0
CP2	0,2
Jumpstart	10

VP2/3/4: degenerierte Primers; CP2: sequence of the constant region primer 2;

Jedem vorgelegten Master-Mix wurden je 1 µl cDNA hinzugefügt. Anschließend wurden die Ansätze im Thermozykler denaturiert: 1 Zyklus mit 2 Min. bei 94°C, daraufhin 50 Zyklen à 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 50°C und 30 Sek. bei 72°C. Danach 10 Min. bei 72°C und abschließende Abkühlung auf 4°C.

Im Anschluss wurden 1.5 g Agarose-Pulver zu 100 ml TBE-Puffer hinzugefügt (1,5%), in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend 1 µl GelRed hinzugefügt um die Amplifikate sichtbar zu machen. Zwischendurch wurde das Gefäß vorsichtig geschwenkt bis sich alle Agarose-Teilchen gelöst hatten. Die Lösung wurde nach kurzem Abkühlen bei Raumtemperatur vorsichtig in einen Gel-Schlitten gegossen. Je ein Kamm wurde an ein Ende und in die Mitte des Gel-Schlittens platziert. Nachdem die Lösung verhärtet war, wurden die Kämmen entfernt und die Elektrophorese-Kammer mit TBE-Puffer aufgefüllt. Danach wurde jede Probe (8 µl) mit jeweils 2 µl GelPilot DNA Loading Dye (5x) vermischt und vorsichtig in die einzelnen Kammern pipettiert. Eine Kammer wurde mit 3 µl DNA ladder (50 bp) gefüllt. Nun wurde die Vorrichtung verschlossen und ein elektrischer Strom mit der Stromstärke von 100 Volt aktiviert. Nach 1,5 Std. wurde der Vorgang gestoppt und das Gel im Li-Cor Odyssey analysiert.

2.2.10 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der vorhandenen PCR-Produkte wurde das „MinElute PCR Purification Kit“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) benutzt und wie im Protokoll des Herstellers angegeben, vorgegangen. Dieses Protokoll dient zur Entfernung von Restbeständen und Unreinheiten aus den PCR-Produkten.

- Die fünffache Menge an PB-Puffer (125 µl) wurde dem PCR-Produkt (25 µl) jeweils hinzugefügt und die Lösung gut durchgemischt.
- MinElute Säulen wurden in 2 ml Sammelröhrchen platziert.
- Jeder Ansatz wurde jeweils mittig auf die Membran einer MinElute Säule pipettiert und für 1 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert.
- Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen wieder in dasselbe Sammelröhrchen platziert.

- Dann wurden 750 μ l PE-Puffer pro Ansatz auf die MinElute Säule pipettiert und für 1 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert.
- Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule im selben Sammelröhrchen nochmals 1 Min. auf voller Geschwindigkeit (14.000 UpM) zentrifugiert.
- Die MinElute Säulen wurden jeweils in ein 1.5 ml Mikrozentrifugenröhrchen platziert.
- Je 10 μ l EB-Puffer wurden mittig auf je eine Säulenmembran pipettiert, für 1 Min. stehen gelassen und nochmals für 1 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert.
- Die MinElute Säulen wurden verworfen, die Deckel der 1.5 ml Auffangröhrchen (mit dem Durchfluss) wurden geschlossen und mit Parafilm abgedichtet, dann bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.11 BigDye® Termination und Aufreinigung zur DNA-Sequenzierung

Mithilfe dieser Methode kann die Abfolge der Nukleotide in einem DNA-Molekül ermittelt werden. Für diesen Schritt wurde u.a. das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit benutzt. Zu Beginn wurden die DNA-Konzentrationen der Proben bestimmt (Spektralphotometer: NanoDrop ND-2000) und damit die Mengen zur Verdünnung der folgenden Ansätze berechnet.

Spezifische V α oder V β Forward-Primer bzw. C α oder C β Reverse-Primer wurden vorgelegt. Es wurden 10 ng/ μ l des PCR-Produktes für die Sequenzierung eingesetzt. Nach folgendem Schema wurde pipettiert:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [μ l]
Primer (1:20 verdünnt)	0,8
Produkt (1 ng/μl)	1
5X Sequencing Buffer (1x)	1,5
DMSO (5 %)	0,5
RNase-freies H₂O	5,7

DMSO: Dimethylsulfoxid

Zur Denaturierung der DNA wurden die Ansätze im Thermozykler für 5 Min. bei 98°C inkubiert. Im Anschluss wurden 0,5 μ l BigDye® Terminator zu jedem Ansatz hinzugefügt (Gesamtmenge pro Ansatz 10 μ l). Die Ansätze wurden erneut im Thermozykler inkubiert: Für 1 Min. bei 98°C, dann 25 Zyklen à 20 Sek. bei 98°C, 10 Sek. bei 50°C und 4 Min. bei 60°C, und zum Schluss Abkühlung auf 4°C.

Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung für die Sequenzierung. Hierzu wurden 1,5 μ l Eppendorf-Reaktionsgefäße benutzt. Die Komponenten wurden in der genannten Reihenfolge hinzugegeben:

Komponenten	Eingesetztes Volumen [μ l]
1. EDTA (250 nM)	0,5
2. NaAc (1,5 M)	2
3. EtOH (100%)	25

EDTA: Ethylendiamintetraacetat; NaAc: Natriumacetat; EtOH: Ethanol

Zur Ethanol-Fällung wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Ansätzen für 15 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 30 Min. bei 14.000 UpM (4°C) zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und den Proben wiederum jeweils 125 μ l EtOH (70%) hinzugefügt. Die Ansätze wurden erneut für 15 Min. bei 14.000 UpM (4°C) zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Eppendorf-Reaktionsgefäße zum Trocknen unter der Sterilbank stehen

gelassen. Die Pellets wurden anschließend jeweils in 10 µl Formamid gelöst, in die MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate pipettiert und in den Sequenzer gestellt.

Auswertung der erhaltenen Nukleotidsequenzen

Die Auswertung der bei der Sequenzierung erhaltenen Nukleotidsequenzen erfolgte wie folgt: Zunächst wurde die aus der Analyse erhaltene Reverse-Sequenz mit Hilfe der Internet-Software „Reverse Complement“ (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) invertiert. Anschließend wurde die aus der Analyse erhaltene Forward-Sequenz mit der invertierten Reverse-Sequenz abgeglichen. Dies erfolgte mit Hilfe der Internet-Software „Emboss Needle“ (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html). Forward- und invertierte Reverse-Sequenzen wurden auf konsistente Nukleotidsequenzen geprüft und mit Hilfe der Software „Standard Nucleotide Blast“ (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) auf Sequenzen im human genomic plus transcript (Human G+T) Datenbestand durchsucht. Die TRAV-, TRAC- und TRAJ- bzw. TRBV-, TRBC- und TRBJ-Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung wurden ausgesucht und mittels „Emboss Transeq“ (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) in ihre entsprechenden Aminosäure-Sequenzen konvertiert. Nicht-kodierte Regionen zwischen TRAV- und TRAJ-Regionen (V α -Familien) sowie zwischen TRBV- und TRBD- und TRBD- und TRBJ-Region (V β -Familien) entsprechen dabei den hochvariablen CDR3-Regionen.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von $\alpha\beta^+$ T-Zellen aus $V\delta 1^+$ T-Zellsubpopulationen

Wir haben aus dem Buffy-Coat von 4 gesunden HLA-B35⁺ Spendern (zwei Männer und zwei Frauen im Alter von 28 bis 45 Jahren) die $\alpha\beta$ -T-Zellen quantitativ depletiert und anschließend die $V\delta 1^+$ T-Zellen positiv isoliert. Dieser Vorgang führte dazu, dass wir zu 100% reine $V\delta 1^+$ Populationen erhielten. Die Zellen wurden in zwei Fraktionen aufgeteilt, sodann mit und ohne BZLF-1 in 96-Well Mikrotiterplatten zu je 100.000 Zellen (plus 100.000 Feeder-Zellen) ausplattiert und 4 bzw. 5 Wochen in Standardkulturmedium inkubiert. Wöchentlich wurden Mediumwechsel und FACS-Messungen durchgeführt. Ermittelt wurden dabei zum einen die Anzahl der Ereignisse und zum anderen die prozentualen Anteile der TCR $\alpha\beta$ -Fraktionen an den lebenden Lymphozyten.

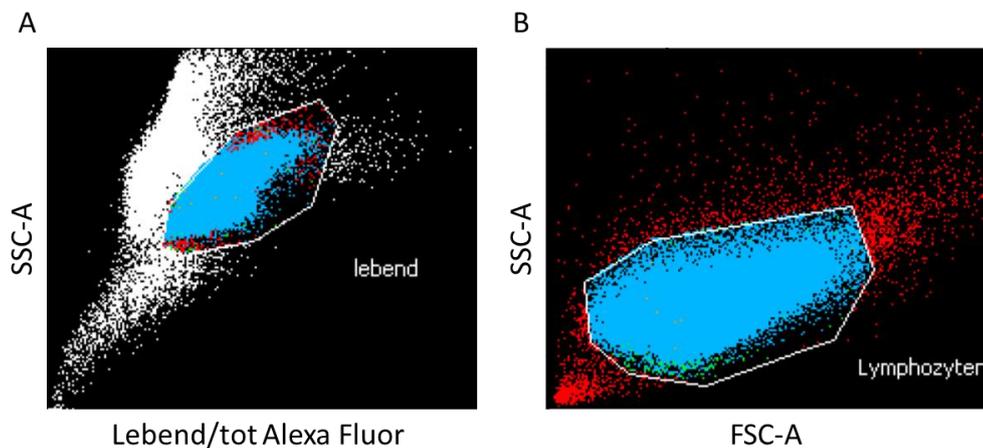


Abbildung 3-1 - Zu sehen sind die mit Alexa Fluor 350 markierten Zellen. Spender 1, HLA-B35⁺, Zellkulturwoche 1, BZLF-1-gepulst: (A) Aufgetragen sind SSC-A (Granularität der Zellen) gegen die lebend/tot Zellen; die Lebendzellfraktion ist in einem Gate markiert. (B) Aufgetragen sind SSC-A (Granularität der Zellen) gegen FSC-A (Volumen der Zellen). Markiert in einem Gate ist der Lymphozyten-Anteil der Lebend-Zellen.

Die Auswertung der FACS-Analysen erfolgte wie folgt: Zunächst wurden die Lebendzellen in einem Gate markiert und innerhalb dessen mit einem weiteren Gate der Lymphozyten-Anteil ermittelt (Abb. 3-1). Anschließend wurden innerhalb der Lymphozyten-Fraktion zwei weitere Gates eingefügt um TCR $\alpha\beta$ - bzw. V δ 1-markierte Zellen zu erfassen (Abb. 3-2). Deren jeweiliger Anteil an den Lebendzellen wurde rechnerisch ermittelt und in Diagrammen aufgetragen (Abb. 3-4, 3-6, 3-8 und 3-10).

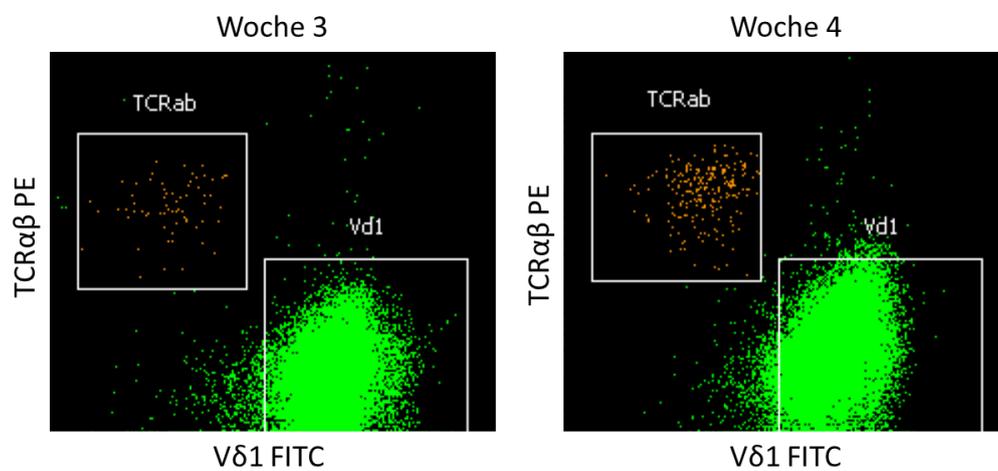


Abbildung 3-2 - Aufgetragen ist die TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zell-Fraktion gegen die V δ 1⁺ Zell-Fraktion. Beispielhaft: Spender 1, HLA-B35⁺, BZLF-1-gepulst in Woche 3 (links) und Woche 4 (rechts).

3.1.1 Analyse des $\alpha\beta$ TCR-Repertoires im FACS

Zur Beurteilung der TCR $\alpha\beta$ -Expression im Zellkulturverlauf wurden die FACS-Analysen der BZLF-1-gepulsten und nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen verglichen. Dabei zeigte sich eine spenderabhängige TCR $\alpha\beta$ -Expression. Alle in diesem Abschnitt genannten prozentualen Angaben beziehen sich auf die Gesamtheit der jeweiligen Lebend-Lymphozyten-Fractionen.

Spender 1

Für BZLF-1-gepulste Zellen des Spenders 1 konnte eine deutliche Zunahme der TCR $\alpha\beta$ -Fraktion von 0,0 % in der 1. Woche auf 3,8 % in der 5. Woche registriert werden. Nicht-stimulierte Zellen des Spenders 1 dagegen zeigten eine geringere Zunahme der TCR $\alpha\beta$ -Fraktion von 0,0 % in der 1. Woche auf 0,2 % in der 5. Woche (Abb. 3-3).

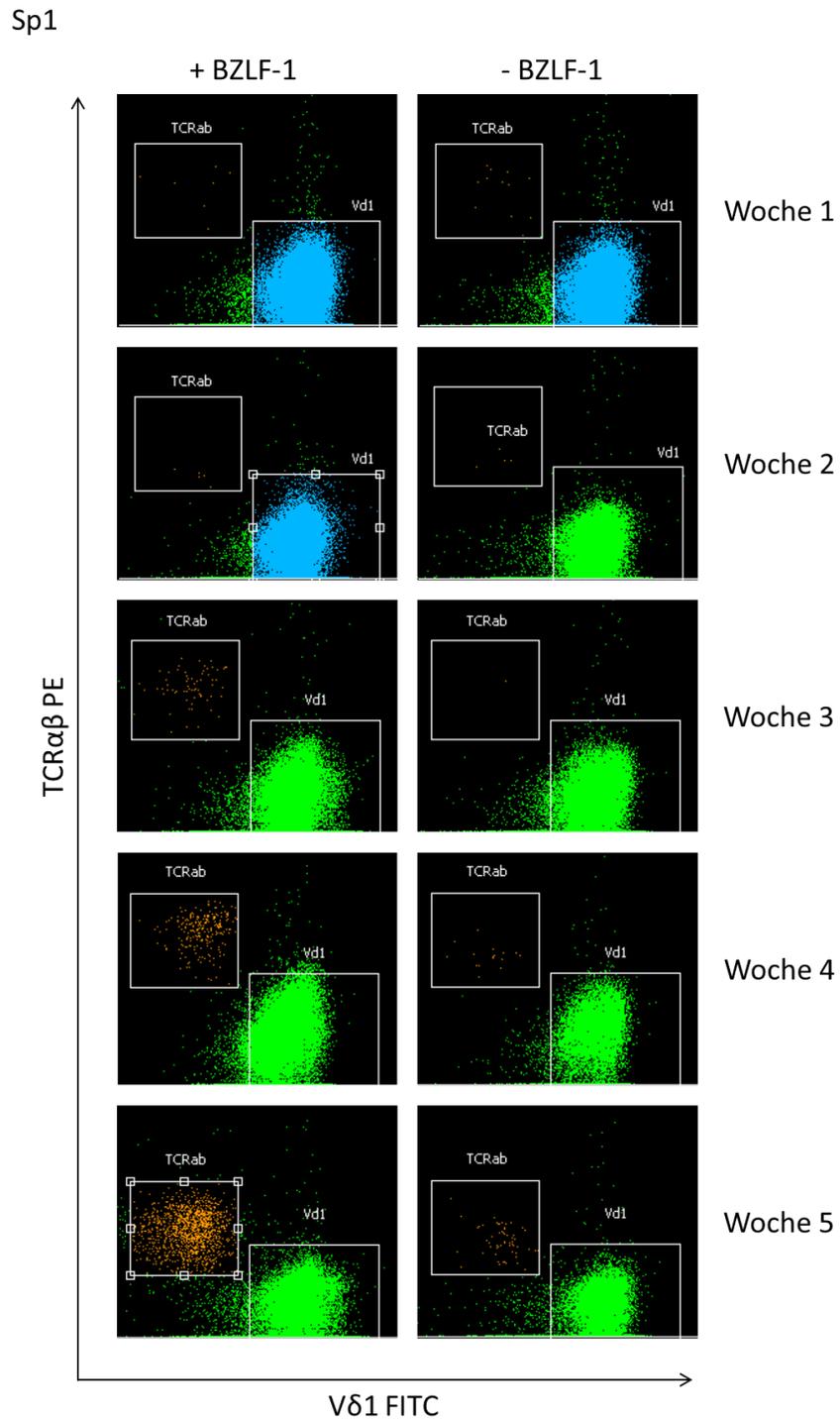


Abbildung 3-3 - Aufgetragen ist die TCRαβ⁺ T-Zell-Fraktion gegen die Vδ1⁺ T-Zell-Fraktion. Dargestellt sind die FACS-Ergebnisse der BZLF-1-gepulsten und nicht-gepulsten Zellen des HLA-B35⁺ Spenders 1 im Zellkulturverlauf (5 Wochen).

Die BZLF-1-exponierten Zellen von Spender 1 zeigten in Woche 1 und 2 keine TCR $\alpha\beta$ -Expression, in der 3. Woche 0,1 %, in der 4. und 5. Woche bereits 0,8 % beziehungsweise 3,8 %. Die nicht BZLF-1-gepulsten Zellen des Spenders 1 zeigten bis Woche 3 keine TCR $\alpha\beta$ -Expression (0,0 %), in Woche 4 und 5 dann einen TCR $\alpha\beta$ -Anteil von 0,1 % bzw. 0,2 % (Abb. 3-4).

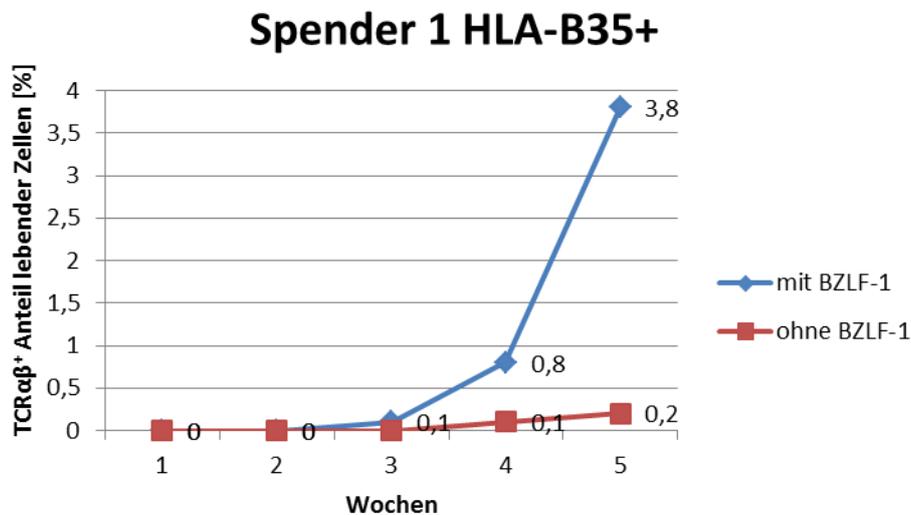


Abbildung 3-4 - TCR $\alpha\beta$ -Anteil im Zellkulturverlauf von HLA-B35⁺ Spender 1. Auf der Y-Achse ist der prozentuale TCR $\alpha\beta$ -Anteil an Lebend-Lymphozyten eingetragen und auf der X-Achse die Wochen im Verlauf der Zellkultur. Die rote Linie stellt nicht BZLF-1-gepulste und die blaue Linie BZLF-1-gepulste Zellreihen dar.

Spender 2

Die TCR $\alpha\beta$ -Fraktionen bei Spender 2 hatten ihr Maximum sowohl für BZLF-1-gepulste als auch nicht-gepulste Zellen in der 1. Woche. Für stimulierte Zellen war ein TCR $\alpha\beta$ -Anteil von 3,9 % in der 1. Woche und 0,0 % für die restlichen Wochen zu verzeichnen. Nicht-stimulierte Zellen zeigten einen TCR $\alpha\beta$ -Anteil von 3,3 % in der 1. Woche, anschließend 0,2 % in der 5. Woche (Abb. 3-5).

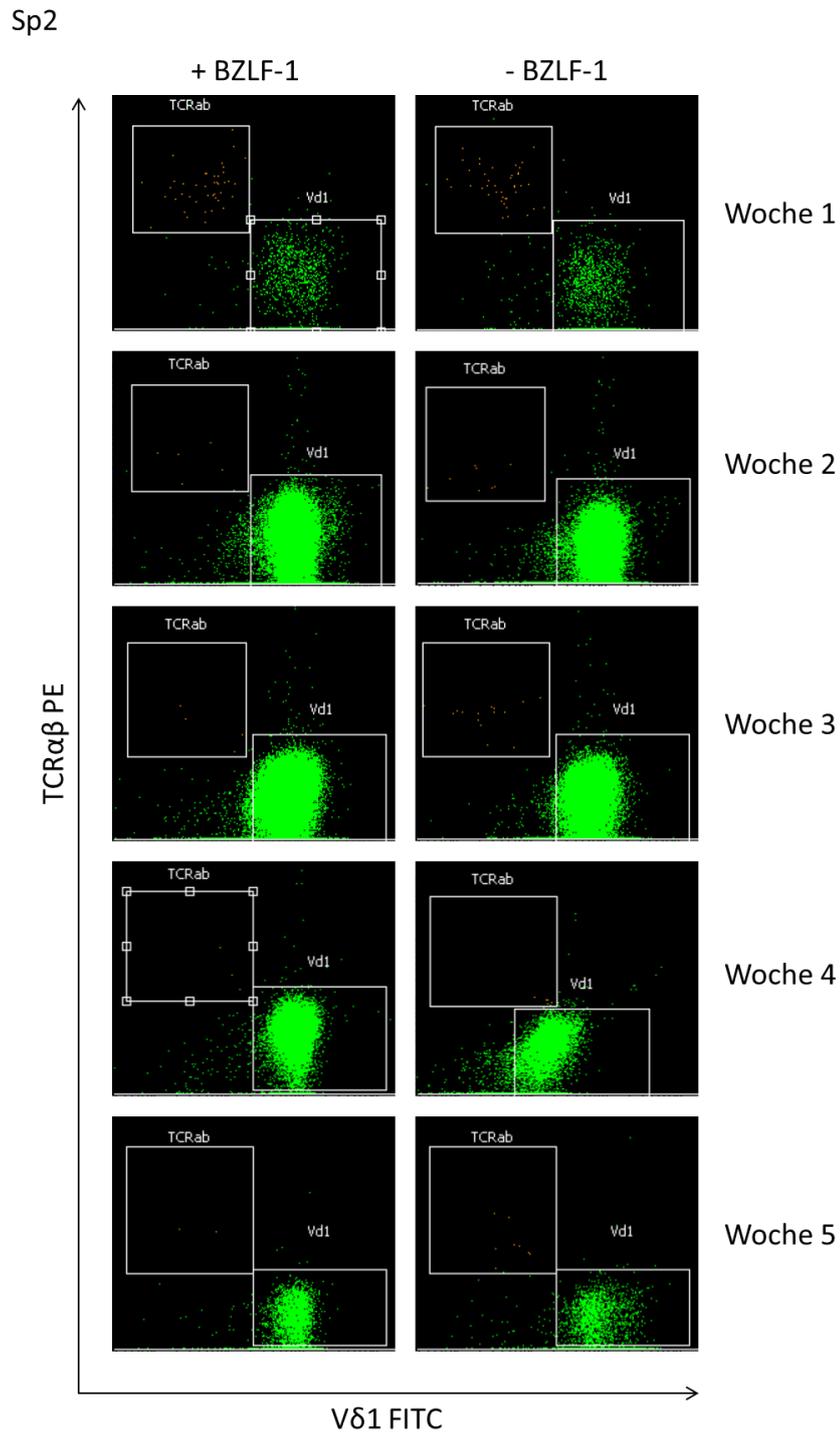


Abbildung 3-5 - Aufgetragen ist die TCRαβ⁺ T-Zell-Fraktion gegen die Vδ1⁺ T-Zell-Fraktion. Dargestellt sind die FACS-Ergebnisse der BZLF-1-gepulsten und nicht-gepulsten Zellen des HLA-B35⁺ Spenders 2 im Zellkulturverlauf (5 Wochen).

