

Komparative Analyse der CDR3-Region einer $\alpha\beta$
Progenitorpopulation und den daraus entstandenen $\alpha\beta$ T-Zellen
insbesondere resultierend durch die Stimulation mit Tumor- und
Virus-spezifischen Peptiden

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Marco H. Sterk
aus Villingen-Schwenningen

Tübingen
2018

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

20.07.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Karin Schilbach

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Zusammenfassung

Tumor-spezifische T-Zellen, die definierte Epitope auf dem Tumor von Patienten erkennen, finden bereits seit mehreren Jahren therapeutische Anwendung. Durch ihre Spezifität ist ihre Gabe mit einem hohem anti-tumoralem Effekt und geringen Nebenwirkungen verbunden. Durch die Generierung von T-Zellen, die Gewebe-spezifisch exprimierte Epitope erkennen, kann die zytolytische Wirkung ebenfalls gezielt auf ein Gewebe beschränkt werden. Nach Chemotherapie und Transplantation kann durch sie das Risiko eines Rezidivs gesenkt oder gar ganz vermieden werden. Da die T-Zellen spezifisch sind, können sie beispielsweise auch von einem haploidenten oder MUD (matched unrelated donor) Spender generiert werden. Nicht nur bei Tumorerkrankungen, auch bei Virusinfektionen wie z.B. ADV, CMV, EBV oder HIV spielen spezifische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunkompetenz und damit für immunsupprimierte Patienten. Auf molekularer Ebene lassen sich T-Zellen anhand ihrer verwendeten TCR-Segmente und ihrer einzigartigen CDR3-Region diskriminieren, ebenso wie durch die selektive Bindung an Epitop beladene Tetramere. In wenigen Fällen werden Gemeinsamkeiten, bzw. idente TCRs bei nicht-verwandten Individuen beobachtet, die man als public TCRs bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Validierung von in silico identifizierten Hämatopoese-restringierten potentiell immunogenen Epitopen initial naive, Antigen-unerfahrene CD45RO- CD8+ T-Zellen eingesetzt. Da keines der untersuchten Epitope bei verschiedensten jeweils Epitop-HLA-gematchten Spendern mit entsprechender SNP Konstellation eine T-Zellantwort induziert werden konnte, wurden Bulk V δ 1+ T-Zellkulturen oder V δ 1+ CD4+ T-Zellklone zur Generierung von Virus-spezifischen $\alpha\beta$ T-Zellen verwendet. Ihre Differenzierung in der Kultur mit verschiedenen Virus- und Tumor-Peptid gepulsten autologen Feederzellen wurde gemonitort und die Transdifferenzierung zu $\alpha\beta$ T-Zellen auf molekularer und zellbiologischer Ebene dokumentiert sowie ihre Spezifität untersucht. Da V δ 1+ CD4+ T-Zellklone das Potential eines $\alpha\beta$ T-Zellprogenitors besitzen, wurden sowohl die CDR3-Region der eingesetzten Klone als auch die der transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen per Direktsequenzierung identifiziert. Keiner der Versuchsansätze konnte Tetramer-bindende Epitop-spezifische T-Zellen generieren.

Die Diversität der jeweiligen CDR3-Sequenzen, die die generierten T-Zellen zeigten, war jedoch unerwartet hoch. Interessanterweise waren sie zwar für das eingesetzte Peptid nicht spezifisch, jedoch wiesen sie überraschend häufig Gemeinsamkeiten mit CDR3-Regionen Tumor- oder Viruspeptid-spezifischer publizierter TCRs auf. Damit kann ein erheblicher Anteil an generierten und identifizierten TCRs der transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen als public deklariert werden. Um diesen Versuchsansatz für die Anwendung in der Klinik zur Generierung epitopspezifischer T-Zellen einsetzbar machen zu können muss jedoch die Progenitorfrequenz deutlich erhöht werden, damit die statistische Wahrscheinlichkeit