Maximale Expression der TCR $\alpha\beta$ -T-Zellfraktion zeigte sich in der 1. Woche. Der TCR $\alpha\beta$ -Anteil für BZLF-1-exponierte Zellen in Woche 1 betrug 3,9 %, der in der Zellkultur ohne BZLF-1-Exposition 3,3 %. In den Wochen 2 und 3 zeigten sich keine TCR $\alpha\beta$ - Expression mehr (0,0 %). Die BZLF-1-gepulste Zellfraktion zeigte auch in den Woche 4 und 5 keine TCR $\alpha\beta$ -Expression (0,0 %). Dagegen zeigten die nicht-BZLF-1-gepulsten Zellen eine geringe Zunahme der TCR $\alpha\beta$ -Expression auf 0,1 % in der 4. Woche und 0,2 % in der 5. Woche (Abb. 3-6).

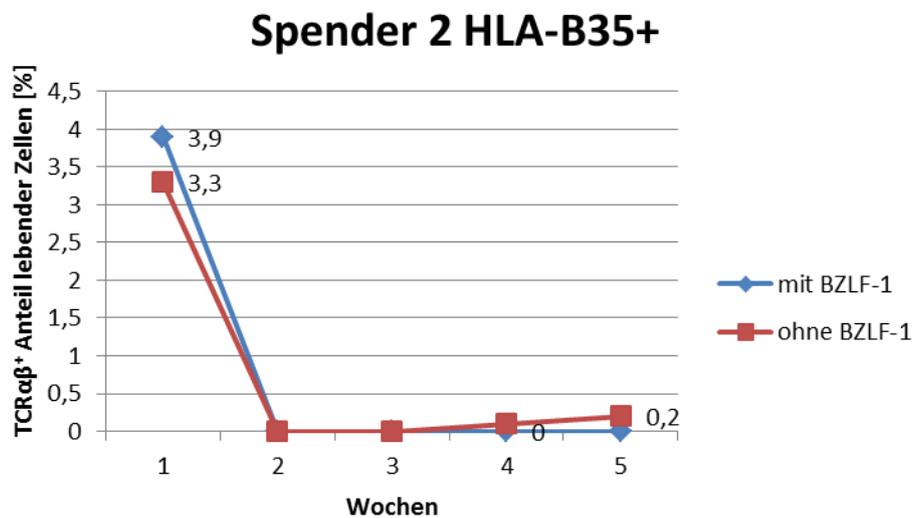


Abbildung 3-6 - TCR $\alpha\beta$ -Anteil im Zellkulturverlauf von HLA-B35⁺ Spender 2. Auf der Y-Achse ist der prozentuale TCR $\alpha\beta$ -Anteil an Lebend-Lymphozyten eingetragen und auf der X-Achse die Wochen im Verlauf der Zellkultur. Die rote Linie stellt nicht BZLF-1-gepulste und die blaue Linie BZLF-1-gepulste Zellreihen dar.

Spender 3

Für die Zellen des Spenders 3 zeigte sich sowohl für BZLF-1-gepulste als auch nicht-gepulste Zellkulturen ein variabler Verlauf der TCR $\alpha\beta$ -Expression. Der maximale TCR $\alpha\beta$ -Anteil betrug für BZLF-1-gepulste Zellen 1,7 % und für nicht-BZLF-1-gepulste Zellen 2,5 % (Abb. 3-7).

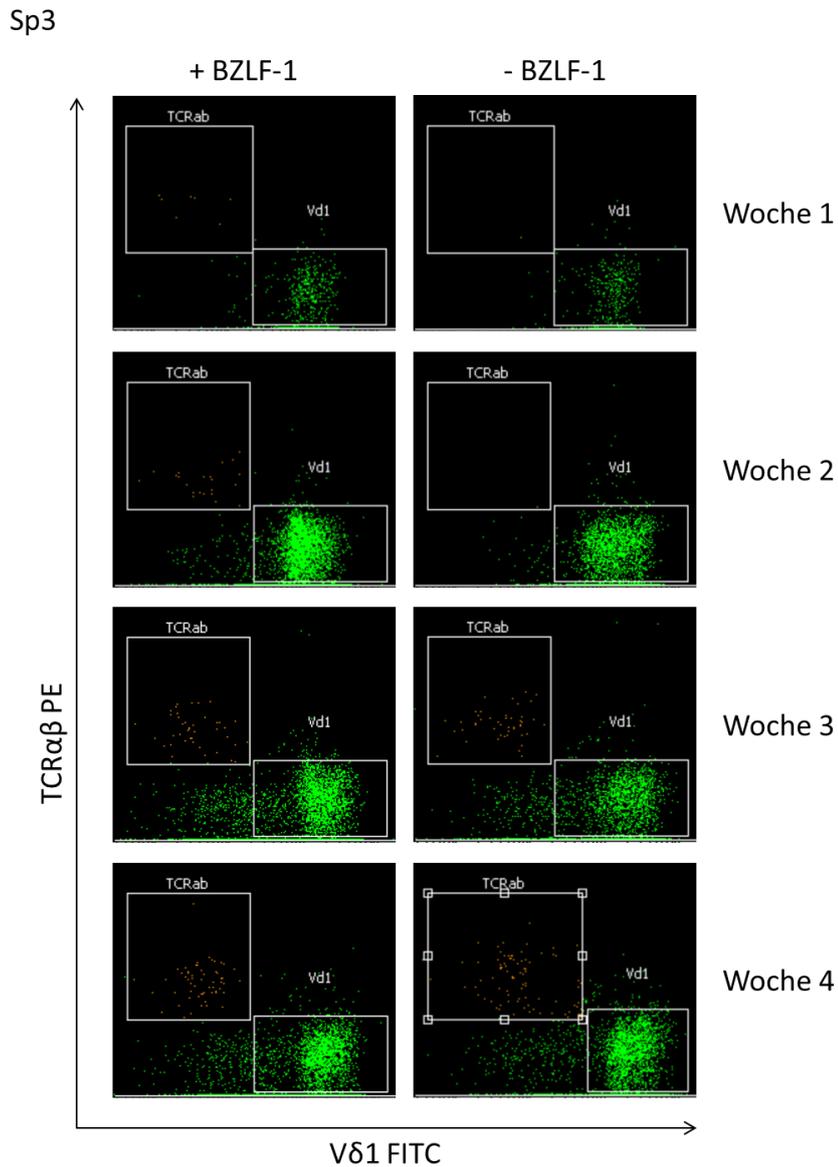


Abbildung 3-7 - Aufgetragen ist die TCRαβ⁺ T-Zell-Fraktion gegen die Vδ1⁺ T-Zell-Fraktion. Dargestellt sind die FACS-Ergebnisse der BZLF-1-gepulsten und nicht-gepulsten Zellen des HLA-B35⁺ Spenders 3 im Zellkulturverlauf (4 Wochen).

In Woche 1 betrug der TCRαβ-Anteil BZLF-1-gepulster Zellkulturen 1,1 %, während er in Zellkulturen ohne BZLF-1-Exposition mit 0,2 % geringer ausfiel. Von Woche 1 auf Woche 2 kam es zu einem Abfall der TCRαβ-Anteile auf 0,4 % (BZLF-1-exponiert) und 0,0 % (nicht BZLF-1-exponiert). In der 3. Woche zeigten die

BZLF-1-gepulsten Zellen einen $\text{TCR}\alpha\beta$ -Anteil von 1,0 % und die nicht-BZLF-1-gepulsten Zellen einen $\text{TCR}\alpha\beta$ -Anteil von 1,6 %. In Woche 4 kam es zu einem weiteren Anstieg der $\text{TCR}\alpha\beta$ -Anteile für die Zellkulturen mit BZLF-1-Exposition (1,7 %) und ohne BZLF-1-Exposition (2,5 %). Der prozentuale $\text{TCR}\alpha\beta$ -Anteil für die nicht-Peptid-exponierten Zellen fiel von der 1. auf die 2. Woche auf 0,0 %. Von Woche 2 auf 3 und von Woche 3 auf 4 kam es erneut zu einem Anstieg der $\text{TCR}\alpha\beta$ -Fraktion der nicht-gepulsten Zellen (Abb. 3-8).

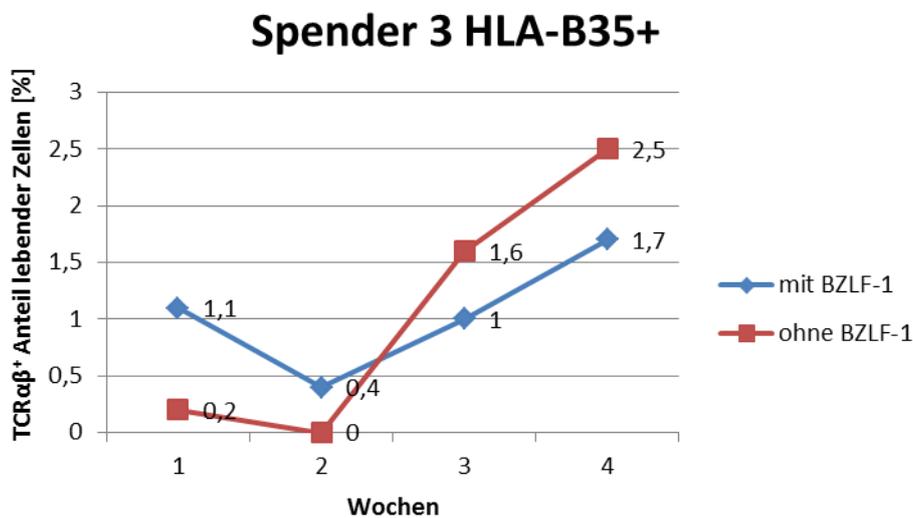


Abbildung 3-8 - $\text{TCR}\alpha\beta$ -Anteil im Zellkulturverlauf von HLA-B35^+ Spender 3. Auf der Y-Achse ist der prozentuale $\text{TCR}\alpha\beta$ -Anteil an Lebend-Lymphozyten eingetragen und auf der X-Achse die Wochen im Verlauf der Zellkultur. Die rote Linie stellt nicht BZLF-1-gepulste und die blaue Linie BZLF-1-gepulste Zellreihen dar.

Spender 4

Für BZLF-1-gepulste Zellen des Spenders 4 konnte nur eine geringfügige Zunahme der $\text{TCR}\alpha\beta$ -Fraktion im Verlauf der Zellkultur detektiert werden, mit einem maximalen $\text{TCR}\alpha\beta$ -Anteil von 0,4 % in der 4. Zellkulturwoche. Dagegen zeigten nicht-gepulste Zellen desselben Spenders ihre maximale $\text{TCR}\alpha\beta$ -Expression in der 5. Zellkulturwoche mit 4,2 % (Abb. 3-9).

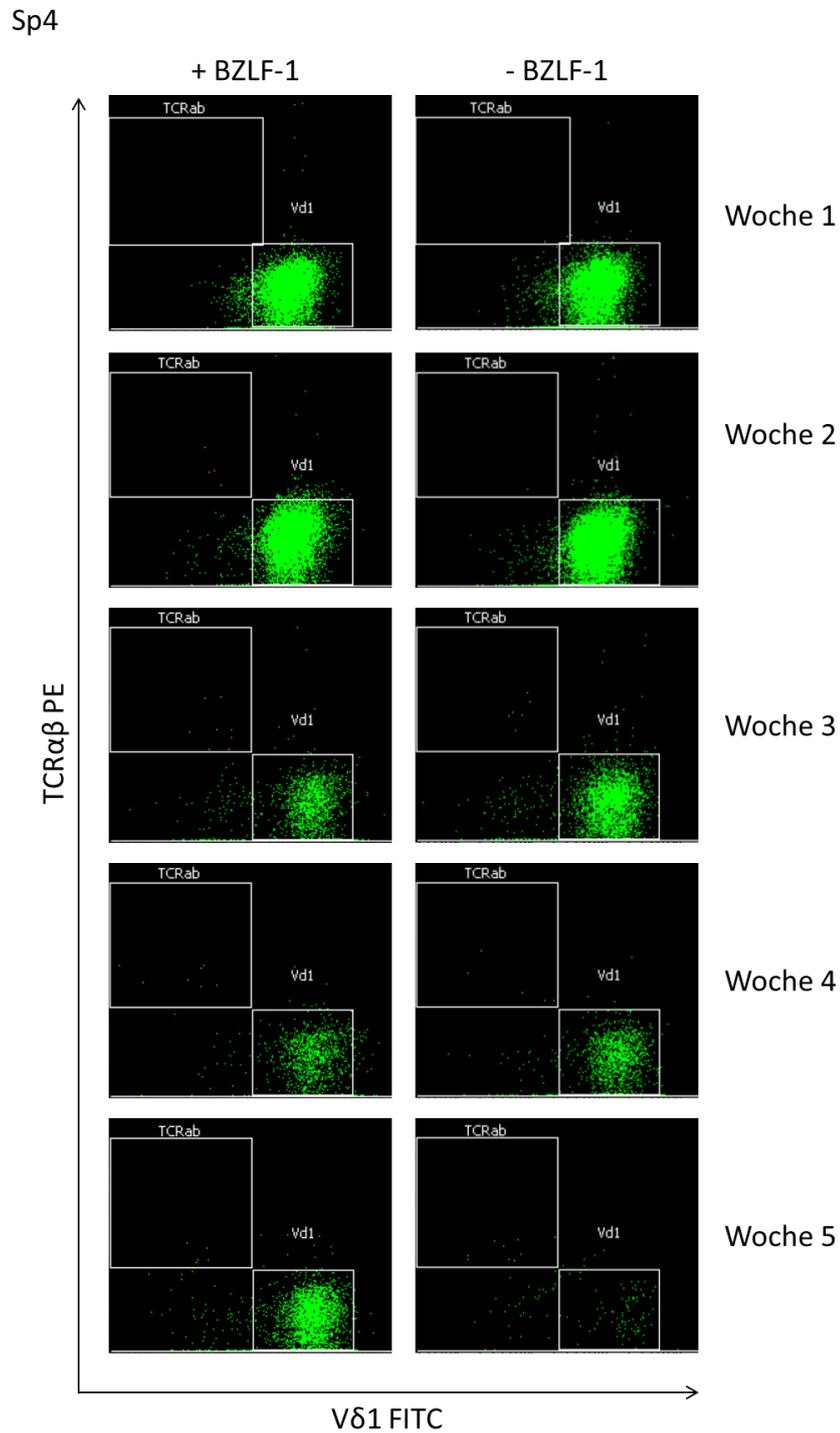


Abbildung 3-9 - Aufgetragen ist die TCRαβ⁺ T-Zell-Fraktion gegen die Vδ1⁺ T-Zell-Fraktion. Dargestellt sind die FACS-Ergebnisse der BZLF-1-gepulsten und nicht-gepulsten Zellen des HLA-B35⁺ Spenders 4 im Zellkulturverlauf (5 Wochen).

In den ersten beiden Wochen zeigten weder BZLF-1-gepulste noch nicht-gepulste Zellkulturen eine TCR $\alpha\beta$ -Expression (0,0 %). BZLF-1-gepulste Zellen zeigten in der 3. Woche einen TCR $\alpha\beta$ -Anteil von 0,3 %, in der 4. Woche von 0,4 % und in der 5. Woche einen TCR $\alpha\beta$ -Anteil von 0,1 %. Für nicht-BZLF-1-gepulste Zellkulturen waren TCR $\alpha\beta$ -Anteile von 0,1 % in der 3. Woche, von 0,2 % in der 4. Woche und von 4,2 % in der 5. Woche zu verzeichnen (Abb. 3-10).

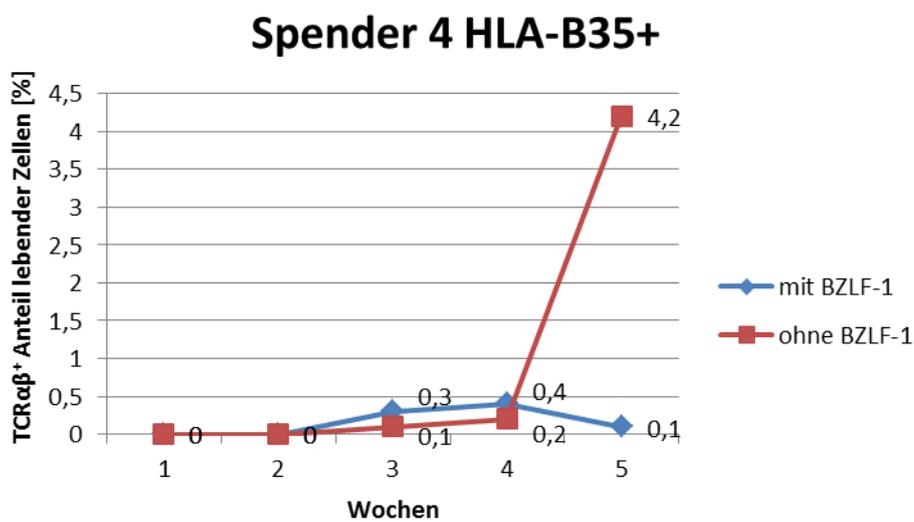


Abbildung 3-10 - TCR $\alpha\beta$ -Anteil im Zellkulturverlauf von HLA-B35⁺ Spender 4. Auf der Y-Achse ist der prozentuale TCR $\alpha\beta$ -Anteil an Lebend-Lymphozyten eingetragen und auf der X-Achse die Wochen im Verlauf der Zellkultur. Die rote Linie stellt nicht BZLF-1-gepulste und die blaue Linie BZLF-1-gepulste Zellreihen dar.

3.2 Spectratyping der $V\alpha$ - und $V\beta$ -Familien im Zellkultur-Verlauf

3.2.1 Human T-cell receptor α chain variable regions und human T-cell receptor β variable regions

Die sogenannten „human T-cell receptor α chain variable regions“ (TRAV) und „human T-cell receptor β chain variable regions“ (TRBV) Gene befinden sich auf den Chromosomen 14 bzw. 7 und kodieren für die Proteinsegmente, welche nach Rekombination mit (D-), J- und C-Segmenten jeweils ein Homodimer des aus einer α - und einer β -Kette aufgebauten TCR-Heterodimers bilden. Mittels Spectratype-Analysen konnten wir die relative Frequenz der Rekombinationshäufigkeit für jedes Gensegment bestimmen. Hierbei haben wir in einer tabellarischen Auflistung die Anzahl der Peaks für alle Spender und alle Wochen im Zellkulturverlauf (4 Wochen) erörtert (Tab. 3-1 und 3-2).

Wir bestimmten die Anzahl der Expressionen der einzelnen Gensegmente für jeden Spender. Hierbei wurde lediglich eine grobe Einteilung nach Peptid-exponierten und nicht-Peptid-exponierten Expressionssignalen vorgenommen. Identische Expressionsmuster und Expressionssignale unter einer Höhe von 100 wurden nicht als vollwertige Expressionen gewertet. Zudem erfolgte eine präzisere Bewertung der Ergebnisse, indem die wöchentlichen Expressionssignale miteinbezogen wurden.

Außerdem ermittelten wir Zellkulturwochen- und Peptid-Expositions-abhängige complexity scores für jede $V\alpha$ - und $V\beta$ -Familie aller vier Spender und bildeten ihre ($V\alpha$ -/ $V\beta$ -)Ratio (siehe 3.2.2). Für die folgenden Abschnitte „TRAV-Segmente“ und „TRBV-Segmente“ gilt: Die Peak-Höhen der Expressionssignale der jeweiligen Segmente werden durch die Zahlen in den Klammern angegeben.

TRAV-Segmente

TRAV-Gensegmente (Tab. 3-1) die häufig exprimiert wurden waren u.a. die Gensegmente 14DV4, 29DV5, 8-1 und 5. Diese wurden unabhängig vom Spender und der Peptid-Behandlung, d.h. von jedem Spender in unterschiedlichen Wochen exprimiert. Nicht-Peptid-exponierte Zellen von Spender 1 exprimierten kein TRAV-Segment 8-1 und von Spender 3 kein TRAV-Segment 5.

Die Segmente 8-4, 9-2, 17 und 24 wurden jeweils 5-mal im Zellkulturverlauf exprimiert. Das Segment 8-4 wurde nur von nicht-Peptid-gepulsten Zellen der Spender 1 und Spender 2 nicht exprimiert. Das Segment 9-2 wurde von den Spendern 2 und Spender 3, sowie von nicht-gepulsten Zellen des Spenders 4 exprimiert. Spender 1 und BZLF-1-gepulste Zellen des Spenders 4 exprimierten das TRAV-Segment 9-2 nicht. Das Gensegment 17 wurde von den Spendern 1 und Spender 4 mit und ohne BZLF-1-Exposition exprimiert, ferner auch von nicht-Peptid-exponierten Zellen des Spenders 3. BZLF-1-gepulste Zellen der Spender 2 und Spender 3 sowie nicht-BZLF-1-gepulste Zellen des Spenders 2 exprimierten das Segment 17 nicht. Das TRAV-Segment 24 wurde von Peptid-gepulsten Zellen der Spender 1, Spender 2, Spender 3 und Spender 4 sowie von nicht-gepulsten T-Zellen des Spenders 3 exprimiert. Nicht-gepulste Zellen der Spender 1, Spender 2 und Spender 4 exprimierten das Gensegment 24 nicht.

Jeweils 4-mal im Zellkulturverlauf wurden die Segmente 10, 20 und 26-2 exprimiert. Während das Gensegment 10 von Peptid-gepulsten und nicht-gepulsten Zellen der Spender 3 und Spender 4 exprimiert wurde, exprimierten Peptid-gepulste Zellen der Spender 2 und Spender 4 und nicht-gepulste Zellen der Spender 2 und Spender 3 das Segment 26-2. Das Segment 20 wurde von Peptid-gepulsten Zellen der Spender 1 und Spender 4 sowie nicht-gepulsten Zellen der Spender 2 und Spender 3 exprimiert.

Die α -Gensegmente 14DV4 sowie 29DV5 waren mit 8-mal die am häufigsten exprimierten Segmente. Das Segment 14DV4 wurde von Peptid-gepulsten Zellreihen des Spenders 1 in den Wochen 1 bis 4 und von nicht-gepulsten Zellreihen in den

Wochen 1 (<100), 2 und 4 exprimiert. Spender 2 exprimierte das Gensegment sowohl in den ersten beiden Wochen (>100) als auch in den Wochen 3 und 4 (<100). Die Expression des Segments 14DV4 bei Spender 3 fand in den Wochen 2 (nicht-Peptid-gepulst), 3 und 4 (gepulst und nicht-gepulst) statt. Bei Spender 4 kam es in der 1. und 3. Woche (gepulste und nicht-gepulste Zellen) zur Expression des Segments 14DV4. Das Segment 29DV5 wurde von den Spendern 1 und Spender 3 jeweils in der 3. Woche und von Spender 4 in der 1. Woche exprimiert (Peptid-exponierte und nicht-Peptid-exponierte Zellen). Darüber hinaus wurde es auch von Spender 2 in den Wochen 1 (Peptid-gepulst) und 4 (nicht-Peptid-gepulst) exprimiert. Weitere Expressionen (<100) des Gensegmentes 29DV5 waren bei Spender 2 in Woche 2 (nicht-Peptid-exponiert) sowie Spender 3 in Woche 1 (Peptid-exponiert) zu verzeichnen.

Weitere häufig exprimierte α -Gensegmente waren das Segment 5 und 8-1 mit einer Häufigkeit von 7-mal sowie das Segment 8-4 mit einer Häufigkeit von 6-mal im gesamten Zellkulturverlauf. Das Gensegment 5 wurde von Spender 1 in Woche 2 (Peptid-exponiert und nicht-Peptid-exponiert) sowie in Woche 4 (nicht-Peptid-gepulst), von Spender 2 in Woche 1 (gepulst und nicht-gepulst) wie auch in Woche 4 (Peptid-exponiert), von Spender 3 in den ersten beiden Wochen (Peptid-gepulst) und von Spender 4 in der 1. Woche (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) exprimiert. Das α -Gensegment 8-1 wurde von Spender 1 in der 4. Woche (Peptid-exponiert), von Spender 2 in der 1. Woche (Peptid-exponiert und nicht-exponiert), von Spender 3 in Woche 2 (Peptid-exponiert), Woche 3 (nicht-Peptid-exponiert) sowie Woche 4 (Peptid-gepulst und nicht-Peptid-gepulst), ferner von Spender 4 in Woche 3 (nicht-Peptid-exponiert) und Woche 4 (gepulst und nicht-gepulst) exprimiert. Weitere Expressionen (<100) des Gensegments 8-1 fanden bei Spender 1 in den Wochen 1 und 3 (nicht-Peptid-gepulst), bei Spender 2 in den Wochen 3 (Peptid-gepulst) und 4 (Peptid-gepulst und nicht-Peptid-gepulst), bei Spender 3 in den Wochen 1, 3 (Peptid-gepulst) sowie 1 und 2 (nicht-Peptid-gepulst) und bei Spender 4 in den Wochen 1 (Peptid-exponiert und nicht-Peptid-exponiert) und 3 (Peptid-gepulst) statt.

Die α -Gensegmente 8-4, 9-2, 17 und 24 wurden im Zellkulturverlauf jeweils 5-mal exprimiert. Das α -Gensegment 8-4 wurde von Spender 1 in Woche 4 (Peptid-gepulst), von Spender 3 sowie Spender 4 jeweils in Woche 3 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert) und zusätzlich von Spender 4 in Woche 1 (nicht-Peptid-gepulst) exprimiert. Weitere Expressionen (<100) für Gensegment 8-4 zeigten sich bei Spender 1 in Woche 1 (Peptid-gepulst) sowie in Woche 4 (nicht-Peptid-gepulst), bei Spender 2 in Woche 3 (Peptid-gepulst) und bei Spender 3 in Woche 2 (nicht-Peptid-gepulst). Das Segment 9-2 wurde von Spender 2 in Woche 4 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert), von Spender 3 in Woche 2 (Peptid-exponiert) sowie in Woche 3 (nicht-gepulst), zudem von Spender 4 in Woche 1 (nicht-Peptid-exponiert) exprimiert. Weitere Expressionen (<100) des Gensegments 9-2 waren für Spender 1 in den Wochen 1 und 3 (Peptid-exponiert) sowie in den Wochen 2 (nicht-Peptid-exponiert) und 4 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), für Spender 2 in Woche 2 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert), Spender 3 in Woche 1 (gepulst und nicht-gepulst) und Woche 3 (gepulst) sowie Spender 4 in Woche 1 (gepulst) zu verzeichnen. Das α -Gensegment 17 wurde von Spender 4 in Woche 1 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert) sowie Woche 3 (Peptid-gepulst), von Spender 3 in den Wochen 3 und 4 (nicht-exponiert), überdies von Spender 1 in den Wochen 1, 3 (Peptid-exponiert) und 2 (nicht-exponiert) exprimiert. Zudem kam es zu weiteren Expressionen (<100) bei Spender 1 in Woche 1, 4 (nicht-Peptid-exponiert) und 2 (Peptid-exponiert), bei Spender 2 in Woche 2 (gepulst und nicht-gepulst), bei Spender 3 in Woche 4 (gepulst), außerdem bei Spender 4 in Woche 3 (nicht-gepulst). Das Segment 24 wurde von Spender 1 in den Wochen 1 und 4 (Peptid-exponiert), von Spender 2 in Woche 1 (Peptid-gepulst), von Spender 3 in Woche 1 (nicht-exponiert) sowie in Woche 3 (Peptid-gepulst), darüber hinaus von Spender 4 in Woche 4 (Peptid-gepulst) exprimiert. Weitere Expressionen (<100) wurden bei Spender 1 (Peptid-exponiert), Spender 2 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert) und Spender 3 (nicht-gepulst) jeweils in Woche 2, zudem in Woche 1 bei Spender 1, Spender 2 (nicht-Peptid-exponiert) sowie Spender 4 (Peptid-exponiert) detektiert.

Die TRAV-Segmente 10, 20 und 26-2 wurden im Zellkulturverlauf jeweils 4-mal exprimiert. Das Segment 10 wurde von Spender 3 in Woche 3 (gepulst und nicht-gepulst) sowie von Spender 4 in Woche 1 (exponiert und nicht-exponiert) exprimiert. Auch Spender 1 und Spender 2 exprimierten das α -Gensegment 10 (<100), jedoch in unterschiedlichen Wochen. Das Segment 20 wurde von Spender 1 und Spender 4 in Woche 1 (Peptid-exponiert), von Spender 2 in Woche 4 sowie Spender 3 in Woche 3 (nicht-gepulst) exprimiert. Zudem zeigten sich weitere Expressionen (<100) bei Spender 1 in Woche 3 (Peptid-gepulst), bei Spender 3 in Woche 1 und 4 (nicht-Peptid-exponiert), außerdem bei Spender 4 in Woche 3 (nicht-Peptid-exponiert) sowie in Woche 4 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert). Das α -Gensegment 26-2 wurde von Spender 2 in Woche 4 (gepulst und nicht-gepulst), von Spender 3 in Woche 3 (nicht-Peptid-gepulst) sowie von Spender 4 in Woche 1 (Peptid-gepulst) exprimiert. Weitere Expressionen (<100) wurden bei Spender 4 in den Wochen 1 und 4 (nicht-gepulst) detektiert.

Die α -Gensegmente 1-1, 4, 6, 12-1, 13-1, 16, 21, 23DV6, 34, 36DV7, 38-1 (Spender 3 und/oder Spender 4), 2, 3, 26-1, 26-2, 35 (zusätzlich Spender 1 und/oder Spender 2), 25 und 27 (nur Spender 2) wurden bis zu 3-mal exprimiert. Die restlichen TRAV-Segmente wurden entweder gar nicht (α -Gensegmente 40, 41) exprimiert oder zeigten ausschließlich Signale mit Peaks <100 (α -Gensegmente 22, 30, 39) bzw. identische Muster (α -Gensegmente 19, 39) (Tab. 3-1).

TRBV-Segmente

TRBV-Gensegmente (Tab. 3-2) die häufig exprimiert wurden waren folgende: Das β -Gensegment 9, welches von allen Spendern (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) exprimiert wurde. Die Segmente 5-1/-3 und 14, welche von allen Spendern exprimiert wurden, wobei die Segmente 5-1/-3 von nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen des Spenders 1 und das Segment 14 von Peptid-gepulsten Zellen des Spenders 3 nicht exprimiert wurden.

Die Segmente 7-2/-8 und 29-1 wurden von den Spendern 1, 2 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert) und 3 (nicht-gepulst) exprimiert. Während die Segmente 7-2/-8 zusätzlich von Peptid-gepulsten Zellen des Spenders 4 exprimiert wurden, wurde das Segment 29-1 von nicht-Peptid-gepulsten Zellen des Spenders 4 exprimiert. Das Segment 24-1 wurde von den Spendern 1, 4 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), 2 (nicht-Peptid-exponiert) sowie Spender 3 (Peptid-exponiert) exprimiert.

Die Segmente 11-2, 18 und 21-1 wurden von Spender 1 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) und Spender 2 (Peptid-exponiert) exprimiert, wobei die Segmente 11-2 und 21-1 zusätzlich von Spender 2 (nicht-Peptid-exponiert) exprimiert wurden. Zudem wurde das Segment 11-2 von Spender 3 (Peptid-exponiert), das Segment 18 von Spender 4 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) und das Segment 21-1 von Spender 4 (nicht-gepulst) exprimiert.

Das Gensegment 27 wurde von den Spendern 1, 4 (nicht-Peptid-gepulst) und 3 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) exprimiert. Es zeigten sich keine weiteren Expressionen für dieses Gensegment.

Das β -Gensegment 9 wurde von Spender 1, Spender 2 sowie Spender 4 in Woche 1 (Peptid-gepulst), zudem von Spender 1 in Woche 4 (nicht-Peptid-gepulst), von Spender 2 in Woche 2 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert), von Spender 3 in Woche 3 (Peptid-gepulst) und in Woche 4 (nicht-gepulst), ferner von Spender 4 in den Wochen 2, 3 und 4 (nicht-Peptid-exponiert) exprimiert.

Die β -Gensegmente 5-1/-3 und 14 wurden jeweils 7-mal im Zellkulturverlauf exprimiert. Die β -Gensegmente 5-1/-3 wurden von den Spendern 1, 3 (Peptid-exponiert) und 2 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) jeweils in der 2. Woche exprimiert. Zudem wurden diese Gensegmente von Spender 3 in Woche 4 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) und Spender 4 in Woche 1 (Peptid-exponiert (>100) und nicht-exponiert (<100)), Woche 3 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert) sowie in Woche 4 (nicht-gepulst) exprimiert. Das Segment 14 wurde jeweils in der 2. Woche von nicht-Peptid-exponierten Zellen der Spender 1, Spender 3 und Spender 4, sowie Peptid-exponierten Zellen der Spender 2 (>100) und Spender 4 (<100) exprimiert. Zellen des Spenders 1 exprimierten es zudem in den Wochen 1 (nicht-Peptid-gepulst) und 4 (Peptid-gepulst). Auch nicht-exponierte Zellen des Spenders 2 exprimierten das Gensegment in Woche 1. Weiterhin exprimierten Zellen des Spenders 4 das Segment in den Wochen 3 (>100) (Peptid-exponiert) und 4 (<100) (Peptid-gepulst und nicht-gepulst).

Die Gensegmente 7-2/-8, 29-1 sowie 24-1 wurden mit einer Häufigkeit von je 6-mal exprimiert. Die Gensegmente 7-2/-8 wurden von Peptid-gepulsten Zellen des Spenders 1 in den Wochen 2, 3 und 4 sowie von nicht-Peptid-gepulsten Zellen in den Wochen 1 und 3 exprimiert. Sowohl Peptid-exponierte als auch nicht-exponierte Zellen des Spenders 2 exprimierten diese Segmente in Woche 2. Von Spender 3 wurden diese Segmente von Peptid-exponierten (<100) und nicht-Peptid-exponierten Zellen (>100) in Woche 3 exprimiert. Peptid-gepulste Zellen des Spenders 4 exprimierten die Segmente 7-2/-8 in den Wochen 1 (<100) und 2 (>100). Das β -Gensegment 24-1 wurde von Peptid-gepulsten Zellen des Spenders 1 in Woche 3 und nicht-gepulsten Zellen in Woche 1 exprimiert. Nicht-Peptid-gepulste Zellen des Spenders 2 exprimierten das Segment in Woche 2 und Peptid-gepulste Zellen des Spenders 3 in Woche 3. Außerdem wurde das Segment von Peptid-exponierten Zellen des Spenders 4 in Woche 2 (>100) und Woche 3 (<100), sowie von nicht-Peptid-exponierten Zellen in Woche 1, 2 und 3 (>100) exprimiert. Spender 1 und Spender 2 exprimierten das Segment 29-1 in den Wochen 1 (Peptid-gepulst und

nicht-gepulst) und 2 (nicht-gepulst), zudem exprimierte Spender 2 dieses Segment in Woche 3 (Peptid-exponiert). Nicht-gepulste Zellen des Spenders 3 in Woche 4 und des Spenders 4 in Woche 2 exprimierten das Gensegment 29-1.

Das Segment 11-2 wurde von Peptid-gepulsten Zellen des Spenders 1 in Woche 1, 3 und 4, sowie nicht-gepulsten Zellen in Woche 2 exprimiert. Peptid-gepulste Zellen von Spender 2 exprimierten das Segment in Woche 1 (<100) und in Woche 4, ferner nicht-Peptid-gepulste Zellen in Woche 1 (>100). Peptid-exponierte Zellen von Spender 3 exprimierten das Gensegment in Woche 1 (<100) und in Woche 2 (>100), sowie nicht-exponierte Zellen (<100) in Woche 1 und 3. Außerdem exprimierten Peptid-gepulste und nicht-gepulste Zellen (<100) von Spender 4 das Segment 11-2 in den Wochen 1 und 3. Das Segment 18 wurde von nicht-Peptid-gepulsten Zellen des Spenders 1 in den Wochen 1 (>100) und 2 (<100), sowie Peptid-gepulsten Zellen in Woche 3 (>100) exprimiert. Nicht-Peptid-exponierte Zellen (<100) des Spenders 2 exprimierten das Segment in den Wochen 1 und 2, wie auch Peptid-exponierte Zellen in Woche 2 (>100). Weiterhin wurde das Gensegment von Peptid-exponierten Zellen des Spenders 4 in den Wochen 2 (>100) und 3 (<100), sowie von nicht-exponierten Zellen in Woche 2 (>100) exprimiert. Das TRBV-Segment 21-1 wurde überwiegend von Spender 1 exprimiert, genauer in den Wochen 1, 2 und 3 von Peptid-gepulsten und nicht-gepulsten Zellen, sowie in Woche 4 ausschließlich von Peptid-gepulsten Zellen. Darüber hinaus exprimierten Zellen des Spenders 2 in Woche 1 (nicht-gepulst) und 2 (Peptid-exponiert und nicht-exponiert), sowie des Spenders 4 in Woche 1 (nicht-exponiert), 2 (Peptid-gepulst (<100) und nicht-gepulst) und 3 (<100) (nicht-gepulst) das Segment 21-1.

Das β -Gensegment 27 wurde von nicht-gepulsten Zellen des Spenders 1 in Woche 4, des Spenders 3 in Woche 1, sowie des Spenders 4 in den Wochen 1 und 2 exprimiert. Des Weiteren exprimierten Peptid-gepulste Zellen des Spenders 3 in Woche 3 das Gensegment.

Die β -Gensegmente 2, 4-1/-2/-3, 5-5/-6/-7/-8, 12-3/-4/-5, 13, 20-1, 25-1, 28, TRBV30 (überwiegend Spender 1 und/oder Spender 2) sowie 7-3/-5/-6/-9, 10-3, 15,

23-1, 30 (zusätzlich Spender 3 und/oder Spender 4) wurden bis zu 3-mal exprimiert. Die übrigen TRBV-Segmente wurden entweder gar nicht exprimiert (β -Gensegmente 6-5, 19) oder zeigten Signale mit Peaks <100 (β -Gensegmente 3-1/-2) (Tab. 3-2).

Tabelle 3-2 - Tabellarische Auflistung der TRBV-Segmente aller vier Spender (mit und ohne BZLF-1-Exposition), die im Zellkulturverlauf von 4 Wochen detektiert wurden. Spalten von links nach rechts: Spalte 1 = V β -Familien; Spalte 2 = TRBV-Gensegmente, Name des Gensegments nach Lage im Locus; Spalte 3-6 = Spender 1 bis Spender 4; Abk.: w = Woche; Der complexity score gibt die „TCR Komplexität“ an und wird durch Addition der Einzelpeaks jedes TRBV-Segments innerhalb einer Differenzierungswoche ermittelt.

V β -Familie	TRBV-Segment	Sp1				Sp2				Sp3				Sp4																			
		mit BZLF-1		ohne BZLF-1		mit BZLF-1		ohne BZLF-1		mit BZLF-1		ohne BZLF-1		mit BZLF-1		ohne BZLF-1																	
		w1	w2	w3	w4	w1	w2	w3	w4																								
1	9	9				12	2			9				8	9					5	8	6											
2	20-1					8				8				2						11		8											
3	28	4								6	6									3													
4	29-1	4				6	10			8	2								10		2												
5-1	5-1,3		9							4			2	5				10	8	2	2	3	2										
5-3	5-5,6,7,8									3				2																			
6-1	7-2,8		8	12	4	6		8			4			4				5		2	6												
6-2	7-3,5,6,9									6				5	3						6												
7	4-1,2,3													5																			
8	12-3,4,5			1		7		5			4				1																		
9	3-1,2																		2														
10	21-1	10	5	10	1	13	7	6			6			3	4					5		7	2	1									
11	25-1	4																															
12	10-3			4																													
13	6-5																																
14	27							4																									
15	24-1			3		7								6		3																	
16	14					6	7	2																									
17	18			2		10	2																										
18	30	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8	9	8	8	2	6			5				2									
19	19																																
20	23-1			14		13																											
22	13			6																													
23	2					2																											
24	15	4		6																													
	30																																
	11-2	8		8	5																												
	complexity score	43	22	66	18	70	25	27	7	15	30	1	3	41	40	0	0	0	11	22	8	3	2	4	28	17	25	5	0	21	26	13	11

x Anzahl der Peaks
 Peak-Höhe >100
 identische Expressionsmuster (innerhalb der gleichen Familie und Woche eines Spenders)
 Peak-Höhe <100

3.2.2 Complexity scores der V α -Familie und der V β -Familie über die Zeit der Kultivierung von 4 Wochen

Jeder TCR exprimiert eine α - und eine β -Kette. Die Diversität eines T-Zell-Pools ergibt sich durch die Analyse entweder des V α - oder des V β -Ketten-Repertoires. Sie wird mit einem sogenannten complexity score angegeben. Diese Komplexität der V α - und V β -Ketten wurde bestimmt, indem die Anzahl der exprimierten V α - und V β -Ketten addiert und je nach Anzahl der eindeutig identifizierbaren Peaks von 0-11 klassifiziert wurden. Ein Score von 11 beschreibt die Expression einer V α - und V β -Familie deren Expressionsmuster der CDR3-Region 11 Peaks zeigt und diese typischerweise in einer Gauß'schen Verteilung. Da wir in unseren Ergebnissen auch mehr als 11 Peaks pro V α - bzw. V β -Familie hatten, wurden diese auch gezählt. Obwohl hinter jedem Peak bis zu 2000 unterschiedliche CDR3-Regionen liegen können, wurde jedem gezählten Peak jeweils der Wert 1 gegeben. Wenn sich kein Peak zeigte, wurde der Wert 0 vergeben.¹⁴³ Dabei liegt der maximale score für die 34 V α -Familien bei 374 und für die 27 V β -Familien bei 297. Die von uns vorgenommene Analyse sah vor die Expression eines Signals als gegeben zu werten ab einer definierten Expressionshöhe, die hier größer als 100 war. Die Beurteilung der Form der Peaks ging in die Bewertung auch mit ein.

Der complexity score im Zellkultur-Verlauf

Wir haben für jeden Spender die Entwicklung der complexity scores im Verlauf der 4-wöchigen Zellkulturen in Diagrammen dargestellt. Die Zu- bzw. Abnahme von über 10 complexity-score-Punkten im Zellkulturverlauf wurde als deutliche Zunahme bzw. deutliche Regression bezeichnet. Die complexity scores der Zellkulturen eines jeden Spenders zeigten unterschiedliche, individuelle Verläufe.

Spender 1

Die complexity scores der TRAV- und TRBV-Gensegmente Peptid-gepulster Zellen und die TRBV-Gensegmente nicht-stimulierter Zellen des Spenders 1 zeigten einen regressiven Verlauf. Während die complexity scores für TRAV- und TRBV-Gensegmente von nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen von der 1. auf die 2. bzw. von der 2. auf die 3. Woche leicht zunahmen, zeigten die TRBV-Gensegmente der Peptid-gepulsten Zellkulturen von der 2. auf die 3. Woche einen deutlichen Anstieg des complexity scores. Die TRAV-Gensegmente der nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen, zeigten eine geringfügige Zunahme des complexity scores von der 3. auf die 4. Woche. Für die TRBV-Gensegmente Peptid-gepulster und nicht-Peptid-gepulster Zellkulturen konnte eine deutliche und für die TRAV-Gensegmente Peptid-gepulster Zellkulturen eine geringfügige Abnahme des complexity scores von der 3. auf die 4. Woche beobachtet werden (Abb. 3-13).

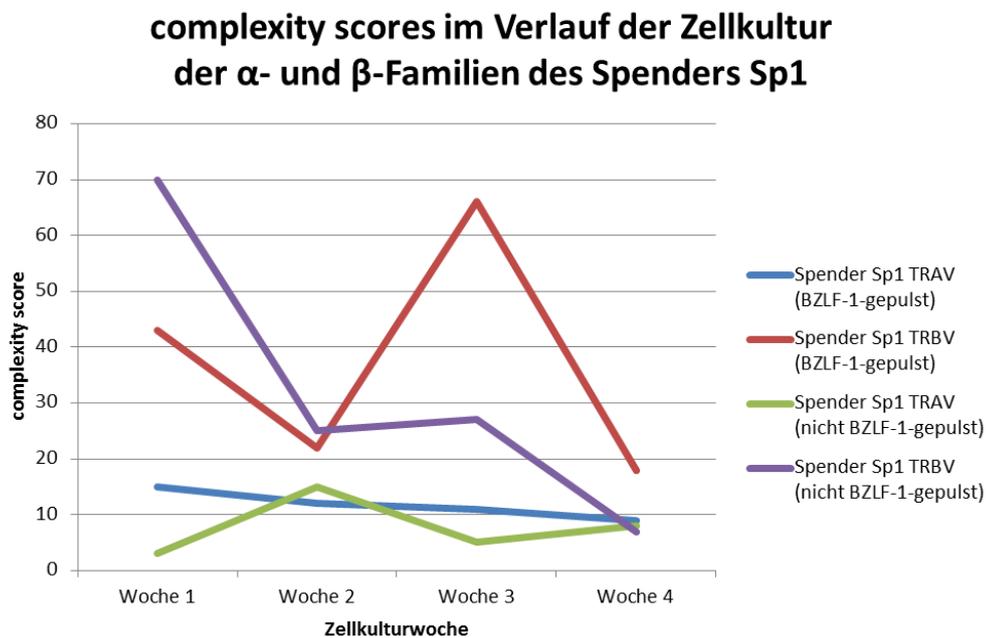


Abbildung 3-11 - Aufgetragen ist der complexity score gegen die Zellkulturwoche. HLA-B35⁺ Spender 1 mit jeweils allen TRAV- bzw. TRBV-Gensegmenten, sowohl BZLF-1-gepulst als auch nicht-BZLF-1-gepulst.

Spender 2

Auch im Falle von Spender 2 zeigte sich ein regressiver Gesamtverlauf des complexity scores. Bis zur 3. Woche kam es zu einer deutlichen Regression des complexity scores für TRAV- und TRBV-Gensegmente, wobei die Peptid-gepulsten Zellkulturen der TRBV-Segmente zunächst im Verlauf von Woche 1 bis Woche 2 einen deutlichen Anstieg des complexity scores zeigten. Außer den letzteren genannten, für welche sich ein complexity score von 1 in der 3. Woche ergab, waren in der 3. Woche die complexity scores der TRAV- und TRBV-Gensegmente aller anderen Zellkulturen bei 0. Im Verlauf von Woche 3 bis Woche 4 zeigten die TRAV- und TRBV-Gensegmente von Peptid-gepulsten Zellkulturen eine geringfügige und die TRAV-Gensegmente von nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen eine deutliche Zunahme des complexity scores. TRBV-Gensegmente von nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen zeigten von der 3. auf die 4. Differenzierungswoche keine Zunahme des complexity scores (Abb. 3-14).

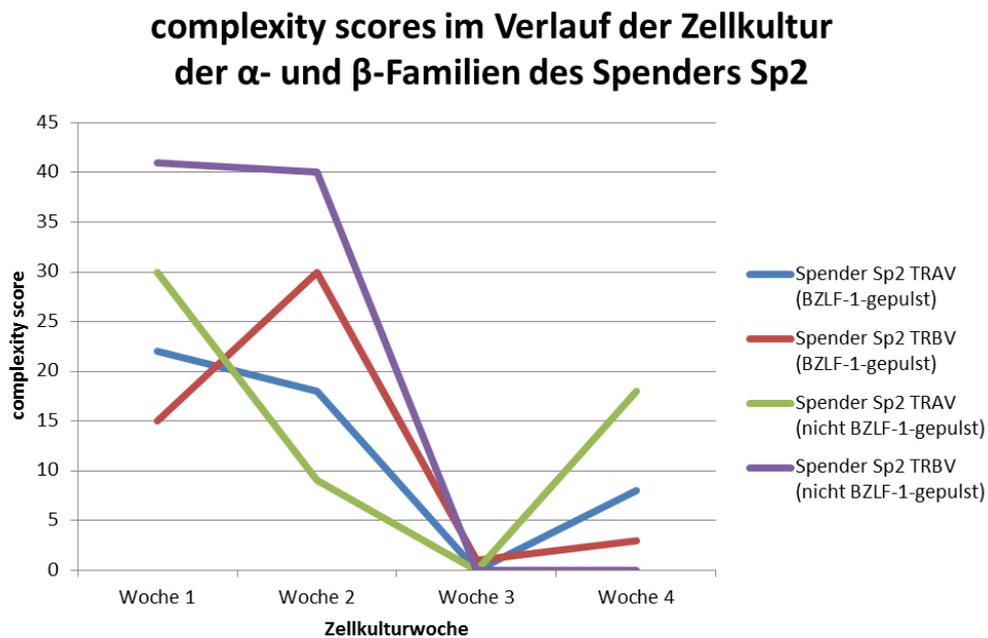


Abbildung 3-12 - Aufgetragen ist der complexity score gegen die Zellkulturwoche. HLA-B35⁺ Spender 2 mit jeweils allen TRAV- bzw. TRBV-Gensegmenten, sowohl BZLF-1-gepulst als auch nicht-BZLF-1-gepulst.