gegeben ist, dass verlässlich ein $\alpha\beta$ TCR generiert wird, der das eingesetzte Peptid erkennen kann. Begleitend dazu wurden funktionelle Studien zur Identifikation des Triggers der Transdifferenzierung durchgeführt. Dabei konnten $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklone alleine oder im Kontext mit DN und $CD8+$ $V\delta 1+$ T-Zellen erneut erfolgreich unter Standardkulturbedingungen zu $\alpha\beta$ T-Zellen transdifferenziert werden. Ein formeller Beweis bzw. der ausschlaggebende Parameter, der diese Differenzierung induziert, konnte aber in dieser Arbeit erneut nicht identifiziert werden. Untersuchungen der Ligandenbindenden Region der $V\delta 1$ TCRs der $CD4+$ Klone zeigten in den nicht Keimbahn-kodierten CDR3-Regionen der δ -Ketten teilweise identische Sequenzen in unterschiedlichen Probanden.

Danksagung

Mein Dank gilt folgenden Professoren, die mich während meiner Dissertation und auch der vorhergehenden Diplomarbeit immer unterstützt haben: Professorin Karin Schilbach und Professor Hans-Georg Rammensee. Für die Überlassung des Themas und grundlegende Ideen bedanke ich mich überaus bei Professorin Schilbach. Mit ihr konnte ich die Ergebnisse stundenlang diskutieren und bin ihr überaus dankbar für die eins zu eins Betreuung, die auch über die Zeit meiner Experimente in Tübingen hinausging. Professor Rammensee hatte stets ein offenes Ohr für Fragen seiner Doktoranden und half mit seiner Expertise und konstruktiven Vorschlägen diese Arbeit voran zu treiben.

Der Jürgen-Manchot-Stiftung möchte ich für das gewährte Stipendium und die damit verbundene finanzielle Förderung dieses Promotionsvorhabens danken.

Meinen drei Kondoktoranden Hendrik Ziegler, Jan Haarer und Christian Welker möchte ich für die förderlichen Gespräche und Zusammenarbeit danken. Nicht nur im Labor, auch in Freizeit waren wir ein tolles Team und haben uns ausgezeichnet ergänzt.

Meinen Eltern, Siglinde und Holger Sterk, möchte ich auch für die Unterstützung in der Zeit meiner Dissertation danken. Im Elternhaus im Schwarzwald war es möglich auch einmal abzuschalten und zu entspannen.

Ich bin sehr glücklich darüber meine damalige Freundin und zukünftige Frau Leona in dieser Zeit an meiner Seite zu haben. Ohne ihre Ratschläge und motivierenden Tritte in den Allerwertesten wäre diese Arbeit nicht fertiggestellt worden.

Ebenfalls nicht vergessen möchte ich meine Schwiegereltern in spe, Angelika und Roland Steinack, für Ihre moralische und kulinarische Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und Bundesbrüdern danken, die mich in der Zeit des Studiums und der Promotion begleitet haben.

Bisherige wissenschaftliche Publikationen:

- Blank, G., Welker, C., Haarer, J., Sterk, M., Nadalin, S., Yañez, V. A. C., Schilbach, K. (2015). Selective, efficient modulation of activated CD4+ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR. *Bone Marrow Transplantation*, 50(3), 390–401. <http://doi.org/10.1038/bmt.2014.263>
- Schilbach, K., Alkhaled, M., Welker, C., Eckert, F., Blank, G., Ziegler, H., Sterk, M., Handgretinger, R. (2015). Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma by senescence induction and myogenic differentiation. *Oncotarget*, 4(7), e1014760. <http://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1014760>
- Ziegler, H., Welker, C., Sterk, M., Haarer, J., Rammensee, H.-G., Handgretinger, R., & Schilbach, K. (2014). Human Peripheral CD4(+) V δ 1(+) $\gamma\delta$ T Cells Can Develop into $\alpha\beta$ T Cells. *Frontiers in Immunology*, 5, 645. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00645>
- Hashimoto, H., Sterk, M., & Schilbach, K. (2017). CD28neg. T lymphocytes of a melanoma patient harbor tumor immunity and a high frequency of germline-encoded and public TCRs. *Immunologic Research*. <http://doi.org/10.1007/s12026-017-8976-1>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das MHC-System	2
1.2.	Entstehung von T-Zellen.....	3
1.3.	Entstehung der Diversität.....	4
1.4.	Der T-Zellrezeptor.....	6
1.5.	Klassifizierung und Effektorfunktionen von $\alpha\beta$ T-Zellen	7
1.5.1.	CD4+ T-Zellen	8
1.5.2.	CD8+ T-Zellen	9
1.5.3.	Doppelt-negative CD4- CD8- $\alpha\beta$ T-Zellen	9
1.5.4.	Doppelt-positive CD4+ CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen.....	9
1.6.	$\gamma\delta$ T-Zellen	10
1.7.	Public TCRs.....	10
1.8.	T-Zellen in immuntherapeutischer klinischer Anwendung	11
1.9.	Zielsetzung	12
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Material	15
2.2.	Immunologische Methoden.....	21
2.2.1.	Die magnetaktivierte Zellseparation (MACS)	21
2.2.2.	Die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)	23
2.2.3.	Zellkulturen	24
2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Validierung der Hämatopoese-restringierten SNPs.....	36
3.2.	Expansion von SNP-spezifischen CD8+ T-Zellen	37
3.3.	Bulk V δ 1-Kulturen.....	40

3.4.	Isolation von V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen	41
3.4.1.	Kultivierung von Bulk V δ 1 T-Zellen mit allogenen und autologen Feederzellen.....	41
3.4.2.	Verwendung α -CD3/ CD28 stimulierter PBMNCs als Feederzellen.....	41
3.4.3.	Expression von MICA/B auf den verwendeten Feederzellen.....	42
3.4.4.	Blockieren von Oberflächenmolekülen auf den verwendeten Feederzellen ...	43
3.5.	Generierung Peptid-spezifischer $\alpha\beta$ T-Zellen aus Bulk V δ 1 T-Zellkulturen.....	45
3.5.1.	Depletion der PBMCs von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen	46
3.5.3.	Isolation der TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen	48
3.5.4.	Expansion BZLF-1 spezifischer T-Zellen	49
3.5.5.	Analyse des TRBV-Repertoires im FACS	51
3.5.6.	Analyse des TRAV- und TRBV-Repertoires der kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen per Spectratype-PCR.....	54
3.5.7.	Sequenzierung der Single Peaks in TRAV- und TRBV-Segmenten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen kultiviert mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen	56
3.5.8.	Sequenzierung der Single Peaks in TRAV- und TRBV-Segmenten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen kultiviert mit unstimulierten Feederzellen	59
3.5.9.	Expansion pp65-spezifischer T-Zellen aus TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen.....	59
3.6.	Charakterisierung V δ 1+ CD4+ T-Zellen.....	61
3.6.1.	Isolation von V δ 1+ CD4+ T-Zell-Klonen.....	62
3.6.2.	Transdifferenzierung von V δ 1+ CD4+ $\gamma\delta$ T-Zellen zu $\alpha\beta$ T-Zellen	62
3.6.3.	Sequenzierung der CDR3-Region	64
3.6.4.	Analyse der γ -Ketten von V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen	66
3.6.5.	Analyse der C-Region von V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen	67
3.6.6.	Analyse der TRAV- und TRBV-Segmente von V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen	67
3.6.7.	Sequenzierung der TRAV- und TRBV-Produkte der transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen	68
3.6.8.	Expression T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren	68