Spender 3

Im Gesamtverlauf war für Peptid-gepulste und nicht-Peptid-gepulste Zellen des Spenders 3 eine Zunahme der complexity scores sowohl für TRAV- als auch TRBV-Gensegmente zu beobachten. Die TRAV- und TRBV-Gensegmente von nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen zeigten bis zur 2. Woche eine geringfügige Regression des complexity scores. In der 3. Woche hatten die TRAV-Gensegmente aller Zellkulturen und die TRBV-Gensegmente von Peptid-gepulsten Zellkulturen ihr Maximum, wobei die TRAV-Gensegmente der nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen von Woche 2 auf 3 den steilsten Anstieg und die TRBV-Gensegmente der nicht-gepulsten Zellkulturen den flachsten Anstieg zeigten. Von der 3. zur 4. Differenzierungswoche hin zeigten alle Gensegmente außer die TRBV-Gensegmente von nicht-Peptid-gepulsten Zellkulturen, bei denen ein deutlicher Anstieg des complexity scores zu beobachten war, jeweils eine deutliche Regression des complexity scores (Abb. 3-15).

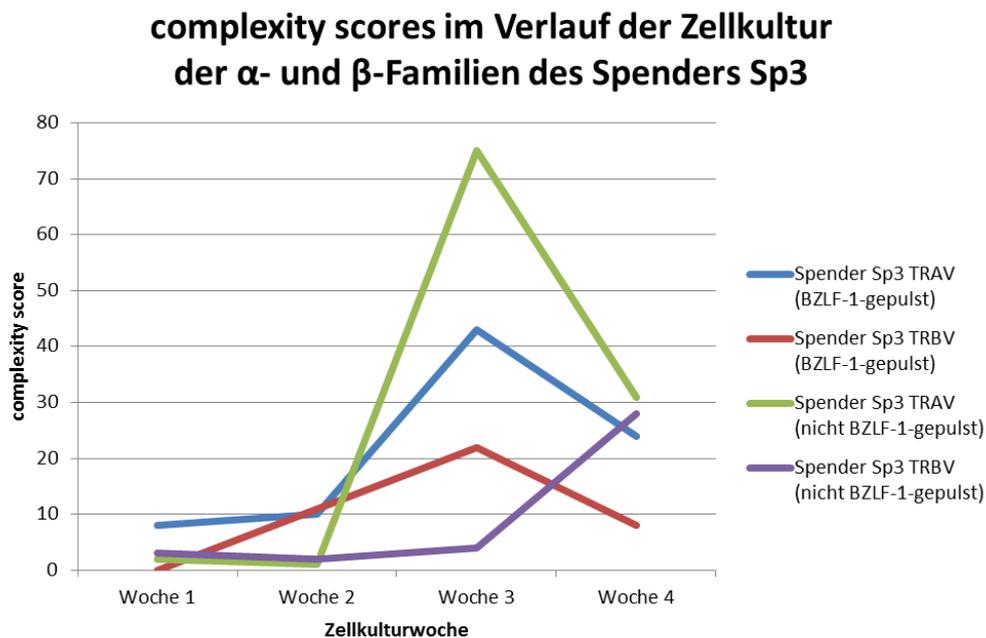


Abbildung 3-13 - Aufgetragen ist der complexity score gegen die Zellkulturwoche. HLA-B35⁺ Spender 3 mit jeweils allen TRAV- bzw. TRBV-Gensegmenten, sowohl BZLF-1-gepulst als auch nicht-BZLF-1-gepulst.

Spender 4

Die complexity scores des Spenders 4 zeigten sich regressiv im Gesamtverlauf, wobei für alle Gensegmente eine deutliche Regression von der 1. bis zur 4. Woche zu beobachten war. Die complexity scores der TRAV-Gensegmente zeigten eine deutliche Abnahme von Woche 1 auf Woche 2 (complexity score = 0), wohingegen die der TRBV-Gensegmente im Vergleich zu ihrem Ausgangswert geringfügig zunahmen. Umgekehrt verhielt sich der Verlauf von Woche 2 auf Woche 3. Hier kam es nämlich zur deutlichen Zunahme der complexity scores der TRAV-Gensegmente, während es zur deutlichen Regression dieser bei den TRBV-Gensegmenten kam. Im Verlauf von der 3. zur 4. Woche hin nahmen die complexity scores der TRBV-Gensegmente aller Zellkulturen geringfügig und die der TRAV-Gensegmente von gepulsten Zellkulturen deutlich ab. Der complexity score der TRAV-Gensegmente von nicht-gepulsten Zellkulturen verblieb auf 16 (Abb. 3-16).

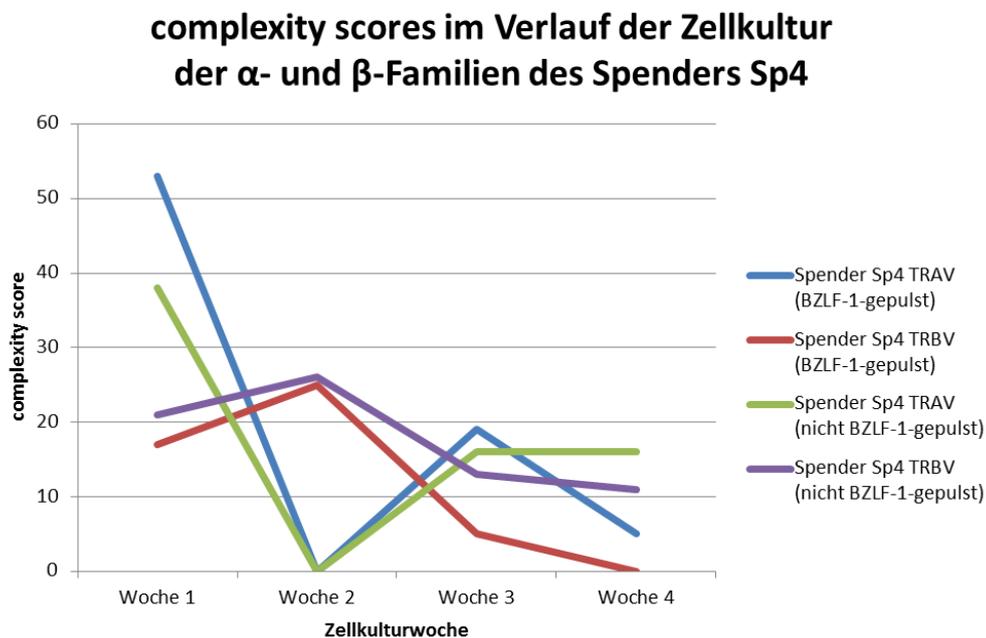


Abbildung 3-14 - Aufgetragen ist der complexity score gegen die Zellkulturwoche. HLA-B35⁺ Spender 4 mit jeweils allen TRAV- bzw. TRBV-Gensegmenten, sowohl BZLF-1-gepulst als auch nicht-BZLF-1-gepulst.

Wir konnten beobachten, dass die complexity scores im Zellkulturverlauf spenderabhängig unterschiedlich waren. Von Spender 1 zeigten Peptid-gepulste Kulturen abnehmende complexity scores sowohl für TRAV- und TRBV-Gensegmente als auch für die nicht-gepulsten TRBV-Gensegmente von Spender 1, wohingegen die Expression von TRAV-Gensegmenten bei nicht-gepulsten Kulturen im Gesamtverlauf zunehmend waren. Die complexity scores von Spender 2 und Spender 4 waren gleichsinnig für TRAV- und TRBV-Segmente und im 4-wöchigen Zellkulturverlauf regressiv. Dagegen zeigten die complexity scores von Spender 3 eine Zunahme im Gesamtverlauf und zwar sowohl für TRAV- als auch für TRBV-Segmente. Ungeachtet ob gepulst oder nicht-gepulst waren die Expression von TRAV- und TRBV-Segmenten syngen.

α -/ β -Ketten-Ratio

Um eine Aussage über die Zusammensetzung der TCRs machen zu können, haben wir die complexity scores beider Ketten angesehen. Die Paarung einer α - und einer β -Kette ist nicht ganz stochastisch, denn es gibt Paarungspräferenzen, jedoch besteht ein $\alpha\beta$ TCR immer aus einer α - und einer β -Kette, ist also ein Heterodimer.

Wir verglichen die complexity scores der α - und β -Ketten jeweils für gepulste und nicht-gepulste Zellkulturen und zeigen dies separat für jeden der vier Spender. Mit Hilfe dieser wurde das α -/ β -Ketten-Ratio ermittelt, da es Aussagen zulässt über mögliche präferierte TCR-Kompositionen. Ein α -/ β -Ratio von 1 bedeutet, dass diverse α - und β -Ketten exprimiert werden und somit keine der beiden Ketten zahlenmäßig überwiegt, also nicht komplexer exprimiert ist als die andere. Ein α -/ β -Ratio von über 1 belegt, dass mehr Diversität in den α -Ketten besteht im Vergleich zu den β -Ketten, was auf eine evtl. präferierte Paarung einer bestimmten β -Kette mit diversen α -Ketten deutet. Ein α -/ β -Ratio von unter 1 bedeutet, dass mehr Diversität in den β -Ketten besteht im Vergleich zu den α -Ketten, d.h. evtl. eine präferierte Paarung einer bestimmten α -Kette mit diversen β -Ketten stattfindet.

Für jeden Spender zeigte sich in der 4. Zellkulturwoche ein α/β -Ketten-Ratio über 1, was für eine präferentielle Paarung einer bestimmten α -Kette mit mehreren β -Ketten spricht. Dies wurde für nicht-gepulste Zellen der Spender 1, Spender 3 und Spender 4, sowie für gepulste Zellen der Spender 2 und Spender 3 beobachtet. Außerdem zeigten auch die Spender 2 in der 1. Woche für gepulste Zellen, Spender 3 in der 3. Woche und Spender 4 in der 1. und 3. Woche sowohl für gepulste als auch für nicht-gepulste Zellen eine Ratio über 1. Ein α/β -Ketten-Ratio unter 1 konnte für alle Spender nachgewiesen werden. Dabei zeigte Spender 1 in den Wochen 1 bis 3 für gepulste und nicht-gepulste Zellen sowie in Woche 4 für gepulste Zellen ein Ratio unter 1. Spender 2 und Spender 3 zeigten ein Ratio unter 1 in der 1. Woche für nicht-gepulste Zellen sowie in der 2. Woche für gepulste und nicht-gepulste Zellen. Für Spender 4 zeigte sich in keiner Woche ein α/β -Ketten-Ratio unter 1. Da die complexity scores von manchen $V\alpha$ - und/oder $V\beta$ -Ketten 0 betrug, konnte in diesen Fällen kein α/β -Ketten-Ratio bestimmt werden. Dies war der Fall für Ergebnisse der Spender 2 in Woche 3 und Spender 4 in Woche 2 für gepulste und nicht-gepulste Zellen, sowie für Spender 2 in Woche 4 für nicht-gepulste Zellen und für Spender 3 in Woche 1 sowie Spender 4 in Woche 4 für gepulste Zellen (Tab. 3-3).

Tabelle 3-3 – Tabellarische Darstellung der α -/ β -Ketten-Verhältnisse mit Hilfe von complexity scores. Spalten von links nach rechts: Spalte 1 = Spender; Spalte 2 = Zellkulturwoche; Spalte 3 = BZLF-1-Exposition; Spalte 4 = complexity scores der $V\alpha$ -Familien; Spalte 5 = complexity scores der $V\beta$ -Familien; Spalte 6 = α -/ β -Ketten-Ratio;

Spender	Woche	BZLF-1	$V\alpha$	$V\beta$	Ratio
Sp1	1	+	15	43	0,35
		-	3	70	0,04
	2	+	12	22	0,55
		-	15	25	0,6
	3	+	11	66	0,17
		-	5	27	0,19
	4	+	9	18	0,5
		-	8	7	1,14
Sp2	1	+	22	15	1,47
		-	30	41	0,73
	2	+	18	30	0,6
		-	9	40	0,23
	3	+	0	1	0
		-	0	0	0
	4	+	8	3	2,7
		-	18	0	0
Sp3	1	+	8	0	0
		-	2	3	0,7
	2	+	10	11	0,91
		-	1	2	0,5
	3	+	43	22	1,95
		-	75	4	18,75
	4	+	24	8	3
		-	31	28	1,11
Sp4	1	+	53	17	3,12
		-	38	21	1,81
	2	+	0	25	0
		-	0	26	0
	3	+	19	5	3,8
		-	16	13	1,23
	4	+	5	0	0
		-	16	11	1,45

3.2.3 TRAV- und TRBV-Expression

Die wöchentlich gesammelten RNA-Proben wurden aus den Zellkulturen (mit und ohne BZLF-1-Exposition) aller Spender im Zellkulturverlauf gewonnen und zur Durchführung von Spectratypings verwendet. Für die V α - und V β -Familien wurden jeweils unterschiedliche PCR-Verfahren angewendet (siehe 2.2.9). Zur Durchführung der Analyse wurde die Software „3130xl Genetic Analyzer Data Collection Version 3.0“ benutzt. Die Auswertung erfolgte mit der Software „GeneMapper® v4.0“. Anschließend wurden die Peaks der einzelnen V α - bzw. V β -Familien miteinander verglichen und gezählt, sowie die Entwicklung der Expressionsmuster im Zellkulturverlauf beurteilt.

Um Verunreinigungen als mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wurden die PCRs mit fast-identischen bzw. sich in hohem Grade ähnelnden Spectratype-Mustern wiederholt. Dies waren u.a. die Proben der Spender 1 und Spender 2 in den Wochen 3 und 4, der Spender 3 in den Wochen 1 und 2 und Spender 4 in Woche 1 (V α), außerdem die Proben der Spender 1 und Spender 2 jeweils in Woche 3 (V β).

Die Expression einer TCR variablen Region im Spectratype wurde nach folgenden Kriterien bewertet: a) die Form der Peaks (Breite der Schulter/Höhe), b) die Peakhöhe, und c) die Diversität, die direkt mit der Klonalität korreliert (Poly-, Oligo, bzw. Monoklonalität). Als deutliche Expressionen wurden Peaks ab einer Höhe von 100 gewertet.

V α -Familie*Spender 1*

Deutliche Expressionen zeigte Spender 1 in der 1. Woche für die V α -Familien 15, 18, 30 und 32 (BZLF-1-exponiert) sowie 15 und 32 (nicht BZLF-1-exponiert), in der 2. Woche für V α 1B, 15, 30 und 32 (Peptid-gepulst und nicht-Peptid-gepulst), in der 3. Woche für V α 6 und 25 (Peptid-exponiert), außerdem in der 4. Woche für V α 1A, 6 und 16 (mit BZLF-1-Exposition) sowie 6 und 15 (ohne BZLF-1-Exposition).

Monoklonale Expressionsmuster zeigten die V α -Familien V α 18, V α 30 (Peptid-gepulst) und V α 32 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) in der 1. Woche, V α 15 (Peptid-gepulst) in der 2. Woche, V α 6 und V α 25 (Peptid-gepulst) in der 3. Woche sowie V α 1A, V α 6, V α 15, V α 16 und V α 18 (Peptid-gepulst) in der 4. Differenzierungswoche.

Oligoklonale Expressionsmuster waren für die V α -Familien V α 1A, V α 3, V α 6 (Peptid-gepulst) und V α 15 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) in der 1. Woche, für V α 1B, V α 6, V α 32 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), V α 3 und V α 15 (nicht-Peptid-gepulst) in der 2. Woche, V α 3 (Peptid-gepulst) in der 3. Woche sowie V α 6 (nicht-Peptid-gepulst) in der 4. Woche zu verzeichnen.

Polyklonale Expressionsmuster zeigten die V α -Familien V α 30 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) in der 2. Woche sowie V α 15 (nicht-Peptid-gepulst) in der 4. Woche. Dabei war für V α 6 (Peptid-gepulst) in der 1. Woche ein Gauß'sches Verteilungsmuster zu verzeichnen (Abb. 3-17).

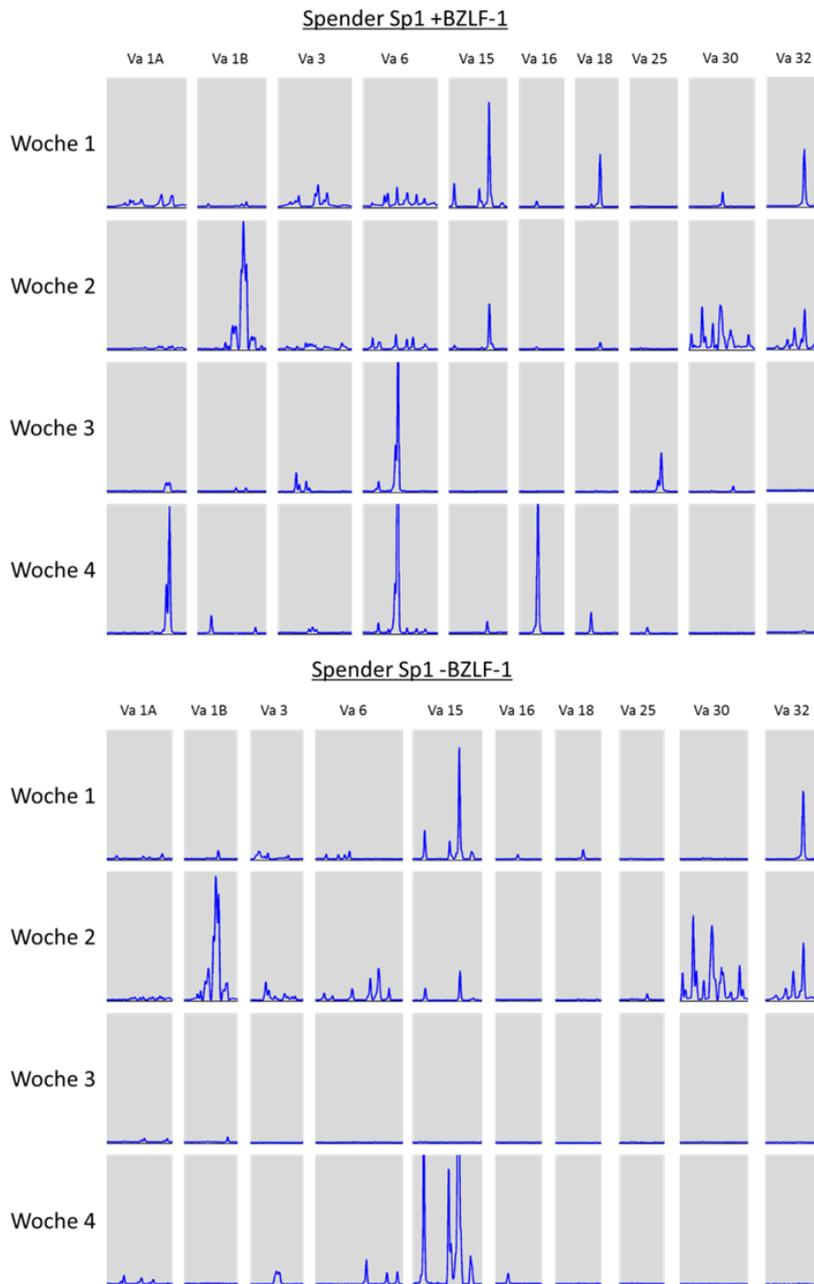


Abbildung 3-15 – Expressionsmuster der Va-Familien Va1A, 1B, 3, 6, 15, 16, 18, 25, 30 und 32 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der $\alpha\beta^+$ T-Zellen des Spenders 1 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

Spender 2

Für die Zellkulturen des Spenders 2 zeigten sich in Woche 1 Expressionen der V α -Familien V α 6, V α 15, V α 32 (mit und ohne BZLF-1-Exposition) und V α 21 (mit BZLF-1-Exposition), in Woche 2 für V α 4A, V α 6, V α 15, V α 30, V α 32 (BZLF-1-gepulst und nicht-gepulst) und V α 21 (nicht-Peptid-gepulst), in Woche 3 für V α 6 und V α 21 (mit und ohne BZLF-1-Exposition), sowie in Woche 4 für V α 4A, V α 26, V α 30 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), V α 15 (Peptid-gepulst) und V α 21 (nicht-gepulst). V α 4A zeigte in der 2. und 4. Woche jeweils oligoklonale Expressionsmuster (Peptid-gepulst und nicht-Peptid-gepulst). V α 6 zeigte in den Wochen 1 und 2 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) jeweils oligoklonale Muster, wobei die Peptid-gepulsten Zellkulturen des V α 6-Segments in der 1. Woche eine Gauß'sche Verteilung aufwiesen. In den folgenden Wochen waren es dagegen monoklonale Muster. V α 15 zeigte auch in den ersten beiden Woche oligoklonale Muster (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) und in der 4. Woche ein monoklonales Expressionsmuster (Peptid-gepulst). Für V α 21 zeigten sich oligoklonale Muster in der 1. (Peptid-gepulst) und 3. Woche (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), sowie monoklonale Muster in der 2. und 4. Woche (nicht-Peptid-gepulst). V α 26 zeigte in der 4. Woche oligoklonale Expressionsmuster (Peptid-gepulst und nicht-gepulst). V α 30 zeigte in der 2. Woche polyklonale Expressionsmuster und in der 4. Woche oligoklonale Muster (Peptid-gepulst und nicht-gepulst). Für V α 32 waren in der 1. Woche monoklonale Muster und in der 2. Woche oligoklonale Muster (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) zu verzeichnen (Abb. 3-18).

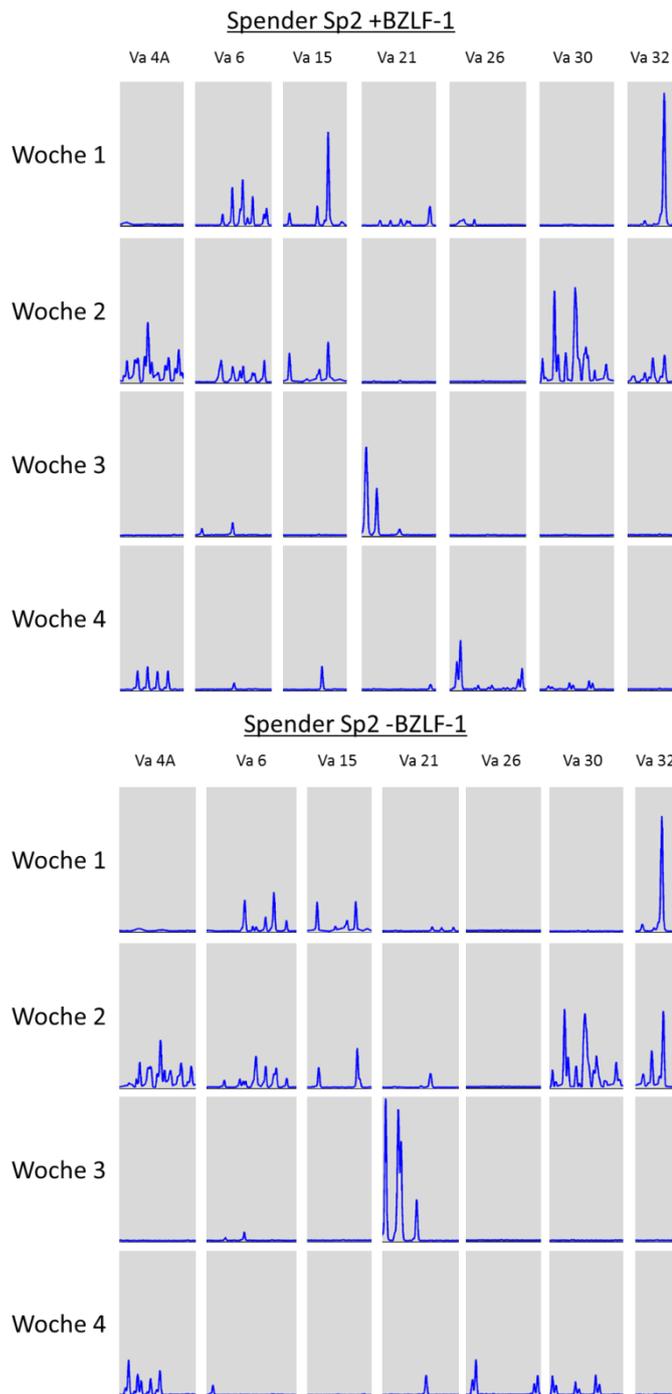


Abbildung 3-16 – Expressionsmuster der Va-Familien Va4A, 6, 15, 21, 26, 30 und 32 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der $\alpha\beta^+$ T-Zellen des Spenders 2 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

Spender 3

Bei Spender 3 fanden sich im Vergleich zu den anderen Spendern am häufigsten deutliche Expressionsmuster, und zwar in der 1. Woche für die $V\alpha$ -Familien $V\alpha 1B$, $V\alpha 4B$, $V\alpha 15$, $V\alpha 26$ (mit BZLF-1-Exposition), $V\alpha 1B$, und $V\alpha 26$ (ohne BZLF-1-Exposition), in der 2. Woche für die $V\alpha$ -Familien $V\alpha 4B$, $V\alpha 15$, $V\alpha 22$, $V\alpha 26$ (BZLF-1-exponiert) sowie $V\alpha 6$ und $V\alpha 26$ (nicht BZLF-1-exponiert), in der 3. Woche für die $V\alpha$ -Familien $V\alpha 1A$, $V\alpha 5$, $V\alpha 6$, $V\alpha 15$, (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), $V\alpha 23$, $V\alpha 28$ (Peptid-gepulst) sowie $V\alpha 1B$, $V\alpha 4A$, $V\alpha 14$, $V\alpha 22$ und $V\alpha 26$ (nicht-Peptid-gepulst) und in der 4. Woche für die $V\alpha$ -Familien $V\alpha 1A$, $V\alpha 1B$, $V\alpha 4B$, $V\alpha 5$, $V\alpha 6$, $V\alpha 15$, $V\alpha 22$ (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), $V\alpha 14$ (Peptid-gepulst) sowie $V\alpha 28$ (nicht-Peptid-gepulst).

Die $V\alpha$ -Familie $V\alpha 1A$ zeigte in den Wochen 3 und 4 monoklonale Expressionsmuster (Peptid-gepulst und nicht-gepulst). Peptid-gepulste Zellen von $V\alpha 1B$ zeigten in den Wochen 1 und 4 monoklonale Muster, nicht-Peptid-gepulste Zellen dagegen in den Wochen 3 und 4 oligoklonale Muster. Für die $V\alpha$ -Familie $V\alpha 4A$ zeigte sich in der 3. Woche ein polyklonales Muster (nicht-Peptid-gepulst), mit angedeuteter Gauß'scher Verteilung. Peptid-gepulste Zellen von $V\alpha 4B$ zeigten durchgehend monoklonale Muster, nicht-Peptid-gepulste Zellen in der 1. Woche ein monoklonales und in der 4. Woche ein oligoklonales Muster. Für $V\alpha 5$, $V\alpha 6$, $V\alpha 14$ und $V\alpha 15$ waren oligoklonale Muster in den Wochen 3 und 4 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) zu verzeichnen. $V\alpha 15$ zeigte außerdem in der Woche 1 ein oligoklonales und in Woche 2 ein monoklonales Muster (Peptid-gepulst). Für $V\alpha 22$ zeigten sich für die Wochen 3 und 4 oligoklonale Muster (nicht-Peptid-gepulst). Zudem zeigten sich oligoklonale Muster für $V\alpha 26$ in den Wochen 1, 2 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) und 3 (nicht-Peptid-gepulst) und $V\alpha 28$ in den Wochen 3 (Peptid-gepulst) und 4 (nicht-Peptid-gepulst) (Abb. 3-19).

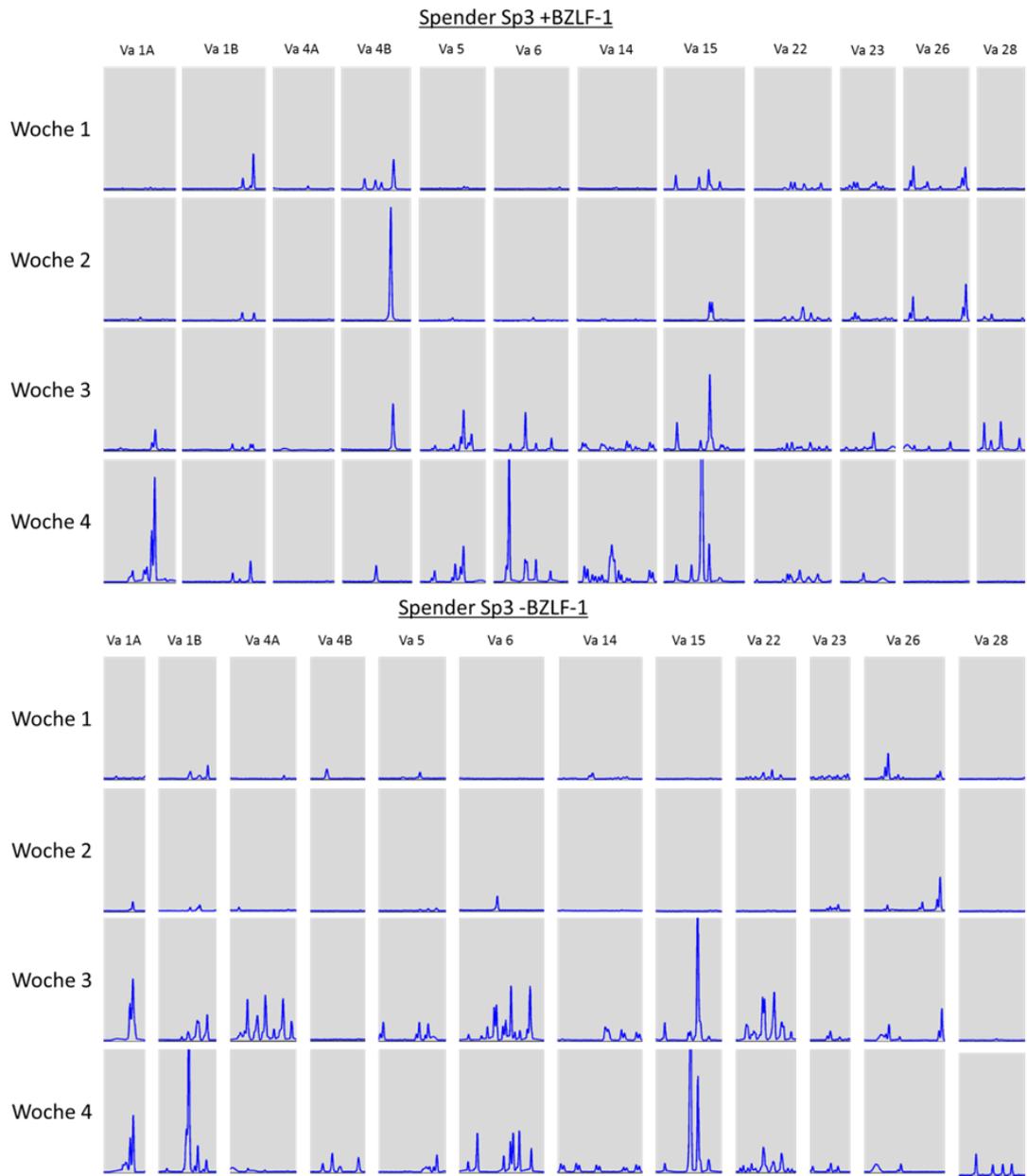


Abbildung 3-17 - Expressionsmuster der Va-Familien Va1A, 1B, 4A, 4B, 5, 6, 14, 15, 22, 23, 26 und 28 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der $\alpha\beta^+$ T-Zellen des Spenders 3 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

Spender 4

Die Spectratypes von Spender 4 zeigten in der 2. Woche keine Ergebnisse. Ursächlich sind womöglich zu geringe Template-Mengen. Aufgrund zu geringer Probenmengen (cDNA) konnten die Versuche nicht wiederholt werden. Für folgende V α -Familien zeigten sich deutliche Expressionen: In der 1. Woche für die V α -Familien V α 6, V α 9, V α 21, V α 24 (gepulst), V α 1A, V α 6, V α 9, V α 21, V α 22, V α 24 und V α 26 (nicht-gepulst), in der 3. Woche für V α 1A, V α 6 und V α 22 (gepulst), V α 1A, V α 1B, V α 6, V α 22 und V α 24 (nicht-gepulst) sowie in der 4. Woche für V α 1A, V α 1B, V α 6, V α 9, V α 21, V α 22, V α 24 (gepulst und nicht-gepulst), V α 26 (nicht-Peptid-gepulst) und V α 28 (Peptid-gepulst).

Im Zellkulturverlauf der Peptid-gepulsten Zellkulturen des Spenders 4 waren unterschiedliche Expressionsmuster für die verschiedenen V α -Familien zu verzeichnen. Die Peptid-gepulsten Zellen von V α 1A zeigten in den Wochen 3 und 4 jeweils monoklonale Expressionsmuster, während die nicht-gepulsten Zellen von V α 1A in den Wochen 1 und 4 monoklonale, in Woche 3 jedoch ein oligoklonales Expressionsmuster zeigten. Für V α 1B zeigte sich für die Peptid-gepulsten Zellen erst in der 4. Woche ein oligoklonales Muster, während die nicht-gepulsten Zellen bereits in der 3., aber auch in der 4. Woche oligoklonale Muster zeigten. Peptid-gepulste und nicht-gepulste Zellen von V α 6 zeigten in den Wochen 1, 3 und 4 Expressionen, wobei es für alle Peptid-gepulsten und für die nicht-gepulsten Zellen in den Wochen 1 und 4 oligoklonale Muster, und für die nicht-gepulsten Zellen in Woche 3 monoklonale Muster waren. V α 9 und V α 21 zeigten Expressionen in den Wochen 1 und 4. Dabei zeigten sich für V α 9 in Woche 1 für Peptid-gepulste und nicht-gepulste Zellen monoklonale Muster und in Woche 4 Gauß'sche Muster, sowie für V α 21 in Woche 1 für Peptid-gepulste und nicht-gepulste Zellen monoklonale Muster und in Woche 4 oligoklonale Muster. Für V α 22 und V α 24 waren Expressionen in den Wochen 1, 3 und 4 zu verzeichnen. Dabei zeigte sich für Peptid-gepulste Zellen von V α 22 in den Wochen 3 und 4, sowie für nicht-gepulste Zellen von V α 22 in den Wochen 1, 3 und 4 oligoklonale Expressionsmuster. Auch für Peptid-gepulste und

nicht-gepulste Zellen von V α 24 zeigten sich in den Wochen 1 und 4 oligoklonale Muster, sowie nur für nicht-gepulste Zellen in Woche 3 ein monoklonales Muster. Für V α 26 zeigten nicht-gepulste Zellen in der Wochen 1 oligoklonale und in der Woche 4 ein monoklonales Muster. Peptid-gepulste Zellen von V α 28 zeigten nur in Woche 4 ein deutliches monoklonales Muster (Abb. 3-20).

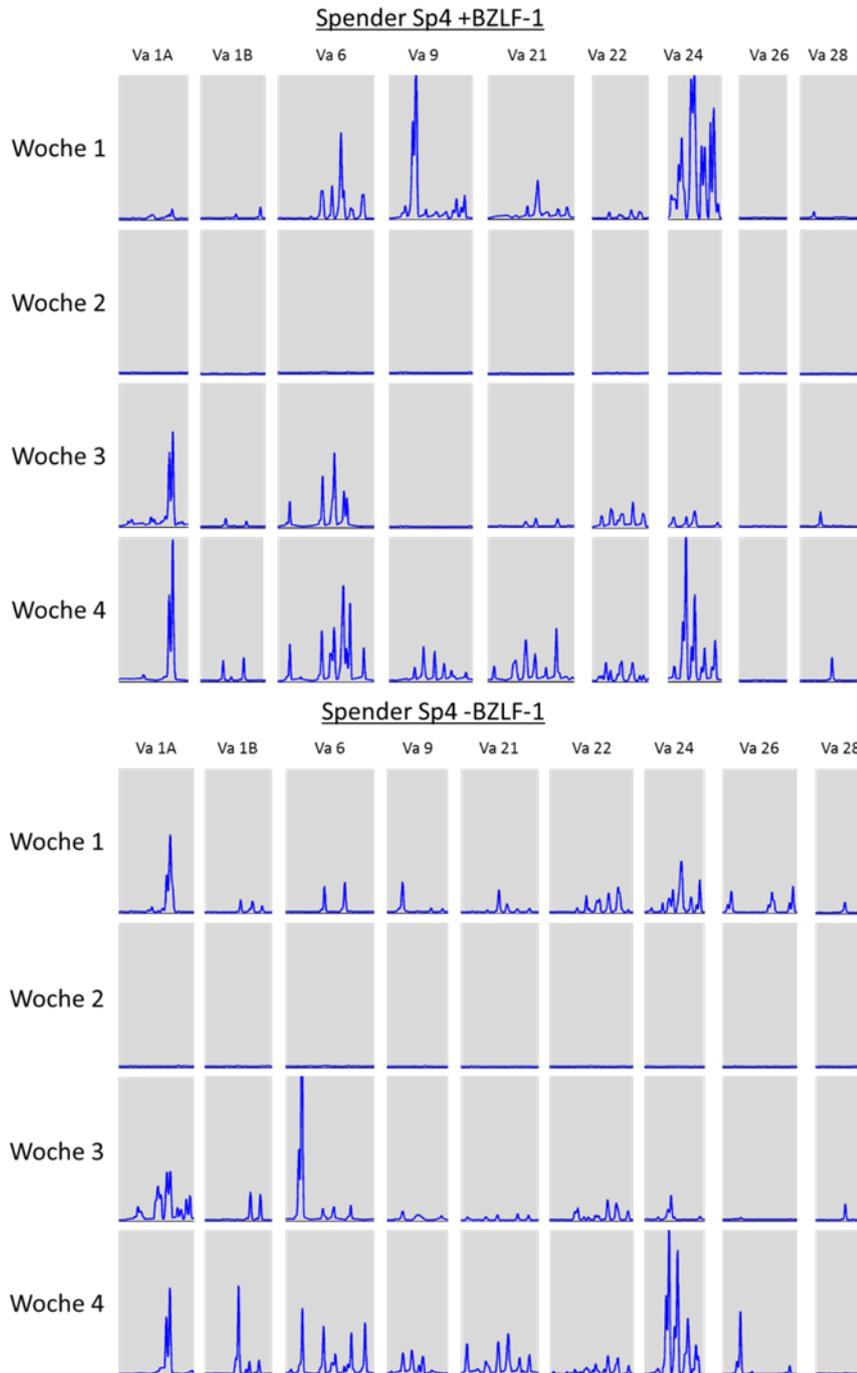


Abbildung 3-18 - Expressionsmuster der Va-Familien Va1A, 1B, 6, 9, 21, 22, 24, 26 und 28 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der $\alpha\beta^+$ T-Zellen des Spenders 4 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

V β -Familie

Für die Zellkulturwochen mit geringer Anzahl an Expressionen führten wir jeweils eine Konsensus-PCR. Mit Hilfe dieser Konsensus-PCR konnten wir nachweisen, dass trotz der geringen Spectratype-Ausbeute V β -Familien vorhanden sein müssen. Analysiert wurden Spender 1 Woche 4 (Peptid-gepulst), Spender 2 Woche 4 (Peptid-gepulst und nicht-Peptid-gepulst), Spender 3 Woche 2 (Peptid-gepulst) und Woche 4 (Peptid-gepulst und nicht-Peptid-gepulst), sowie Spender 4 Woche 3 (nicht-Peptid-gepulst) und Woche 4 (Peptid-gepulst und nicht-Peptid-gepulst). Alle Proben waren V β -positiv.

Spender 1

Deutliche Expressionen waren in Zellkulturen des Spenders 1 zu beobachten: In der 1. Woche für V β 1, V β 3, V β 4, V β 10, TRBV11-2 (BZLF-1-inkubiert) sowie für V β 4, V β 6-1, V β 8, V β 10, V β 15, V β 16 und V β 20 (nicht BZLF-1-inkubiert), in der 2. Woche für V β 5-1, V β 6-1, V β 10 (BZLF-1-gepulst) ferner für V β 4, V β 10 und V β 16 (nicht BZLF-1-gepulst). In der 3. Woche zeigten sich deutliche Expressionen bei Spender 1 für V β 6-1, V β 8, V β 10, TRBV11-2, V β 12, V β 15, V β 20 (BZLF-1-exponiert), für V β 2, V β 6-1, V β 8 und V β 10 (nicht BZLF-1-exponiert) und in der 4. Woche für V β 6-1, V β 10, TRBV11-2 (mit BZLF-1-Behandlung) sowie für V β 14 (ohne BZLF-1-Behandlung).

Da sich in der 4. Differenzierungswoche wenige Expressionen zeigten, führten wir u.a. für die V β -Proben aus dieser Woche eine Konsensus-PCR durch, wobei nicht genügend cDNA für die Durchführung einer Konsensus-PCR nicht-Peptid-gepulster Zellproben vorhanden war. Eine V β -Positivität konnte mit Hilfe der Konsensus-PCR für die Peptid-gepulsten Zellproben nachgewiesen werden.

Im Zellkulturverlauf zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster. Für V β 1, V β 3, V β 15 und V β 20 zeigten sich jeweils in der 1. Woche oligoklonale

Expressionsmuster. Diese kamen bei Peptid-gepulsten Zellen für die V β -Familien V β 1 und V β 3 und bei nicht-Peptid-gepulsten Zellen für V β 15 und V β 20 vor. Außerdem war für Peptid-gepulste Zellen von V β 15 ein monoklonales Muster zu verzeichnen. V β 2 zeigte lediglich in Woche 3 für nicht-Peptid-gepulste Zellen ein oligoklonales Expressionsmuster. V β 4 zeigte in Woche 1 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) und Woche 2 (nicht-gepulst) oligoklonale Muster. Peptid-gepulste Zellen von V β 5-1 und V β 6-1 zeigten jeweils in Woche 2 oligoklonale Muster. Peptid-gepulste Zellen von V β 6-1 zeigten in Woche 3 und 4 jeweils monoklonale Muster. Nicht-Peptid-gepulste Zellen von V β 6-1 und V β 8 zeigten in Woche 1 und 3 jeweils oligoklonale Muster. Dagegen zeigten Peptid-gepulste Zellen von V β 8 in Woche 3 ein monoklonales Muster. Für V β 10 zeigten sich in den Wochen 1 bis 4 (Peptid-gepulst) und in den Wochen 1 bis 3 (nicht-gepulst) oligoklonale Muster. Für TRBV11-2 zeigten sich in Woche 1 und 4 oligoklonale und in Woche 3 ein monoklonales Muster für Peptid-gepulste Zellen. Für V β 12 zeigte sich nur für Peptid-gepulste Zellen in Woche 3 ein monoklonales Muster. V β 14 zeigte ausschließlich in Woche 4 für nicht-Peptid-gepulste Zellen ein oligoklonales Muster. Nur nicht-Peptid-gepulste Zellen der V β -Familie V β 16 zeigten in Woche 1 ein oligoklonales und in Woche 2 ein monoklonales Muster (Abb. 3-21).

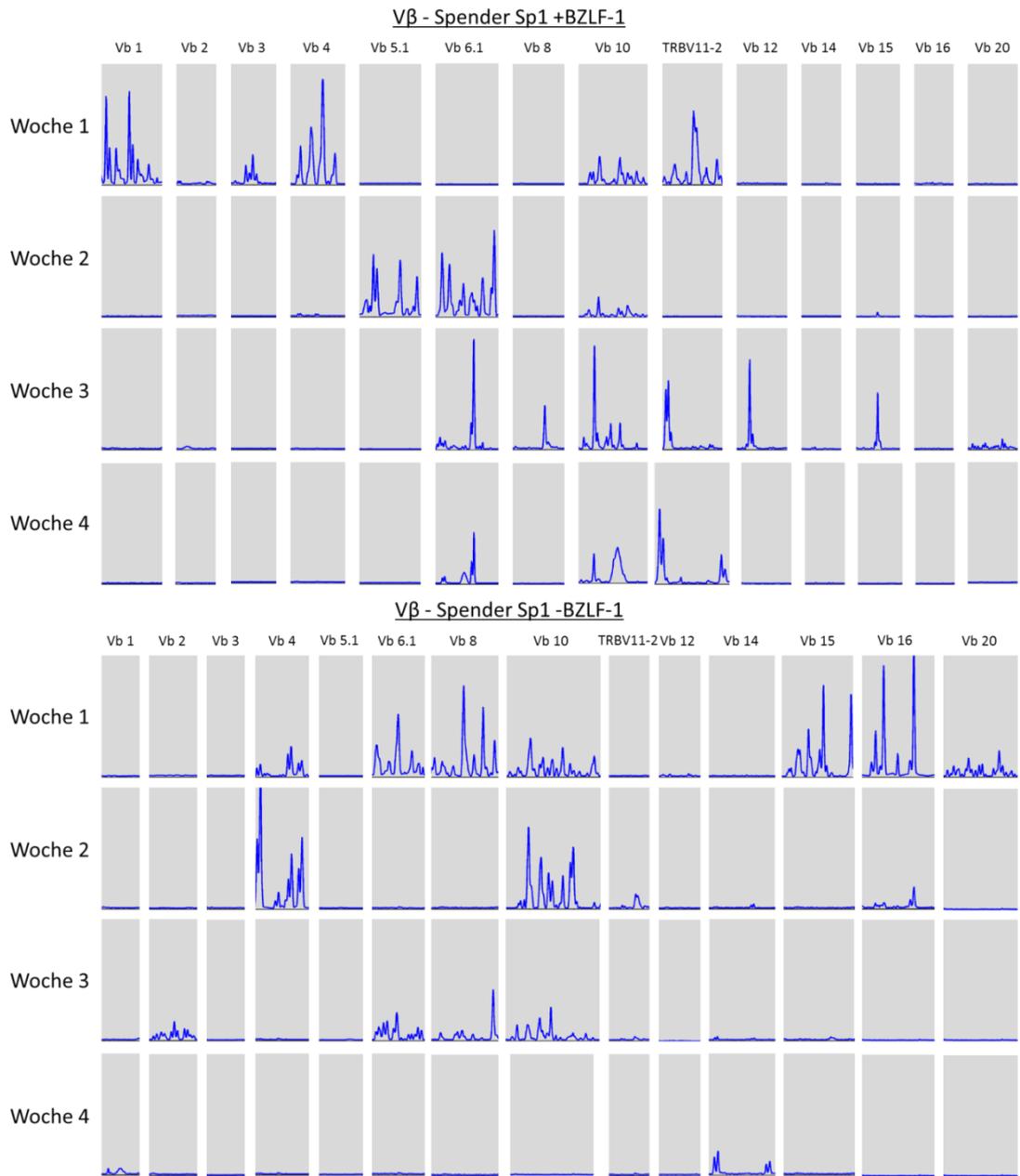


Abbildung 3-19 - Expressionsmuster der Vβ-Familien Vβ1, 2, 3, 4, 5.1, 6.1, 8, 10, TRBV11-2, 12, 14, 15, 16 und 20 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der $\alpha\beta^+$ T-Zellen des Spenders 1 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

Spender 2

Für Spender 2 konnten in der 4. Woche keine Expressionen detektiert werden. Vermutlich ist hier eine zu geringe Template-Menge verantwortlich. Eine Auswertung konnte nicht erfolgen. Zu geringe Probenmengen schlossen eine Wiederholung aus. Mit Hilfe der Konsensus-PCR konnten wir jedoch nachweisen, dass die vorhandenen cDNA-Proben sowohl für Peptid-gepulste als auch nicht-gepulste V β s positiv waren.

Deutliche Expressionen konnten beobachtet werden in Woche 1 für V β 1 und V β 4 (BZLF-1-gepulst), V β 4, V β 10, V β 12 und TRBV30 (nicht BZLF-1-gepulst) sowie in Woche 2 für V β 1, V β 5-1, V β 6-2, V β 10 und V β 16 (BZLF-1-gepulst), V β 4, V β 5-1 und V β 10 (nicht BZLF-1-gepulst) und ferner in der Woche 3 für V β 4 (BZLF-1-exponiert). Dabei zeigten nur die Peptid-gepulsten Zellen für V β 1 ein oligoklonales Expressionsmuster in Woche 1 und ein monoklonales Muster in Woche 2. Für V β 4 zeigten sich zum einen ein oligoklonales Muster in Woche 1 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst), zum anderen monoklonale Muster in Woche 2 (nicht-Peptid-gepulst) und in Woche 3 (Peptid-gepulst). Sowohl Peptid-gepulste als auch nicht-gepulste Zellen zeigten für V β 5 oligoklonale Muster ausschließlich in Woche 2. V β 6 zeigte in Woche 2 ein oligoklonales Muster (Peptid-gepulst). Nicht-Peptid-gepulste Zellen in Woche 1 und 2 sowie Peptid-gepulste Zellen in Woche 2 zeigten für V β 10 oligoklonale Muster. Für V β 12 und TRBV30 waren ausschließlich in Woche 1 (nicht-Peptid-gepulst) ein oligoklonales bzw. ein monoklonales Muster zu verzeichnen. V β 16 zeigte ein monoklonales Expressionsmuster in Woche 2 (Peptid-gepulst) (Abb. 3-22).