3.7.	CD28- T-Zellen im Peripherblut der Probanden	69
3.7.1.	Isolation von TCR $\alpha\beta$ + CD28- CD4+ und CD28- CD8+ T-Zellen.....	70
3.7.2.	Analyse des TRAV- und TRBV-Repertoires der CD28+ Fraktion.....	72
3.7.3.	Analyse des TRAV- und TRBV-Repertoires im CD28- Kompartiment.....	73
3.7.4.	Sequenzen der CDR3-Region von CD28- T-Zellen.....	76
3.7.5.	CDR3-Sequenzen der TRBV-Segmente nach V β J β -PCR	79
3.7.6.	Identische CDR3-Sequenzen der TRAV-Segmente in der CD28+ und CD28- Population	80
4.	Diskussion	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (A) Schematischer Aufbau des Locus des MHC-Genclusters auf Chromosom 6, gezeigt sind nur die häufigsten MHC I und II Gene; (B) Anzahl der bekannten Allele pro MHC Gen (Stand 2014, Quelle: Immuno Polymorphism Database); (C) Aufbau des MHC I und MHC II Heterodimers.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der VDJ-Rekombination der β -Kette des TCR, die dunklen Bereiche zwischen D-J und V-DJ sind N-Nukleotide, die durch das Enzym TdT zufällig eingefügt werden.....	5
Abbildung 3: Verwendeter DNA-Längenstandard im Agarosegel.....	19
Abbildung 4: Verschiedene Möglichkeiten zur magnetaktivierten Zellseparation; A) direkt, B) indirekt und C) Chromophoranreicherung	21
Abbildung 5: Nukleotidsequenzen zweier zu untersuchender Gene eines HLA-A*02+ Probanden (A) TRAF3IP3: der Pfeil markiert die Position des SNPs, deutlich zu erkennen ist die Überlagerung der Signale von Guanin und Thymin (B) BTN3A1: keine Überlagerung der Sequenz zu erkennen, Gen liegt homozygot in seiner nicht-immunogenen Variante vor.	37
Abbildung 6: FACS zur Reinheitsprüfung der zur Expansion eingesetzten T-Zellen, nach CD8-Isolation und CD45RO-Depletion, beispielhaft gezeigt für einen Probanden	39
Abbildung 7: (A) Expression von CD137+ und (B) MHC-Pentamer spezifischen CD8+ T-Zellen nach vier Wochen Kultivierung mit einem HLA-A*02 assoziierten SNP-Peptid gepulsten Feederzellen, exemplarisch gezeigt für einen Probanden	40
Abbildung 8: FACS-Dot Blots zur Überprüfung der Reinheit von $V\delta 1+$ $\gamma\delta$ T-Zellen nach Isolation, exemplarisch gezeigt für einen Probanden.....	41
Abbildung 9: Expression verschiedener Oberflächenmoleküle bei (A) unstimulierten Feederzellen und (B) mit α CD3/CD28 Beads stimulierten Feederzellen jeweils nach 24 Stunden Kultivierung.	42
Abbildung 10: MICA/B-Expression von unstimulierten und α -CD3/CD28 stimulierten Feederzellen nach 24h, sowie Charakterisierung der MICA/B+ Zellen nach CD4 – CD8 und CD14 – CD19.....	43
Abbildung 11: Auswirkungen der Blockierung von MHC I und MHC II auf die Korezeptorexpression von Bulk $V\delta 1$ T-Zellen (n=1).....	44
Abbildung 12: Einfluss der Blockierung von α -DII4 auf (A) die Transdifferenzierung von $\alpha\beta$ T-Zellen aus Bulk $V\delta 1$ T-Zellkulturen und (B) die Expression von CD4 und CD8 (n=2)	44
Abbildung 13: Entstehung von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen aus Bulk $V\delta 1+$ T-Zellen bei zwei unterschiedlichen Probanden, verglichen wurden die Auswirkungen von 3/28 stimulierten und α -MICA/B geblockten Feederzellen, als Kontrolle diente ein Ansatz mit unstimulierten Feederzellen.	45