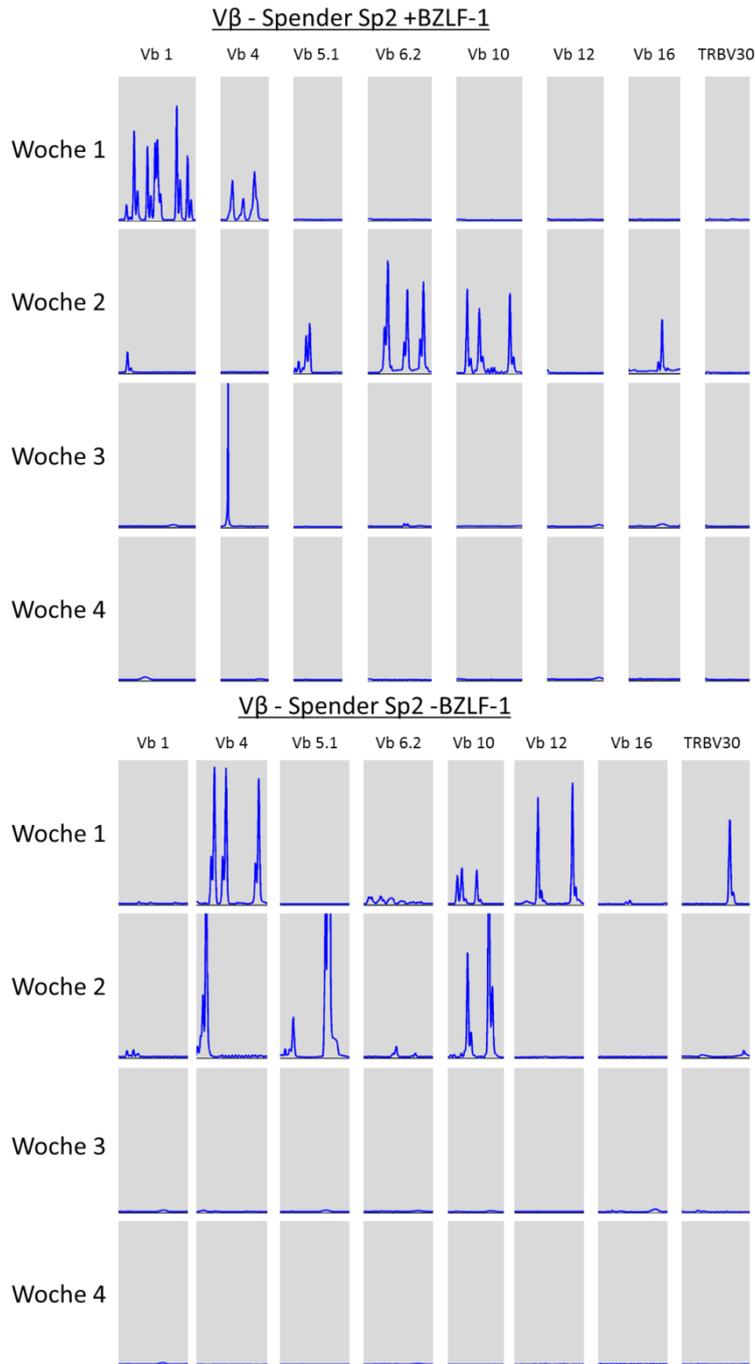


Abbildung 3-20 - Expressionsmuster der V β -Familien V β 1, 4, 5.1, 6.2, 10, 12, 16 und TRBV30 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der $\alpha\beta^+$ T-Zellen des Spenders 2 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

Spender 3

Deutliche Expressionssignale waren für Spender 3 in geringer Anzahl zu verzeichnen. Zu geringe Probenmengen schlossen eine Wiederholung der Versuche aus. Mit Hilfe der Konsensus-PCR wiesen wir das Vorhandensein von V β s für Peptid-gepulste Zellen in Woche 2 und Woche 4 sowie für nicht-Peptid-gepulste Zellen in Woche 4 nach.

Deutliche Expressionen zeigte Spender 3 in Woche 2 für V β 5-1 (Peptid-gepulst) und V β 16 (nicht-Peptid-gepulst), in Woche 3 für V β 1, V β 15 (BZLF-1-gepulst) sowie V β 6-1 (nicht BZLF-1-gepulst), ferner in Woche 4 für V β 5-1 (mit BZLF-1-Behandlung), V β 1, V β 4 und V β 5-1 (ohne BZLF-1-Behandlung).

Peptid-gepulste Zellen für V β 1 zeigten in Woche 3 ein monoklonales Expressionsmuster, während nicht-Peptid-gepulste Zellen in Woche 4 ein oligoklonales Muster zeigten. V β 4 zeigte ausschließlich in Woche 4 (nicht-Peptid-gepulst) ein oligoklonales Muster. Für V β 5-1 zeigten sich in Woche 2 (Peptid-gepulst) und Woche 4 (Peptid-gepulst und nicht-gepulst) oligoklonale Muster. V β 6-1 zeigte ausschließlich in Woche 3 ein oligoklonales Muster (nicht-Peptid-gepulst). Für V β 15 zeigte sich in Woche 3 ein oligoklonales Expressionsmuster (Peptid-gepulst). V β 16 zeigte in Woche 2 ein monoklonales Muster (Peptid-gepulst) (Abb. 3-23).

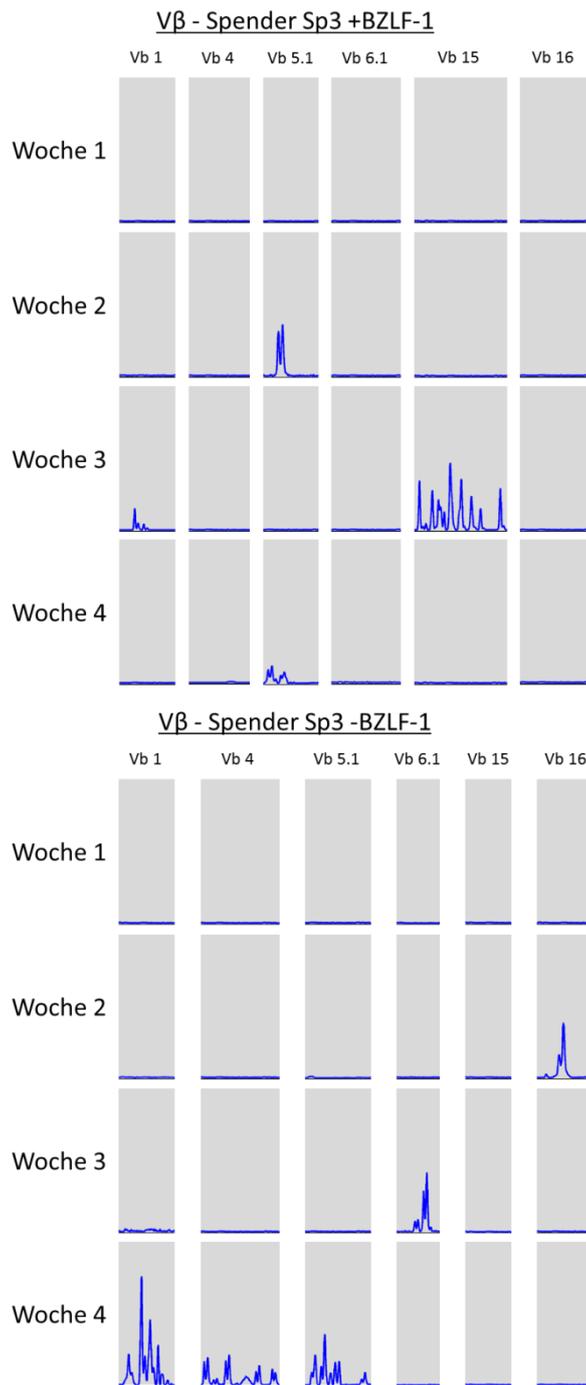


Abbildung 3-21 – Expressionsmuster der Vβ-Familien Vβ1, 4, 5.1, 6.1, 15 und 16 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der αβ⁺ T-Zellen des Spenders 3 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

Spender 4

Auch im Fall von Spender 4 waren in den Wochen 3 und 4 geringe Expressionssignale registriert worden. Zu geringe Probenmengen schlossen eine Wiederholung der Versuche aus. Auch hier zeigte eine Konsensus-PCR, dass die Proben V β positiv waren, und zwar für nicht-Peptid-gepulste Zellen in Woche 3, sowie für Peptid-gepulste und nicht-gepulste Zellen in Woche 4.

Bei Spender 4 waren deutliche Expressionen in der 1. Woche für V β 1, V β 5-1 (mit BZLF-1-Behandlung), V β 10 und V β 14 (ohne BZLF-1-Behandlung), in der 2. Woche für V β 6-2, V β 17, V β 24 (BZLF-1-exponiert), V β 1 und V β 20 (nicht BZLF-1-exponiert), darüber hinaus in der 3. Woche für V β 5-1, V β 24 (BZLF-1-exponiert) sowie V β 5-1 (nicht-gepulst) und in der 4. Woche für V β 1, V β 5-1 und V β 20 (nicht-gepulst) zu finden.

V β 1 zeigte für Peptid-gepulste Zellen in Woche 1 sowie für nicht-Peptid-gepulste Zellen in Woche 2 und 4 oligoklonale Muster. V β 5-1 zeigte für Peptid-gepulste Zellen in Woche 1 ein oligoklonales Muster und für nicht-Peptid-gepulste Zellen in Woche 4 ein monoklonales Muster. Für V β 6-2 wurde ausschließlich in Woche 2 ein oligoklonales Muster (Peptid-gepulst) detektiert. Nicht-Peptid-gepulste Zellen zeigten für V β 10 und V β 14 in Woche 1 jeweils oligoklonale Muster. Peptid-gepulste Zellen zeigten für V β 17 in Woche 2 ein oligoklonales Muster. V β 20 zeigte in Woche 2 ein monoklonales und in der Woche 4 ein oligoklonales Muster (nicht-Peptid-gepulst). Für V β 24 zeigten sich in den Wochen 2 und 3 monoklonale Expressionsmuster (Peptid-gepulst) (Abb. 3-24).

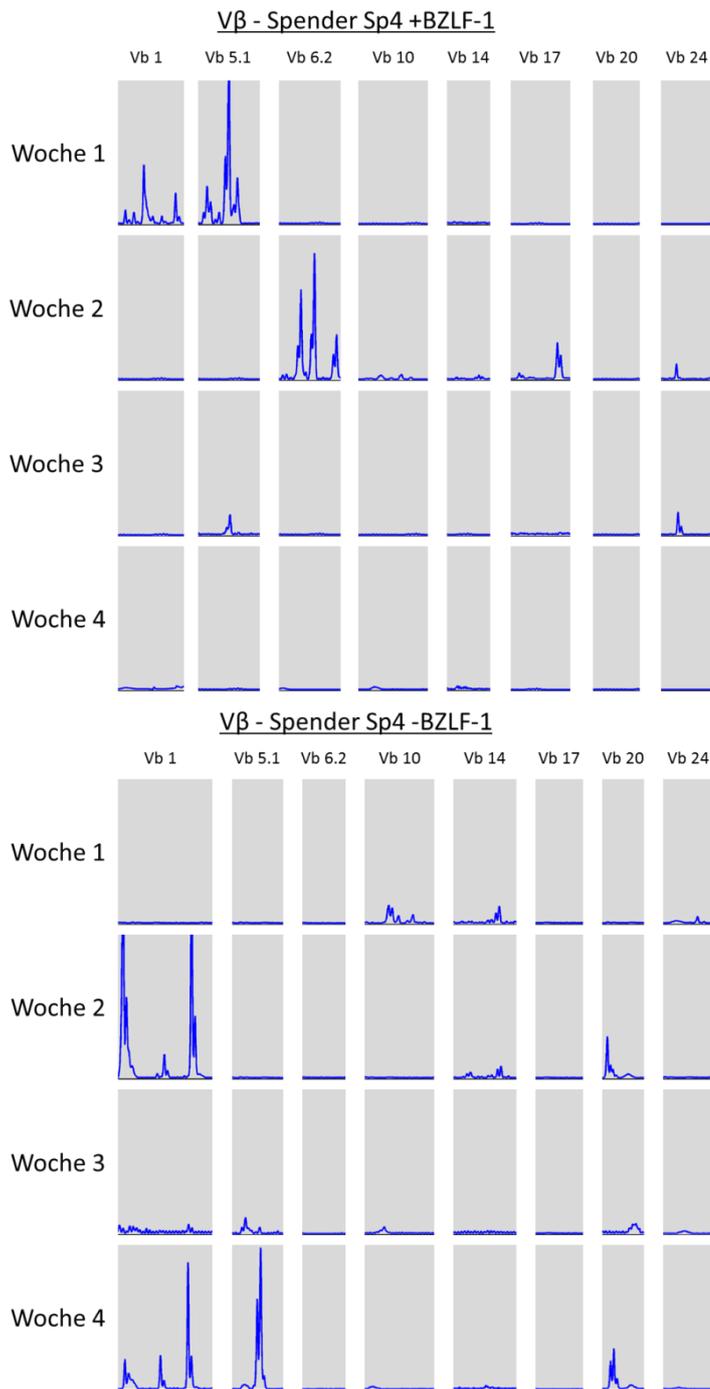


Abbildung 3-22 - Expressionsmuster der Vβ-Familien Vβ1, 5.1, 6.2, 10, 14, 17, 20 und 24 im Zellkulturverlauf (4 Wochen). Dargestellt sind die Spectratypes (Fragmentlängenanalysen) der αβ⁺ T-Zellen des Spenders 4 für BZLF-1-kultivierte (oben) und nicht-BZLF-1-kultivierte Zellkulturen (unten).

3.3 DNA-Sequenzierung zur Detektion der Aminosäuresequenz der CDR3 Region der T-Zell-Rezeptor V α -Kette

Unter Berücksichtigung der Expressionsqualität und -quantität durch Beurteilung der Spectratype-Ergebnisse, wählten wir nur die Proben mit den deutlichsten Expressionsmustern zur DNA-Sequenzierung aus. Diese Proben zeigten übereinstimmend eindeutige, hohe Single Peaks. Da Single Peaks indikativ für eine klonale Expansion sein können gingen wir davon aus, dass unter den herrschenden Bedingungen monoklonale Expansionen diesen Expressionsmustern zugrunde lagen. Einem Peak im Gauß'schen Verteilungsmuster können bis zu 2000 diverse Transkripte zugrunde liegen, was in unserem Fall unwahrscheinlich schien. Jedoch war eine Oligoklonalität nicht auszuschließen, da die Paarung einer definierten β -TCR Kette mit unterschiedlichen α -Ketten erfolgen kann, welche jedoch aufgrund molekularer Kompatibilitätserfordernissen einen gleichen oder ähnlichen Aufbau aufweisen müssen.

Zur Durchführung der Analysen wurde die Software „3130xl Genetic Analyzer Data Collection Version 3.0“ verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Sequencing Analysis 5.3“. In Tabelle 3-4 sind die Proben aufgelistet, die wir für die Sequenzierung ausgewählt haben. Von den 18 V α -Proben erwiesen sich 5 Analysen und von den 12 V β -Proben 2 Analysen als auswertbar (zur Auswertung siehe 2.2.11).

Tabelle 3-4 – Tabellarische Auflistung der sequenzierten V α - und V β -Familien. Abk.: Sp = Spender; W = Woche; +B = BZLF-1-gepulst; oB = nicht BZLF-1-gepulst;

V α -Familien	V α 1A	Sp1, W4, +B
	V α 1B	Sp3, W2, +B; Sp3, W4, oB
	V α 4A	Sp4, W1, +B
	V α 4B	Sp3, W2, +B; Sp3, W3, +B
	V α 6	Sp1, W3, +B; Sp1, W4, +B; Sp3, W4, +B; Sp4, W3, oB
	V α 10	Sp3, W4, +B
	V α 15	Sp3, W3, oB; Sp3, W4, +B; Sp4, W1, +B
	V α 18	Sp1, W1, oB; Sp2, W1, +B
	V α 32	Sp2, W1, +B; Sp2, W1, oB
V β -Familien	V β 4	Sp2, W4, oB
	V β 5-1	Sp2, W2, oB; Sp4, W1, +B; Sp4, W4, oB
	V β 8	Sp1, W3, +B; Sp1, W3, oB
	TRBV11-2	Sp1, W2, oB; Sp1, W3, +B
	V β 18	Sp1, W1, +B
	V β 23	Sp1, W4, +B
	TRBV30	Sp2, W1, +B; Sp2, W1, oB

3.3.1 Zusammenstellung der ermittelten CDR3-Sequenzen

Die CDR3-Region wird nach Candeias et al. (1991) definiert. Dabei identifiziert die Aminosäure an Position 94 den Beginn einer TRAV- bzw. TRBV-Region und reicht bis zum Phenylalanin an Position 108 im FGXG Motif. Auf diese Weise ergibt sich die allgemeine Motif Sequenz CAS – CDR3 – FGXG.¹³⁰ Der Anfang der Motif-Sequenz („CA“) kann jedoch auch variieren („CI“ oder „VL“), wie in unseren Ergebnissen zu sehen ist (Tab. 3-5).

Die in der Sequenzanalyse identifizierten CDR3-Regionen sind in der Tabelle 3-5 gezeigt. Diese zeigt auch die Charakteristika zur jeweils erhaltenen Sequenz wie Spender, Zeitpunkt der Analyse, Kulturtyp (Peptid-assoziiert oder nicht Peptid-assoziiert), enthaltenes variables Segment des V α - bzw. V β -Lokus, sowie die aus der Nukleotidsequenz ableitbare Aminosäuresequenz. Zur Darstellung der unterschiedlichen Aminosäureladungen nutzten wir eine Farbkodierung.

Ergebnisse

Tabelle 3-5 - Ergebnisse der fünf V α - und zwei V β -Familien die erfolgreich sequenziert wurden. Spalten von links nach rechts: Spalte 1 = Zellkulturwoche; Spalte 2 = Spender; Spalte 3 = BZLF-1-Exposition (+ = exponiert; - = nicht exponiert); Spalte 4 = V α - bzw. V β -Familie; Spalte 5 = Abbildungen der jeweiligen Spectratypes mit Angabe der jeweiligen Höhen (ht); Spalte 6 = V-/CDR3-/J-Regionen, von oben nach unten: Aufgelistet sind die jeweilige TRAV-/TRAJ- bzw. TRBV-/TRBJ-Regionen, darunter die jeweiligen Nukleotid-Sequenzen und unter diesen die jeweilige Aminosäure-Sequenzen.

TRAV

Woche	Spender	BZLF-1	V α -Familie	Spectratypes und Höhen	Gensegmente - Nukleotid-Sequenzen - Aminosäure-Sequenzen		
					V-Region	CDR3-Region	J-Region
2	3	+	V α 01B	ht 270 	TRAV 8-3	GTGGGTGCCGAAAGGAGGAGGTGCTGACGGACTCAC	TRAJ 45
					TGTGCT		CTTTGGCAAAGG
					VL		WVPKGGGADGLT
2	3	+	V α 04B	ht 884 	TRAV 26-1	GTCAGAGTCGCACGATCAAATTCGGGTATGCACTCAAC	TRAJ 41
					TGCATC		TTCGGCAAAGGC
					CI		VRVARSNSGYALN
3	3	+	V α 04B	ht 355 	TRAV 26-1	GTCAGAGTCGCACGATCAAATTCGGGTATGCACTCAAC	TRAJ 41
					TGCATC		TTCGGCAAAGGC
					CI		VRVARSNSGYALN
4	1	+	V α 01A	ht 931 	TRAV 3	GTGAGAGACGCGGACACAGGCTTTCAGAACTTGTA	TRAJ 8
					TGTGCT		TTTGGAACTGGC
					CA		VRDADTFQKLV
4	1	+	V α 06	ht 3184 	TRAV 14DV4	ATGAGAGACCTTAGAGATGACAAGATCATC	TRAJ 30
					TGTGCA		TTTGAAAAGGG
					CA		MRDLRDDKII

TRBV

Woche	Spender	BZLF-1	V β -Familie	Spectratypes und Höhen	Gensegmente - Nukleotid-Sequenzen - Aminosäure-Sequenzen		
					V-Region	CDR3-Region	J-Region
1	2	-	V β 30	ht 558 	TRBV 30	TGGAGCAGACTAGCGGGACGAAGTGAGCAGTTC	TRBJ 2-1
					TGTGCC		TTCGGGCCAGGG
					CA		WSRLAGRSEQF
4	1	+	V β 23	ht 1023 	TRBV 2	AGCAGCGACAATGAGCAGTTC	TRBJ 2-1
					TGTGCC		TTCGGGCCAGGG
					CA		SSDNEQF

Ladungseigenschaften	Unpolar/hydrophob	Polar/neutral	basisch	sauer
----------------------	-------------------	---------------	---------	-------

Der Vergleich der von uns identifizierten TCRs zeigte, dass CDR3-Regionen der α -Ketten eines Spenders entweder identisch waren mit denen für Spender 3 in Woche 2 und 3 identifizierten TRAV-Sequenzen bzw. ähnliche Motifs führten oder teilweise identische Aminosäure-Sequenzen aufwiesen, wie dies für die 2 α -Sequenzen des Spenders 1 in der Woche 4 der Fall war (Tab. 3-5). Spender 3 zeigte damit eine Persistenz des in Woche 2 induzierten Klons bis in Woche 3 an. Wohingegen die identen Ladungsverhältnisse und Motifs der beiden in Woche 4 identifizierten TCR α -Sequenzen - jedoch mit unterschiedlichen TCRs – eine ähnliche Spezifität des TCR andeutet. Die zwei CDR3-Regionen, die wir in direkten Sequenzierungen für β -Ketten erhielten waren einzigartig und wiesen keine Verwandtschaftsverhältnisse auf. Sie waren sowohl von verschiedenen Spendern als auch verschiedenen Zeitpunkten und unterschiedlichen Behandlungsregimen abgeleitet.

3.4 Die $CD4^+ V\delta 1^+$ T-Zell-Precursor-Frequenz und die Anzahl der generierten $\alpha\beta^+$ T-Zellen korrelieren in Peptid-gepulsten Zellkulturen

Um zu zeigen, dass die detektierten $\alpha\beta^+$ T-Zellen aus dem von uns identifizierten $CD4^+ V\delta 1^+$ T-Zellen hervorgegangen sind, wurden die spenderindividuellen Frequenzen des Vorläufers mit der jeweils generierten $\alpha\beta$ -T-Zellzahl korreliert. Es ergab sich ein interessanter Befund: Sowohl in den Peptid-gepulsten als auch den nicht Peptid-gepulsten Kulturen konnten $\alpha\beta^+$ T-Zellen detektiert werden, jedoch war zum einen die Anzahl der entstandenen $\alpha\beta^+$ T-Zellen in den Peptid-gepulsten Kulturen höher als in den nicht-Peptid-gepulsten, und zum anderen korrelierte nur in den Peptid-gepulsten Kulturen die Frequenz des Vorläufers mit dem der generierten $\alpha\beta^+$ T-Zellen. Diese Korrelation war mit 0,96 sehr stringent und zeigte eine hohe Signifikanz ($p = 0,037$) (Abb. 4-1). Aus dieser Beobachtung schließen wir, dass $\alpha\beta^+$ T-Zellen generiert wurden und dass eine vermehrte Generierung von $\alpha\beta^+$ T-Zellen in den Kulturen dann gegeben war, wenn eine entsprechend hohe Anzahl des $V\delta 1^+$ Progenitors vorhanden war.

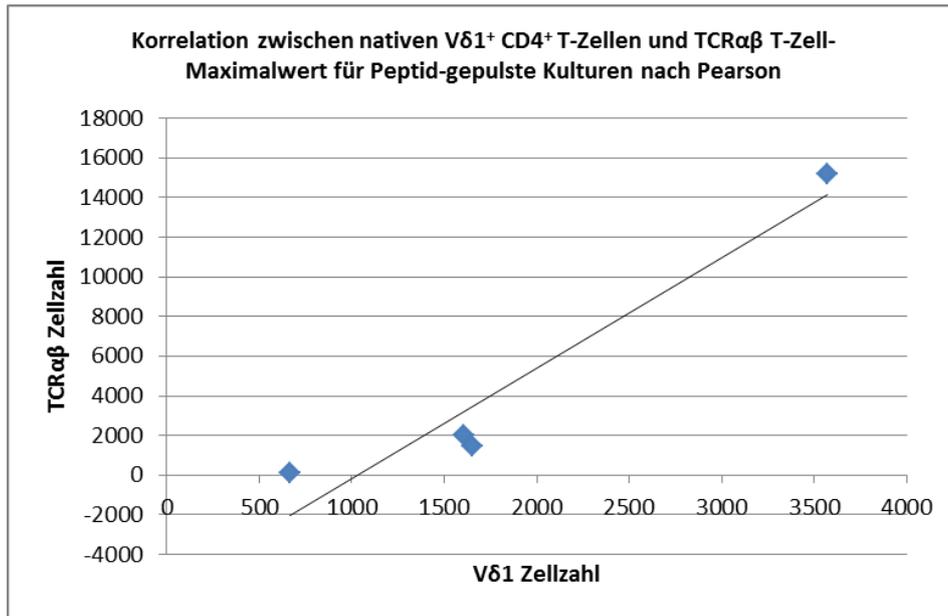


Abbildung 3-23 - Pearson Korrelation: Korrelation zwischen nativer Vδ1⁺ CD4⁺ T-Zell-Populationen und αβ⁺ T-Zell-Populationen Peptid-gepulster Kulturen im Zellkulturverlauf.