Abbildung 14: Dot Blot zur Überprüfung der Effizienz der TCR $\alpha\beta$ T-Zelldepletion, es verbleiben auch nach zweimaliger Depletion TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen in der Population (~1,6%)...	46
Abbildung 15: (A) Expansion der TCR $\alpha\beta$ - Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen, kultiviert wurden die TCR $\alpha\beta$ - Zellen entweder mit ADV-Hexon gepulsten, BZLF-1 gepulsten oder unstimulierten Feederzellen; (B) Dot Blots der TCR $\alpha\beta$ + und V δ 1+ positiven Fraktion an Tag 2, 5 und 10 des Experimentes.	47
Abbildung 16: Korezeptorexpression der entstandenen TCR $\alpha\beta$ T-Zellen an Tag 10 in den drei Ansätzen.	48
Abbildung 17: Effizienz der TCR $\alpha\beta$ T-Zelldepletion und V δ 1-Anreicherung per MACS.....	49
Abbildung 18: (A) Entstehung TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen über die Dauer des Experimentes; (B) FACS-Abbildungen der Expansion von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen bei Kultivierung mit BZLF-1 stimulierten und unstimulierten Feeder-Zellen, gezeigt für Woche 1, 2, 4 und 8.	50
Abbildung 19: Detektion von CD8+ Tetramer-spezifischen T-Zellen in Woche 4 der Kultivierung; gezeigt für einen HLA-B*3501 negativen Probanden, TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen inkubiert mit unstimulierten und BZLF-1 gepulsten Feederzellen.....	51
Abbildung 20: Expression der Korezeptormoleküle CD4 und CD8 bei TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen in Woche 8, kultiviert entweder mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen (oben) oder ungepulsten Feederzellen (unten).	51
Abbildung 21: Dot Blots der TRBV-Segmente der TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellkultur in Woche 8, (A) BZLF-1 gepulste Feeder (B) unstimulierte Feeder, gezeigt für einen Probanden.....	53
Abbildung 22: Expression der TRBV-Segmente der V δ 1+ TCR $\alpha\beta$ - T-Zellen in Woche 8 gemessen im FACS, angefärbt mit dem TCR V β Repertoire Kit von Beckman Coulter. (A) + BZLF-1 gepulste Feeder (B) unstimulierte Feeder.....	54
Abbildung 23: Anzahl exprimierter Segmente und Complexity Scores der (A) α - und (B) β - Ketten von TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen kultiviert mit BZLF-1 gepulsten oder unstimulierten Feederzellen über einen Zeitraum von acht Wochen.....	56
Abbildung 24: TRAV- und TRBV-Expression gezeigt durch Spectratype-PCR und Fragmentlängenanalyse von TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 5 (TRAV) bzw. Woche 2 (TRBV) kultiviert mit A) BZLF-1 gepulsten Feederzellen und B) unstimulierten Feederzellen	57
Abbildung 25: V α - und V β -Repertoire von transdifferenzierten TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen nach Kultivierung mit pp65 gepulsten, autologen Feederzellen, gezeigt als (A) Spectratype und (B) tabellarisch.	60
Abbildung 26: (A) CDR3-Sequenzen der Single Peaks von TRAV- und TRBV-Segmenten der transdifferenzierten TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen nach dreimaliger Stimulation mit pp65 gepulsten, autologen Feederzellen; (B) FACS-Dot Blot der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen auf Expression von V α 24/V β 11	61