Dagegen zeigte sich für die nicht-Peptid-gepulsten Zellen keine Korrelation ($r = -0,015$) zwischen der initialen Vδ1-CD4-Zellzahl und der im Zellkulturverlauf registrierten maximalen αβ-T-Zellzahl sowie geringe Signifikanz ($p = 0,98$) (Abb. 4-2).

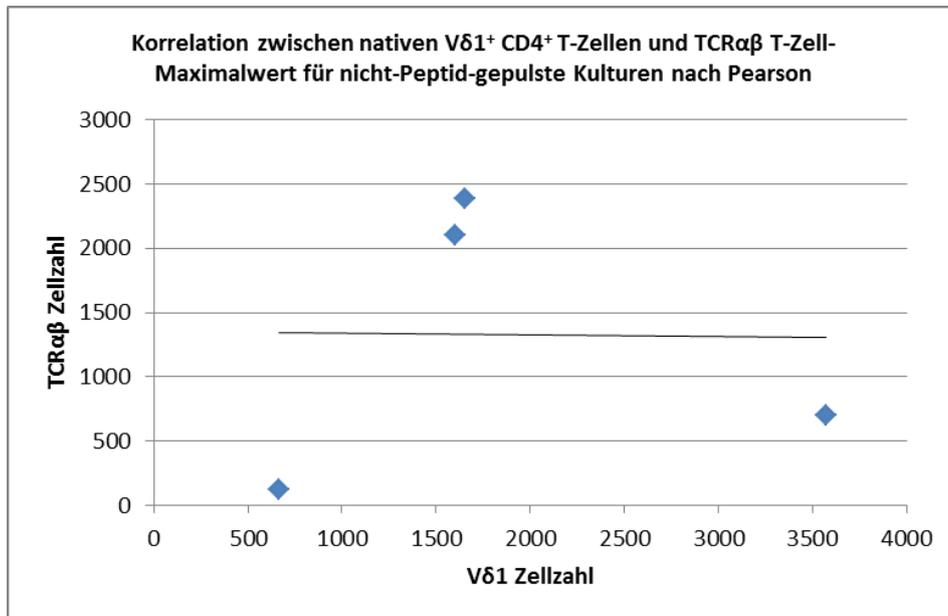


Abbildung 3-24 – Pearson Korrelation: Korrelation zwischen nativer Vδ1⁺ CD4⁺ T-Zell-Populationen und αβ⁺ T-Zell-Populationen nicht-Peptid-gepulster Kulturen im Zellkulturverlauf.

4 Diskussion

Die Thymusinvolution beginnt bereits ein Jahr nach der Geburt und ist kurz nach der Adoleszenz abgeschlossen, d.h. der Thymus im Erwachsenenalter ist nicht mehr in der Lage naive $\alpha\beta^+$ T-Zellen herzustellen.¹⁴⁴ Um den Mangel an T-Zellnachschub zu kompensieren spielt die post-thymische Proliferation naiver T-Zellen in der Peripherie^{145,146}, sowie die Proliferation des Gedächtnis-Kompartiments, das heißt der Antigen-erfahrenen T-Zellen, eine große Rolle. Unterschiedliche Gruppen haben gezeigt, dass extrathymisch, jedoch in Anwesenheit thymustypischer Komponenten, eine T-Zellreifung aus Progenitoren stattfindet. In vivo, nämlich in den Tonsillen¹⁴⁷, Lymphknoten und der Milz¹⁴⁸⁻¹⁵¹ und in vitro mit der maximalen Reduktion des Microenvironments auf die murinen Stroma-Zelllinien OP-9, die transgen einen der Notch-Liganden exprimieren (Jag, DL1 oder DL4).¹⁵² Wir konnten zeigen, dass $\gamma\delta^+$ T-Zellen zum post-thymischen $\alpha\beta$ -T-Zell-Pool beitragen indem wir nachwiesen, dass $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellen als ungewöhnliche Chimäre aus T-Zellen und Progenitorzellen unter inflammatorischen Bedingungen in $\alpha\beta^+$ T-Zellen differenzieren können.¹⁴¹

Analog dieser Befunde war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob die Generierung Epitop-spezifischer $\alpha\beta^+$ T-Zellen, aus konsequenterweise $\alpha\beta$ -T-Zell-**depletierten** PBMCs gelänge. Die Kulturbedingungen entsprachen einem leicht inflammatorischen Milieu, denn IL-2, das in vivo von aktivierten T-Zellen sezerniert wird¹, PHA ein Mitogen und IL-7 sowie bestrahlte Feeder-Zellen, die ein Konglomerat aus proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen sezernieren und Apoptosesignale mediieren, DNA-damage-pathway aktivierende Signale sowie die massive Expression stressassoziiertes Selbstliganden wie MICA, MICB sowie ULBPs aussenden, erfüllen die Gegebenheiten der chronischen Inflammation. Als Peptid wurde BZLF-1 verwendet, ein Peptid das EBV-infizierte Zellen produzieren. Bei diesem Peptid handelt es sich um das EBV-abgeleitete HLA-B*3501-restringierte Peptid BZLF1₅₄₋₆₄ (EPLPQGQLTAY), welches vom ELS4 TCR erkannt wird.³⁸ Es spielt eine Rolle beim Wechsel von der latenten in die lytische Form des EB-Virus.¹⁵³⁻¹⁵⁶

In den Versuchen zur Generierung BZLF-1 Peptid-spezifischer $\alpha\beta^+$ T-Zellen stellten nur noch $\gamma\delta^+$ T-Zellen das T-Zell-Kompartiment. Als Spender dienten (gesunde) HLA-B35⁺ Probanden. Als Kontrollansatz wurden T-Zell-Pools ohne BZLF-1 Behandlung

mitgeführt. In allen Ansätzen reiner $V\delta 1^+$ T-Zell-Populationen HLA-B35⁺ Individuen waren, unabhängig von einer wöchentlichen BZLF-1-Exposition, $\alpha\beta^+$ T-Zellen entstanden. Die Detektion mit BZLF-1-Tetrameren, die mit hoher Sensitivität BZLF-1 spezifische T-Zellen nachweisen können, waren in beiden Versuchsansätzen jedoch negativ, unabhängig davon ob BZLF-1-gepulst wurde oder nicht. Dies könnte den Schluss nahelegen, dass der $V\delta 1^+$ CD4⁺ Progenitor T-Zellen im Zuge T-Zell-konsumierender Prozesse, wie der Inflammation, kompensatorisch substituiert. Die Tatsache, dass hier keine Epitop-spezifischen T-Zellen generiert wurden, kann jedoch nicht generell den Schluss zulassen, dass Epitop-spezifische T-Zellen, die in der Inflammation aktiviert, zytotoxisch und damit gewebsschädigend lokal vorliegen, nicht generiert werden würden. Hier wurde mit einer konstanten Menge an Progenitor ein breites Repertoire generiert, das nicht Epitop-spezifisch, d.h. tolerant ist. Um eine Epitop-spezifische Antwort generieren zu können, müssen jedoch 10^6 T-Zellen vorhanden sein, damit ein TCR dabei ist, der ein definiertes Epitop spezifisch erkennen kann. Diese Zahl haben wir in Einzelansätzen nicht erreicht, da dies mit den geringen Zahlen an Progenitoren aus frischem Vollblut nicht erreichbar war. Jedoch hätte in der Gesamtheit der Ansätze ein Epitop-spezifischer TCR statistisch erreicht werden können. In vivo ist jedoch sicher eine Häufung des Progenitors lokal zu verzeichnen. Legt man, wie von uns gezeigt, eine Effizienz wie in der thymischen T-Zellreifung zugrunde, wäre es denkbar, dass über die Zeit in vivo bei chronischen entzündlichen Prozessen auch $\alpha\beta$ -T-Zellzahlen generiert werden können, die statistisch eine Zelle enthalten, die für ein lokal, im Kontext von (steriler) Inflammation, präsentiertes (Selbst-)Antigen spezifisch sein könnte. Dies hätte im schlimmsten Falle Autoimmunität zur Folge, wenn gleichzeitig auch die zentrale Toleranz versagt.

Die stark spenderabhängigen Ergebnisse aus der FACS-Analyse korrelierten mit der Komplexität der molekular detektierten TCR-Repertoire Diversität. Auch sie zeigten, dass die Differenzierung von $\alpha\beta^+$ T-Lymphozyten unabhängig von einer Peptid-Exposition erfolgen konnte und bei unterschiedlichen Spendern im zeitlichen Verlauf individuell verschieden ausgeprägt war. Kohärent dazu war der Befund, dass ungeachtet ob gepulst oder nicht-gepulst die Expression von TRAV- und TRBV-Segmenten syngenen waren.

Zu geringe Template-Mengen könnten der Grund dafür sein, dass in der 2. Zellkultur-Woche für Spender 4 keine α -Ketten-Expressionen detektiert werden konnten (Tab. 3-1). Die Ansätze waren technisch insgesamt am absoluten Detektionslimit, da die Konzeption des Ansatzes ein tatsächliches initiales 0 Niveau an $\alpha\beta$ -T-Zellen zwingend erforderte. Die zum Teil sehr geringe Ausgangszellzahl von unter 10.000 Zellen pro Analyse führte dazu, dass die Template-Menge am Detektionslimit für ein Spectratyping war. Für Spender mit wenigen oder kleinen TCR $\alpha\beta$ Expressionssignalen wurde eine Konsensus-(V β -)PCR etabliert, in der statt 24 verschiedener V β -Primer eine PCR mit einem alle V-Segmente amplifizierenden Forward Primer (Konsensus Primer) durchgeführt wurde. Nach dieser Voramplifikation wurde ein komplettes Spectratype angeschlossen. Dabei wurden für die Peptid-gepulsten Zellreihen der Spender 2, Spender 3, Spender 4 (jeweils 4. Woche) stärkere Signale detektiert als für die nicht Peptid-gepulsten Zellreihen.

Die Bestimmung des complexity scores erlaubte es die Ratio für die Expressionen von TCR α - zu TCR β -Ketten zu ermitteln. Ein TCR ist ein Heterodimer und verfügt über eine α - und eine β -Kette. Diese Stochastik sollte zu einem 1:1 Verhältnis führen. Es gibt Ausnahmen von dieser Regel, nämlich bei dualen TCRs, die aus zwei α -Ketten und einer β -Kette oder zwei β -Ketten und einer α -Kette komponiert sind. Verschiebungen des 1:1 Verhältnisses, besonders in kleinen Repertoires, können unterschiedliche Ursachen haben. Zum Beispiel paart sich nicht jede α - oder β -Kette zu einem komplementierenden TCR-Heterodimer. Es gibt die präferierte Paarung einer spezifischen α -Kette mit einer oder diversen β -Ketten und umgekehrt. Auch TCR Revision kann zu einer Neuordnung des zweiten TCR α oder TCR β Locus führen und der Herstellung einer weiteren funktionellen α - oder β -Kette, und damit dualen TCRs.

Interessant war in dieser Studie jedoch nicht die Ratio von β - und α -Ketten per se im Zellkulturverlauf. Für viele Spender zeigten sich jeweils gegen Ende des Versuchs (4. Woche) ein α/β -Ketten-Ratio über 1 mit Ausnahme der Peptid-gepulsten Kulturen der Spender 1 (Ratio <1) und Spender 4 (Ratio = 0) und die der nicht-Peptid-gepulsten Kulturen des Spenders 2 (Tab. 3-3). In einem komplexen Repertoire hieße das, dass die Diversität der α -Ketten höher als die der β -Ketten ist. Der naheliegende Schluss einer höheren Diversität der α -Ketten gegenüber den β -Ketten bestätigte sich jedoch nicht. Interessanterweise war die zahlenmäßige Überlegenheit an α -Ketten in unseren

Ansätzen jedoch nur scheinbar, denn wir detektierten, dass single peaks der TRBV-Ketten nicht wie bei den α -Ketten direkt sequenzierbar waren, sondern polyklonalen Ursprungs waren, jedoch mit gleicher Länge, d.h. eine Längenrestriktion aufwiesen. Ganz im Gegensatz zu den α -Ketten, wo wir single peaks in direkten Sequenzierungsansätzen entschlüsseln konnten, gelang uns das bei eindeutigen und hochpositiven single peaks der β -Ketten nicht. Durch Klonierung der Gesamtheit des PCR-Ansatzes in *E. coli* und nachfolgende Sequenzierung von Einzelklonen könnte die genaue Anzahl an unterliegenden CDR3-Regionen identifiziert werden.

Einige der identifizierten CDR3-Regionen waren interessanterweise nicht wie erwartet „private“, sondern sogenannten „public“ TCR-Sequenzen angehörig. Wie bereits in der Einleitung erläutert, entstehen public TCRs im Rahmen der sogenannten konvergierenden Rekombination und sind, im Vergleich zu private TCRs, in vielen und verschiedenen Individuen zu finden⁹ (siehe 1.7.1). Gehäuft kommen public TCRs in Individuen mit akuten und/oder chronischen Infektionen, sowie autoimmunen und allergeantigenen Erkrankungen vor. Public TCRs besitzen eine definierte Antigen-Spezifität und werden von mehreren Individuen exprimiert.²⁰ Die CDR3-Regionen sogenannter public-TCRs sind interindividuell identisch und können sowohl die TRA- als auch die TRB-Kette betreffen.²⁵ Die Entdeckung der public TCRs liegt in den frühen 1990ern.^{18,39,157} Der erste public TCR der untersucht wurde, war der JM22 TCR, welcher das HLA-A*0201-restringierte GIL Peptid des Influenza-Virus erkennt.²⁷ Man fand diesen und identische T-Zell-Rezeptoren in vielen Individuen nach Influenzainfektionen. Public TCRs sind vor allem gegen Virus-Epitope, aber auch gegen Toxine und Autoantigene beschrieben und werden nach Turner et al. (2006) in drei Grade eingeteilt. Grad I ist charakterisiert durch idente V-Segmente (TRAV und TRBV) und nur geringfügig konservierte CDR3-Regionen. Grad II TCRs sind durch vorhergesagte V-Regionen und zusätzlich klar definierte Motif-Reste innerhalb der CDR3-Region gekennzeichnet. Sowohl für Grad I als auch für Grad II gilt, dass die J-Regionen (TRAJ und TRBJ) nicht konserviert sind. Bei vollständig identischen TCR α - und/oder TCR β -Sequenzen handelt es sich um Grad III TCRs, welche typischerweise als „public“ TCRs bezeichnet werden.²⁵ Da diese Klassifikation nicht ausreicht um alle TCRs korrekt einzuteilen, wurde durch Miles, Douek et al. (2011) diese um einen weiteren Grad erweitert. So genannte Grad IV TCRs sind zwischen Grad II und Grad III

einzuordnen. In diesem speziellen Fall bestehen die TCRs aus konservierten V-Regionen, einem konservierten Motif innerhalb der CDR3-Region, sowie konservierten J-Regionen. Diese TCRs unterscheiden sich lediglich in einer oder wenigen Aminosäureresten innerhalb der CDR3-Sequenz und sind daher strenggenommen nicht vollkommen identisch. Dies sind sogenannte „near-public“ TCRs. Die meisten TCRs fallen in mehr als eine Kategorie. Beispielsweise sind die meisten zwischen Grad II Grad III oder zwischen Grad III und Grad IV einzuordnen.⁹

Die Analyse der TCRs hinsichtlich der exprimierten variablen Segmente ergaben interessante Befunde. Im Versuchsverlauf konnten wir beobachten, dass einige V α - bzw. V β -Familien häufiger exprimiert wurden als andere. Dies geschah unabhängig von Differenzierungswoche, Spender und Peptidbehandlung. Die von uns detektierten TRAV-Gensegmente TRAV5, TRAV8-1, TAV14DV4 und TRAV29DV5 sowie die TRBV-Gensegmente TRBV5-1/-3, TRBV9 und TRBV14 traten peptidbehandlungs- und spenderunabhängig auf. Lim et al. (2000) konnte in Virusinfektion-assoziiertem Kontext (HLA-A2-restringiertes EBV-Epitop; GLC-A2) für einige V β -Familien hochgradige Rekurrenz nachweisen. Analog zu unseren Ergebnissen, waren bestimmte V β s rekurrent und traten unabhängig vom Individuum und der Pathologie auf. Die Verfasser der Studie interpretierten diese Befunde damit, dass das EB-Virus lebenslang und wiederholt reaktiviert werden kann, GLC-A2-reaktive T-Zellen älterer Individuen diesem Antigen daher permanent ausgesetzt waren und diese chronische Stimulation das Auftreten von public TCR Klonotypen unterstützt.⁴⁰ Als alleinige Erklärung ist sie sicher nicht schlüssig, denn public TCRs mit identischen Sequenzen wurden sowohl in Primärinfektionen als auch nativen gesunden nicht-infizierten Individuen nachgewiesen. Wir vermuten, dass die hier und auch in vivo herrschende chronische Inflammation einem Stereotyp an inflammatorischen Komponenten entspricht, dessen Epigenetik - durch Modulation des Chromatins - zur Aktivierung oder Zugänglichkeit definierter variabler Gensegmente führt und reproduzierbar ihre Rekombination zulässt.

Interessant ist der Befund des Segments TRAV26-1 bei Spender 3 (Woche 2 und 3) (Tab. 3-5). Der Nachweis des TRAV26-1 Elements war nicht unerwartet. Ihm kommt eine besondere Bedeutung zu: die Ergebnisse der Studie von Schilbach et al. (2014) zeigen, dass die Initiation der α -Gen-Rekombination exakt an dem TRAV-Segment beginnt, das dem V δ 1-Lokus benachbart liegt, und zwar dem TRAV26-2 Segment.

Auch im Thymus öffnet sich der Locus genau an dieser Stelle zur Rekombination. Dabei zeigte die Studie von Schilbach et al. auch, dass das TRAV26-2 Segment analog der Rekombination im Thymozyten mit einem 5'J-Segment rekombiniert war, was in Einklang mit der Rekombinationsaktivität dieses Locus ist. Analog dazu fanden wir in unseren Versuchen zweimal TRAV26-1 Segmente in Kombination mit TRAJ41 Segmenten rekombiniert, was die molekularen Eigenheiten dieses differenzierenden Progenitors exakt widerspiegelt. Es bestätigt die publizierten Daten, dass der Locus im V δ 1⁺ CD4⁺ Progenitor an dieser Stelle initial rekombiniert wird. Bemerkenswerterweise traten die im Locus 5' liegenden TRAV-Elemente auch alle später auf als TRAV26-1. TRAV26-1 zeigte eine über zwei Wochen nachgewiesene Persistenz. Außerdem zeigten die CDR3-Motifs der von Schilbach et al. (CI LRGSNSGYALN FGKGT) und in unserer Studie (CI VRVARSNSGYALN FGKG) detektierten V α 4B-Elemente eine Grad IV Konvergenz.¹⁴¹ Ein weiteres gemeinsames CDR3-Motif war das der V α 1A-Familie. Auch hier ergaben sich ähnliche Ladungsverhältnisse, wobei sich die Sequenzen der CDR3-Regionen in einigen Aminosäureresten unterschieden. Zwischen der von Schilbach et al. detektierten (CA VRDDTGRRALT FGSGT) und der von uns detektierten (CA VRDADTGFQKLV FGTG) Aminosäure-Sequenz der CDR3-Region besteht eine Grad IV Konvergenz. Interessanterweise zeigt auch die Studie von Miles et al. (2005) das CDR3-Motif „VRD“ (CA VRDFLLSGGYNK LIF (GB1-Clone)). Zur gesamten CDR3-Region besteht eine Grad I Konvergenz. Sowohl in der Studie von Miles et al. als auch in der von Schilbach et al. war ein, zu unserem zu 100% homologes, CDR3-Motif für die V α 6-Familie zu finden. Das CDR3-Motif des ELS3-Klons von Miles et al. (CA MREGGGGSNYK LTF) und K1-Klons von Schilbach et al., jeweils „MRE“ (CA MREGRFKAAGNKLT FGGGT), waren homolog zu dem von uns hier detektierten Motif „MRD“ (CA MRDLRDDKII FGKG). Dabei handelt es sich sowohl bei D als auch bei E um negativ geladene Aminosäuren. In diesen beiden Fällen handelt es sich um Grad I Konvergenzen der TCR α -Ketten.^{26,141}

Auch konnten wir für die TCR β -Ketten CDR3-Motifs finden, die denen von uns detektierten CDR3-Sequenzen ähnlich waren. Für die von Miles et al. identifizierten TCR β -Ketten TRBV28/CDR3/TRBJ2-1 fand sich überraschenderweise folgende Aminosäure-Sequenz: CA SSLIGRD EQFF (GB1-Clone).²⁶ Diese CDR3-Sequenz enthält ein Motif, das homolog zu dem von uns identifizierten TRBV30/CDR3/TRBJ2-

1 Motif des Spenders 2 (CA WSRLAGRS EQFF) ist. Dabei ist „I“ in „LIGR“ dem „A“ in „LAGR“ homolog, das heißt, dass es sich nur in einem Methylrest von „LAGR“ unterscheidet. Hierbei handelt es sich um eine Grad IV Konvergenz der TCRβ-Ketten. Die bei Spender 1 in Woche 4 detektierte CDR3-Sequenz CA SSDN EQFF (TRBV2/CDR3/TRBJ2-1) ist keine der bei HLA-B35⁺ Spendern nach EBV Infektion als „public“ bekannten TRBV-Sequenzen und ist damit einzigartig bzw. als private TCR-Komponente einzustufen.²⁵ In Tabelle 4-1 haben wir die Sequenzen aus den jeweiligen Studien im Direktvergleich mit den von uns detektierten Sequenzen aufgelistet und die Ladungsverhältnisse innerhalb der CDR3-Sequenzen per Farbkodierung dargestellt.

Tabelle 4-1 – Tabellarische Auflistung der CDR3-Motif-Sequenzen im Vergleich mit Sequenzen aus anderen Studien.^{26,141} Die CDR3-Motifs bzw. die identischen CDR3-Sequenzen wurden fett hervorgehoben. Zur Farbkodierung der Aminosäure-Ladungseigenschaften siehe Legende. Spalten von links nach rechts: Spalte 1: Vα-/Vβ-Familien; Spalte 2: jeweilige Studie aus der die Sequenzen stammen; Spalte 3: TCRα-/β-Ketten-Sequenz; Spalte 4: Gradeinteilung bzw. TCR-Klassifikation nach Miles.⁹

Vα/β-Familien (TRAV/TRBV-Segmente)	Studie	CDR3-Motif-Sequenzen			TCR-Klassifikation nach Miles
		V-Region	CDR3-Region	J-Region	
Vα4B (TRAV26)	diese Studie	CI	VRVARNSNGYALN	FGKG	Grad IV
	Schilbach et al.	CI	LRGSNSGYALN	FGKGT	
Vα1A (TRAV3)	diese Studie	CA	VRDADTGFQKLV	FGTG	Grad I
	Schilbach et al. (K1-Klon)	CA	VRDDTGRRALT	FGSGT	
	Miles et al. (GB1-Klon)	CA	VRDFLLSGGYNK	LIF	
Vα6 (TRAV14DV4)	diese Studie	CA	MRDLRDDKII	FGKG	Grad I
	Schilbach et al. (K1-Klon)	CA	MREGRFKAAGNKLT	FGGGT	
	Miles et al. (GB1-Klon)	CA	MREGGGGSNYK	LTF	
Vβ30 (TRBV30)	diese Studie	CA	WSRLAGRS	EQFF	Grad IV
Vβ3 (TRBV28)	Miles et al. (GB1-Klon)	CA	SSLIGRD	EQFF	

Ladungseigenschaften	Unpolar/hydrophob	Polar/neutral	basisch	sauer
----------------------	-------------------	---------------	---------	-------

Nach wie vor ist die physiologische Relevanz extrathymischer T-Zellreifung ein heiß diskutiertes und kontroverses Thema. Es gibt wenig Daten zum Anteil extrathymischer T-Zellreifung im gesunden Menschen, jedoch muss zumindest angenommen werden, dass extrathymische T-Zellreifung in Individuen eine Rolle spielt, die Thymus-defizient sind – entweder kongenital, posttraumatisch, postoperativ oder als Folge einer Strahlen- und/oder Chemotherapie. Nicht nur für diesen Patientenkreis scheint es von Bedeutung, die Faktoren, die die Induktion extrathymischer T-Zellreifung initiieren, aufzudecken, sondern auch für die Patienten, die durch Alter, schwere und chronische Infektionen oder fehlgesteuerte Immunität (Autoimmune Phänomene) defizitär in ihrer Immunantwort sind und mit diesem Wissen und Methoden der regenerativen Medizin in eine normale Immunität überführt werden könnten.