Abbildung 27: (A) Prozentualer Anteil V δ 1+ CD34+ Zellen im Peripherblut von 6 gesunden Probanden; (B) Expression von CD3, CD4, CD4/CD8 und CD8 bei V δ 1+ CD34+ T-Zellen. .62	
Abbildung 28: FACS-Analyse der V δ 1+ CD4+ T-Zellklone nach drei Wochen Kultivierung; (A) nicht transdifferenzierte V δ 1+ T-Zellklone, die CD4+ (schwarz) oder nur teilweise CD4+ bzw. doppelt negativ sind. (B) in unterschiedlichen Maße zu TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen transdifferenzierte V δ 1+ T-Zellklone (n=2).....63	63
Abbildung 29: Charakteristische Größen der Single Peaks von V δ 1 CD4 T-Zellklonen bei Proband V64	64
Abbildung 30: V γ -Spectratype sechs unterschiedlicher V δ 1+ CD4+ T-Zellklone von Proband V66	66
Abbildung 31: Alignment der C γ -Produkte von drei V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen von Proband C mit den Sequenzen des C γ 1- und C γ 2-Segments.67	67
Abbildung 32: Quantitative Realtime PCR Messungen von sechs unterschiedlichen V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen (n=6) (A) Expression von T-Zellpopulation-spezifischen Transkriptionsfaktoren GATA-3, T-bet, FoxP3 und RORC; (B) Expression der T-Zellentwicklungsmarker RAG-1, TdT und preTalpha (n=6)69	69
Abbildung 33: (A) Gatingstrategie für CD28+ und CD28- T-Zellen innerhalb der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen, exemplarisch gezeigt für einen Probanden; B) CD4- / CD8-Expression bei CD28+ (grau) und CD28- (schwarz) T-Zellen, deutlich erkennbar ist die umgekehrte Expression der Korezeptoremoleküle der Populationen; C) Prozentsatz der CD28+ (86,4% \pm) und CD28- (13,6% \pm) TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen der Probanden (n=4); D) Erhöhte CD4-Expression bei CD28+ gegenüber einer erhöhten CD8-Expression bei den CD28- (n=4).....70	70
Abbildung 34: Isolierte Fraktionen aus den Lymphozyten eines Probanden (P2), zu sehen ist oben die CD28+ Fraktion und unten die CD28- Fraktionen innerhalb der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen.71	71
Abbildung 35: TRAV- und TRBV-Expression gezeigt durch Spectratype-PCR und Fragmentlängenanalyse in A) CD28+ CD4+ und B) CD28+ CD8+ T-Zellen, exemplarisch gezeigt für einen Probanden.....72	72
Abbildung 36: Gegenüberstellung der Anzahl und des Complexity Scores variabler Segmente bei CD28+ und CD28- T-Zellen (n=3), gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM sowie deren Verhältnisse. (A) variable Segmente: CD28+ Kompartiment TRAV = 58,3 \pm 5,2, TRBV = 46,7 \pm 1,7; CD28- Kompartiment TRAV = 34,7 \pm 6,5, TRBV = 20,3 \pm 11,5.....74	74
Abbildung 37: TRAV- und TRBV-Expression gezeigt durch Spectratype-PCR und Fragmentlängenanalyse in A) CD28- CD4+ und B) CD28- CD8+ T-Zellen, exemplarisch dargestellt für einen Probanden.....76	76
Abbildung 38: 2% Agarosegel mit den jeweiligen TRBV12-3/TRBJ1- (oben) und TRBV12-3/TRBJ2-Produkten der CD28- CD4+ T-Zellen von Proband 1. Deutlich zu sehen sind die	