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass aus $\alpha\beta$ -depletierten, reinen $V\delta 1^+$ Zellkulturen die Generierung von $\alpha\beta^+$ T-Zellpopulationen möglich ist. Hierbei zeigte sich die initiale $CD4^+ V\delta 1^+$ Progenitor-Anzahl spenderspezifisch und war für die jeweiligen Spender sehr unterschiedlich. Es konnte gezeigt werden, dass für Peptid-gepulste Zellen eine Korrelation zwischen der initialen $CD4^+ V\delta 1^+$ Zellzahl und der im Zellkulturverlauf registrierten maximalen $\alpha\beta^+$ T-Zellzahl besteht, wohingegen diese Korrelation für nicht-Peptid-gepulste Zellen nicht gezeigt werden konnte.

Es wurden keine Epitop-spezifischen T-Zellen generiert. Die Generierung von $\alpha\beta^+$ T-Lymphozyten war unabhängig von Peptid-Induktion bei unterschiedlichen Spendern in unterschiedlichen Wochen zu beobachten. Dass Epitop-spezifische $\alpha\beta^+$ T-Zellpopulationen nicht detektierbar waren, deutet möglicherweise auf eine Negativselektion durch Affinität und damit periphere Toleranzmechanismen gegen das EBV-spezifische BZLF-1 an oder aber es liegt an der insgesamt niedrigen Ausgangszahl des Progenitors (<10.000). Da die TCR-Frequenz für definierte Epitop-spezifische TCRs bei 0.08% liegt, würden rein statistisch 10^6 Progenitoren nötig sein, um einen Epitop-spezifischen $\alpha\beta^+$ TCR detektierbar zu machen.

Aufgrund der von uns ermittelten complexity scores schien es wahrscheinlich, dass duale TCRs überproportional häufig entstanden sind. Andererseits konnten wir sehen, dass im Gegensatz zu den α -Ketten, die β -Ketten single peaks im Spectratype nicht direkt sequenzierbar waren und demnach polyklonalen Ursprungs sind. Das heißt, dass die α -Ketten der generierten $\alpha\beta^+$ TCRs eine hohe Diversität in ihrer CDR3-Länge aufweisen, während die β -Ketten längenrestringiert waren und einen geringen Polymorphismus der variablen Segmente aufwiesen. Möglicherweise spielt bei diesem von uns beobachteten Phänomen mit hoch diversen α -Ketten-Repertoires und längenrestringierten β -Ketten-Repertoires sterische Komponenten eine Rolle.

6 Literaturverzeichnis

1. *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2009.
2. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science (New York, N.Y.)*. 1999;286(5441):958–961.
3. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. Diversity of human alpha beta T cell receptors. *Science (New York, N.Y.)*. 2000;288(5469):1135.
4. Cabaniols JP, Fazilleau N, Casrouge A, Kourilsky P, Kanellopoulos JM. Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(9):1385–1390.
5. Schatz DG. Antigen receptor genes and the evolution of a recombinase. *Seminars in immunology*. 2004;16(4):245–256.
6. Lieber MR. Site-specific recombination in the immune system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(14):2934–2944.
7. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395–402.
8. Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. The generation and fate of thymocytes. *Seminars in immunology*. 1990;2(1):3–12.
9. Miles JJ, Douek DC, Price DA. Bias in the alphabeta T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. *Immunology and cell biology*. 2011;89(3):375–387.
10. Tynan FE, Borg NA, Miles JJ, et al. High resolution structures of highly bulged viral epitopes bound to major histocompatibility complex class I. Implications for T-cell receptor engagement and T-cell immunodominance. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(25):23900–23909.
11. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, et al. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science (New York, N.Y.)*. 1996;274(5285):209–219.
12. Ding YH, Smith KJ, Garboczi DN, Utz U, Biddison WE, Wiley DC. Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity*. 1998;8(4):403–411.

13. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*. 1996;384(6605):134–141.
14. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology*. 2006;24:419–466.
15. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annual review of immunology*. 1998;16:523–544.
16. Gorski J, Yassai M, Zhu X, et al. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1994;152(10):5109–5119.
17. Hohn H, Neukirch C, Freitag K, et al. Longitudinal analysis of the T-cell receptor (TCR)-VA and -VB repertoire in CD8+ T cells from individuals immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *Clinical and experimental immunology*. 2002;129(2):309–317.
18. Cibotti R, Cabaniols JP, Pannetier C, et al. Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(3):861–872.
19. Kim S-K, Cornberg M, Wang XZ, Chen HD, Selin LK, Welsh RM. Private specificities of CD8 T cell responses control patterns of heterologous immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(4):523–533.
20. Venturi V, Price DA, Douek DC, Davenport MP. The molecular basis for public T-cell responses? *Nature reviews. Immunology*. 2008;8(3):231–238.
21. Robins HS, Srivastava SK, Campregher PV, et al. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Science translational medicine*. 2010;2(47):47ra64.
22. La Gruta NL, Rothwell WT, Cukalac T, et al. Primary CTL response magnitude in mice is determined by the extent of naive T cell recruitment and subsequent clonal expansion. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(6):1885–1894.
23. Quigley MF, Greenaway HY, Venturi V, et al. Convergent recombination shapes the clonotypic landscape of the naive T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(45):19414–19419.
24. Gray PM, Parks GD, Alexander-Miller MA. High avidity CD8+ T cells are the initial population elicited following viral infection of the respiratory tract. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2003;170(1):174–181.

25. Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nature reviews. Immunology*. 2006;6(12):883–894.
26. Miles JJ, Elhassen D, Borg NA, et al. CTL recognition of a bulged viral peptide involves biased TCR selection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2005;175(6):3826–3834.
27. Stewart-Jones GBE, McMichael AJ, Bell JI, Stuart DI, Jones EY. A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nature immunology*. 2003;4(7):657–663.
28. Turner SJ, Kedzierska K, Komodromou H, et al. Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8+ T cell populations. *Nature immunology*. 2005;6(4):382–389.
29. Davis MM. The problem of plain vanilla peptides. *Nature immunology*. 2003;4(7):649–650.
30. Price DA, West SM, Betts MR, et al. T cell receptor recognition motifs govern immune escape patterns in acute SIV infection. *Immunity*. 2004;21(6):793–803.
31. Lehner PJ, Wang EC, Moss PA, et al. Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(1):79–91.
32. Kedzierska K, Turner SJ, Doherty PC. Conserved T cell receptor usage in primary and recall responses to an immunodominant influenza virus nucleoprotein epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(14):4942–4947.
33. Tynan FE, Elhassen D, Purcell AW, et al. The immunogenicity of a viral cytotoxic T cell epitope is controlled by its MHC-bound conformation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(9):1249–1260.
34. Kjer-Nielsen L, Clements CS, Brooks AG, et al. The structure of HLA-B8 complexed to an immunodominant viral determinant: peptide-induced conformational changes and a mode of MHC class I dimerization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2002;169(9):5153–5160.
35. Kjer-Nielsen L, Clements CS, Purcell AW, et al. A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity*. 2003;18(1):53–64.
36. Miles JJ, Borg NA, Brennan RM, et al. TCR alpha genes direct MHC restriction in the potent human T cell response to a class I-bound viral epitope. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2006;177(10):6804–6814.

37. Tynan FE, Burrows SR, Buckle AM, et al. T cell receptor recognition of a 'super-bulged' major histocompatibility complex class I-bound peptide. *Nature immunology*. 2005;6(11):1114–1122.
38. Tynan FE, Reid HH, Kjer-Nielsen L, et al. A T cell receptor flattens a bulged antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule. *Nature immunology*. 2007;8(3):268–276.
39. Argaet VP, Schmidt CW, Burrows SR, et al. Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(6):2335–2340.
40. Lim A, Trautmann L, Peyrat MA, et al. Frequent contribution of T cell clonotypes with public TCR features to the chronic response against a dominant EBV-derived epitope: application to direct detection of their molecular imprint on the human peripheral T cell repertoire. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2000;165(4):2001–2011.
41. Trautmann L, Labarriere N, Jotereau F, et al. Dominant TCR V alpha usage by virus and tumor-reactive T cells with wide affinity ranges for their specific antigens. *European journal of immunology*. 2002;32(11):3181–3190.
42. Annels NE, Callan MF, Tan L, Rickinson AB. Changing patterns of dominant TCR usage with maturation of an EBV-specific cytotoxic T cell response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2000;165(9):4831–4841.
43. Day EK, Carmichael AJ, ten Berge, Ineke J M, Waller ECP, Sissons JGP, Wills MR. Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2007;179(5):3203–3213.
44. Gillespie GMA, Stewart-Jones G, Rengasamy J, et al. Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity characterize a B*57-restricted immune response in HIV-1 infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2006;177(6):3893–3902.
45. Yu XG, Lichterfeld M, Chetty S, et al. Mutually exclusive T-cell receptor induction and differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 mutational escape associated with a two-amino-acid difference between HLA class I subtypes. *Journal of virology*. 2007;81(4):1619–1631.
46. Battaglia M, Gorski J. Overlap of direct and indirect alloreactive T-cell repertoires when MHC polymorphism is limited to the peptide binding groove. *Human immunology*. 2002;63(2):91–100.

47. O'keefe CL, Sobecks RM, Wlodarski M, et al. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental hematology*. 2004;32(10):1010–1022.
48. Ely LK, Green KJ, Beddoe T, et al. Antagonism of antiviral and allogeneic activity of a human public CTL clonotype by a single altered peptide ligand: implications for allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2005;174(9):5593–5601.
49. Fazilleau N, Delarasse C, Sweenie CH, et al. Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *European journal of immunology*. 2006;36(3):533–543.
50. Fazilleau N, Delarasse C, Motta I, et al. T cell repertoire diversity is required for relapses in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2007;178(8):4865–4875.
51. Menezes JS, van den Elzen P, Thornes J, et al. A public T cell clonotype within a heterogeneous autoreactive repertoire is dominant in driving EAE. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(8):2176–2185.
52. Davenport MP, Price DA, McMichael AJ. The T cell repertoire in infection and vaccination: implications for control of persistent viruses. *Current opinion in immunology*. 2007;19(3):294–300.
53. Miles JJ, Silins SL, Burrows SR. Engineered T cell receptors and their potential in molecular medicine. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(23):2725–2736.
54. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annual review of immunology*. 1993;11:637–685.
55. Kronenberg M. Antigens recognized by gamma delta T cells. *Current opinion in immunology*. 1994;6(1):64–71.
56. Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(6):2272–2279.
57. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunological reviews*. 2007;215:123–135.
58. Miyawaki T, Kasahara Y, Taga K, Yachie A, Taniguchi N. Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR-gamma/delta+ lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1990;171(5):1833–1838.

59. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science (New York, N.Y.)*. 1998;279(5357):1737–1740.
60. Janeway CA, JR, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunology today*. 1988;9(3):73–76.
61. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science (New York, N.Y.)*. 1994;266(5188):1253–1255.
62. Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V $\{\delta\}$ ²(neg) $\{\gamma\}\{\delta\}$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(10):1567–1578.
63. Kozbor D, Trinchieri G, Monos DS, et al. Human TCR-gamma⁺/delta⁺, CD8⁺ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(5):1847–1851.
64. Guo Y, Ziegler HK, Safley SA, Niesel DW, Vaidya S, Klimpel GR. Human T-cell recognition of *Listeria monocytogenes*: recognition of listeriolysin O by TcR alpha beta + and TcR gamma delta + T cells. *Infection and immunity*. 1995;63(6):2288–2294.
65. Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, Bruyn J de, Strober S. Isolation of CD4-CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature*. 1989;339(6221):226–229.
66. Matis LA, Fry AM, Cron RQ, Cotterman MM, Dick RF, Bluestone JA. Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer. *Science (New York, N.Y.)*. 1989;245(4919):746–749.
67. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(22):12445–12450.
68. Wu J, Groh V, Spies T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2002;169(3):1236–1240.
69. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(6):937–948.
70. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of

- MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(12):6879–6884.
71. Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunological reviews*. 2002;188:9–21.
 72. Xu B, Pizarro JC, Holmes MA, et al. Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(6):2414–2419.
 73. Cerwenka A, Lanier LL. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunological reviews*. 2001;181:158–169.
 74. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SH. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature*. 1993;365(6441):53–56.
 75. Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, Band H, Rea TH, Modlin RL. Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*. 1992;165(3):506–512.
 76. Follows GA, Munk ME, Gatrill AJ, Conradt P, Kaufmann SH. Gamma interferon and interleukin 2, but not interleukin 4, are detectable in gamma/delta T-cell cultures after activation with bacteria. *Infection and immunity*. 1992;60(3):1229–1231.
 77. Skeen MJ, Ziegler HK. Activation of gamma delta T cells for production of IFN-gamma is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;154(11):5832–5841.
 78. Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH. CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;154(4):1786–1796.
 79. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*. 1995;373(6511):255–257.
 80. Lang F, Peyrat MA, Constant P, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;154(11):5986–5994.

81. Munk ME, Gatrill AJ, Kaufmann SH. Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1990;145(8):2434–2439.
82. Subauste CS, Chung JY, Do D, et al. Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to *Toxoplasma gondii* in vitro and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(1):610–619.
83. Nishimura H, Emoto M, Hiromatsu K, et al. The role of gamma delta T cells in priming macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology*. 1995;25(5):1465–1468.
84. Kaufmann SH, Blum C, Yamamoto S. Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(20):9620–9624.
85. Viney JL, Dianda L, Roberts SJ, et al. Lymphocyte proliferation in mice congenitally deficient in T-cell receptor alpha beta + cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(25):11948–11952.
86. Jones B, Carding S, Kyes S, Mjolsness S, Janeway C, JR, Hayday A. Molecular analysis of T cell receptor gamma gene expression in allo-activated splenic T cells of adult mice. *European journal of immunology*. 1988;18(12):1907–1915.
87. Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki G, et al. A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(1):49–56.
88. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*. 1993;73(3):469–485.
89. Emoto M, Danbara H, Yoshikai Y. Induction of gamma/delta T cells in murine salmonellosis by an avirulent but not by a virulent strain of *Salmonella choleraesuis*. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(2):363–372.
90. Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the gamma/delta T-cell receptor. *Nature*. 1989;340(6230):239–241.
91. Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science (New York, N.Y.)*. 1989;244(4905):713–716.

92. Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SH. A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein. *The Journal of experimental medicine*. 1990;171(3):667–679.
93. Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SH, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *European journal of immunology*. 1990;20(5):1175–1179.
94. Sciammas R, Johnson RM, Sperling AI, et al. Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1994;152(11):5392–5397.
95. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, et al. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature*. 1989;339(6225):544–548.
96. Ohga S, Yoshikai Y, Takeda Y, Hiromatsu K, Nomoto K. Sequential appearance of gamma/delta- and alpha/beta-bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with *Listeria monocytogenes*. *European journal of immunology*. 1990;20(3):533–538.
97. Balbi B, Valle MT, Oddera S, et al. T-lymphocytes with gamma delta+ V delta 2+ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis. *The American review of respiratory disease*. 1993;148(6 Pt 1):1685–1690.
98. Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F, et al. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *European journal of immunology*. 1993;23(5):1177–1180.
99. Emoto M, Nishimura H, Sakai T, et al. Mice deficient in gamma delta T cells are resistant to lethal infection with *Salmonella choleraesuis*. *Infection and immunity*. 1995;63(9):3736–3738.
100. Falini B, Flenghi L, Pileri S, et al. Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1989;143(8):2480–2488.
101. Hara T, Mizuno Y, Takaki K, et al. Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in *Salmonella* infection. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(1):204–210.
102. Inoue T, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Nomoto K. Early appearing gamma/delta-bearing T cells during infection with Calmette Guerin bacillus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1991;146(8):2754–2762.

103. Russo DM, Armitage RJ, Barral-Netto M, Barral A, Grabstein KH, Reed SG. Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1993;151(7):3712–3718.
104. Sandor M, Sperling AI, Cook GA, Weinstock JV, Lynch RG, Bluestone JA. Two waves of gamma delta T cells expressing different V delta genes are recruited into schistosome-induced liver granulomas. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;155(1):275–284.
105. Scalise F, Gerli R, Castellucci G, et al. Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis. *Immunology*. 1992;76(4):668–670.
106. Sumida T, Maeda T, Takahashi H, et al. Predominant expansion of V gamma 9/V delta 2 T cells in a tularemia patient. *Infection and immunity*. 1992;60(6):2554–2558.
107. van der Heyde, H C, Elloso MM, Roopenian DC, Manning DD, Weidanz WP. Expansion of the CD4-, CD8- gamma delta T cell subset in the spleens of mice during non-lethal blood-stage malaria. *European journal of immunology*. 1993;23(8):1846–1850.
108. van der Heyde, H C, Elloso MM, Chang WL, Kaplan M, Manning DD, Weidanz WP. Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood-stage Plasmodium chabaudi adami malaria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;154(8):3985–3990.
109. Skeen MJ, Ziegler HK. Induction of murine peritoneal gamma/delta T cells and their role in resistance to bacterial infection. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(3):971–984.
110. Perera MK, Carter R, Goonewardene R, Mendis KN. Transient increase in circulating gamma/delta T cells during Plasmodium vivax malarial paroxysms. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(1):311–315.
111. Libero G de, Casorati G, Giachino C, et al. Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral gamma/delta T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(6):1311–1322.
112. Kabelitz D, Bender A, Prospero T, Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K. The primary response of human gamma/delta + T cells to Mycobacterium tuberculosis is restricted to V gamma 9-bearing cells. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(6):1331–1338.
113. Ohmen JD, Barnes PF, Uyemura K, Lu SZ, Grisso CL, Modlin RL. The T cell receptors of human gamma delta T cells reactive to Mycobacterium tuberculosis

- are encoded by specific V genes but diverse V-J junctions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1991;147(10):3353–3359.
114. Panchamoorthy G, McLean J, Modlin RL, et al. A predominance of the T cell receptor V gamma 2/V delta 2 subset in human mycobacteria-responsive T cells suggests germline gene encoded recognition. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1991;147(10):3360–3369.
115. Parker CM, Groh V, Band H, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *The Journal of experimental medicine*. 1990;171(5):1597–1612.
116. Fu YX, Roark CE, Kelly K, et al. Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1994;153(7):3101–3115.
117. Hisaeda H, Nagasawa H, Maeda K, et al. Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;155(1):244–251.
118. Rosat JP, MacDonald HR, Louis JA. A role for gamma delta + T cells during experimental infection of mice with *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1993;150(2):550–555.
119. van der Heyde, H C, Elloso MM, Chang WL, Kaplan M, Manning DD, Weidanz WP. Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood-stage *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;154(8):3985–3990.
120. Mixer PF, Camerini V, Stone BJ, Miller VL, Kronenberg M. Mouse T lymphocytes that express a gamma delta T-cell antigen receptor contribute to resistance to *Salmonella* infection in vivo. *Infection and immunity*. 1994;62(10):4618–4621.
121. Yamamoto S, Russ F, Teixeira HC, Conratt P, Kaufmann SH. *Listeria monocytogenes*-induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial gamma/delta T lymphocytes. *Infection and immunity*. 1993;61(5):2154–2161.
122. Penninger JM, Wen T, Timms E, et al. Spontaneous resistance to acute T-cell leukaemias in TCRV gamma 1.1J gamma 4C gamma 4 transgenic mice. *Nature*. 1995;375(6528):241–244.
123. Pannetier C, Cochet M, Darce S, Kourilsky P. Une methode de dosage quantitatif d'acides nucleiques par amplification enzymatique (methode PCR) a saturation. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*. 1992;315(7):271–277.

124. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annual review of immunology*. 1996;14:207–232.
125. Male D, Brostoff J, Gray A, Roitt I. *Immunology interactive 2.0*. St. Louis u.a.: Mosby; 1998. Mosby multimedia.
126. LaRocque R, Robinson MA. Diversity in the human T cell receptor beta chain. *Human immunology*. 1996;48(1-2):3–11.
127. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science (New York, N.Y.)*. 1996;272(5269):1755–1762.
128. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic immunology. Functions and disorders of the immune system*. 2nd ed., updated ed. 2006-2007. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2006.
129. Wilson RK, Lai E, Concannon P, Barth RK, Hood LE. Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunological reviews*. 1988;101:149–172.
130. Candeias S, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(5):989–1000.
131. Cochet M, Pannetier C, Regnault A, Darce S, Leclerc C, Kourilsky P. Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen. *European journal of immunology*. 1992;22(10):2639–2647.
132. Naumov YN, Naumova EN, Gorski J. CD4+ and CD8+ circulating alpha/beta T-cell repertoires are equally complex and are characterized by different levels of steady-state TCR expression. *Human immunology*. 1996;48(1-2):52–62.
133. Maslanka K, Piatek T, Gorski J, Yassai M. Molecular analysis of T cell repertoires. Spectratypes generated by multiplex polymerase chain reaction and evaluated by radioactivity or fluorescence. *Human immunology*. 1995;44(1):28–34.
134. Nilssen DE, Muller F, Oktedalen O, et al. Intraepithelial gamma/delta T cells in duodenal mucosa are related to the immune state and survival time in AIDS. *Journal of virology*. 1996;70(6):3545–3550.
135. Wesch D, Hinz T, Kabelitz D. Analysis of the TCR Vgamma repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals. *International immunology*. 1998;10(8):1067–1075.

136. Dechanet J, Merville P, Berge F, et al. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(1):1–8.
137. Hviid L, Kurtzhals JA, Adabayeri V, et al. Perturbation and proinflammatory type activation of V delta 1(+) gamma delta T cells in African children with Plasmodium falciparum malaria. *Infection and immunity*. 2001;69(5):3190–3196.
138. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(5):533–541.
139. Horiuchi T, Hirokawa M, Satoh K, Kitabayashi A, Muira AB. Clonal expansion of gammadelta-T lymphocytes in an HTLV-I carrier, associated with chronic neutropenia and rheumatoid arthritis. *Annals of hematology*. 1999;78(2):101–104.
140. King KY, Goodell MA. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nature reviews. Immunology*. 2011;11(10):685–692.
141. Ziegler H, Welker C, Sterk M, et al. Human Peripheral CD4(+) Vdelta1(+) gammadeltaT Cells Can Develop into alphabetaT Cells. *Frontiers in immunology*. 2014;5:645.
142. Zhou D, Srivastava R, Grummel V, Cepok S, Hartung H-P, Hemmer B. High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006;86(3):314–321.
143. Schuster FR, Hubner B, Fuhrer M, et al. Highly skewed T-cell receptor V-beta chain repertoire in the bone marrow is associated with response to immunosuppressive drug therapy in children with very severe aplastic anemia. *Blood cancer journal*. 2011;1(3):e8.
144. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature immunology*. 2004;5(2):133–139.
145. Baccala R, Witherden D, Gonzalez-Quintal R, et al. Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2005;174(8):4606–4612.

146. French JD, Roark CL, Born WK, O'Brien RL. Gammadelta T lymphocyte homeostasis is negatively regulated by beta2-microglobulin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2009;182(4):1892–1900.
147. McClory S, Hughes T, Freud AG, et al. Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(4):1403–1415.
148. Dejbakhsh-Jones S, Jerabek L, Weissman IL, Strober S. Extrathymic maturation of alpha beta T cells from hemopoietic stem cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1995;155(7):3338–3344.
149. Garcia-Ojeda ME, Dejbakhsh-Jones S, Chatterjea-Matthes D, et al. Stepwise development of committed progenitors in the bone marrow that generate functional T cells in the absence of the thymus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2005;175(7):4363–4373.
150. Arcangeli M-L, Lancrin C, Lambomez F, et al. Extrathymic hemopoietic progenitors committed to T cell differentiation in the adult mouse. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2005;174(4):1980–1988.
151. Maillard I, Schwarz BA, Sambandam A, et al. Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood*. 2006;107(9):3511–3519.
152. Maillard I, Schwarz BA, Sambandam A, et al. Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood*. 2006;107(9):3511–3519.
153. Rooney CM, Rowe DT, Ragot T, Farrell PJ. The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *Journal of virology*. 1989;63(7):3109–3116.
154. Takada K, Shimizu N, Sakuma S, Ono Y. trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *Journal of virology*. 1986;57(3):1016–1022.
155. Countryman J, Miller G. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(12):4085–4089.
156. Chevallier-Greco A, Manet E, Chavrier P, Mosnier C, Daillie J, Sergeant A. Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *The EMBO journal*. 1986;5(12):3243–3249.

157. Moss PA, Moots RJ, Rosenberg WM, et al. Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(20):8987–8990.



Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach-Stückle durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach-Stückle, Marco Sterk, Christian Welker und Katja Sonntag von mir eigenständig mit Unterstützung durch die genannten Labormitglieder durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach-Stückle verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den