Banden von TRBJ1-5 und TRBJ1-6 bei ca. 300 Bp, schwach erkennbar die Banden von TRBJ2-1 und TRBJ2-5 ebenfalls bei ca. 300Bp.....	79
Abbildung 39: 2% Agarosegel mit den jeweiligen TRBV12-3/TRBJ1- (oben) und TRBV12-3/TRBJ2-Produkten der CD28-CD4+ T-Zellen von Proband 4. Deutlich zu sehen ist die Bande von TRBJ1-5 bei ca. 300 Bp, auch erkennbar die Banden von TRBJ1-1, 2-1, 2-5 und TRBJ2-7 ebenfalls bei ca. 300Bp.	80
Abbildung 40: Identische Single Peaks im CD28- und CD28+ CD8+ Kompartiment bei Proband 1.....	81
Abbildung 41: Identische Single Peaks von TRAV-Segmenten im CD28- und CD28+ CD8+ sowie CD4+ Kompartiment bei Proband 2.....	81
Abbildung 42: Identische Single Peaks im CD28- und CD28+ CD8+ sowie CD4+ Kompartiment bei Proband 1.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der zurzeit bekannten, funktionellen V-, D-, J- und C-Segmente im humanen Genom.....	6
Tabelle 2: Liste der verwendeten Primär-Antikörper für die FACS Analyse	20
Tabelle 3: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper für die FACS Analyse.....	20
Tabelle 4: Liste der Antikörper für die Isotyp-Kontrollen in der FACS Analyse.....	20
Tabelle 5: Liste der verwendeten Blocking-Antikörper für funktionelle Assays	21
Tabelle 6: Sequenzen der im V α -Spectratype verwendeten Primer, einschließlich der Zuordnung ihres TRAV-Segments.....	30
Tabelle 7: Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Programm des V α -Spectratypes	30
Tabelle 8: Sequenzen der Primer für das V β -Spectratype, einschließlich der Zuordnung ihres TRBV-Segmentes	31
Tabelle 9: Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Programm des V β -Spectratypes	32
Tabelle 10: Sequenzen der Primer für die J β -PCR, einschließlich der Zuordnung ihres TRBJ-Segmentes	32
Tabelle 11: Sequenzen der zur Differenzierung von Cy1- und Cy2-Segmentes eingesetzten Primer	33
Tabelle 12: Sequenzen der Primer für die β -Aktin PCR	33
Tabelle 13: Mastermix und Bedingungen der mit SYBR Green durchgeführten Realtime PCRs.....	34
Tabelle 14: Mastermix und Bedingungen für einen Sequenzierungsansatz	35
Tabelle 15: HLA-Allele und Zielgene der sieben gesunden Spender zur Expansion SNP-spezifischer T-Zellen	37
Tabelle 16: Auflistung der gewählten 16 Gene, inklusive HLA-Restriktion, Bindungswert und Aminosäuresequenz der natürlich vorkommenden und der SNP-Aminosäuresequenz.....	38
Tabelle 17: Gebrauch variabler Segmenten von TCR α - und TCR β -Ketten bei TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen über den Zeitraum des Versuches, kultiviert mit BZLF-1 gepulsten oder unstimulierten Feederzellen.....	55
Tabelle 18: CDR3-Sequenzen der TRAV-Segmente von mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 1, 2 und 4.....	58
Tabelle 19: CDR3-Sequenzen der TRBV-Segmente von mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 2 und 8.....	58
Tabelle 20: CDR3-Sequenzen der TRAV-Segmente von mit unstimulierten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 3 und 4.....	59
Tabelle 21: CDR3-Sequenz der TRBV-Segmente von mit unstimulierten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 8.....	59

Tabelle 22: FACS-Analyse und Spectratype-Ergebnis der V δ 1+ CD4+ T-Zellklone von Proband V, getestet wurden die Expression von CD4, TCR $\alpha\beta$ und die Expression der V δ 1-Kette.....	63
Tabelle 23: Aminosäuresequenzen der CDR3-Region von V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen von drei unterschiedlichen Probanden (C, V und K).....	65
Tabelle 24: CDR3-Sequenzen der V δ 1-PCR Produkte von Bulk V δ 1 CD4 Kulturen der Probanden C, V und K.....	65
Tabelle 25: V γ -Kettenexpression unterschiedlicher V δ 1+ CD4+ T-Zellklone eines Probanden in Zusammenhang mit ihrer spezifischen V δ 1-CDR3 Sequenz.....	66
Tabelle 26: TRAV- und TRBV-Segmente der transdifferenzierten V δ 1+ CD4+ T-Zellklone V15, V8 und V32.	68
Tabelle 27: CDR3-Sequenzen von TRBV7-2 und 21-1 der aus dem V δ 1+ CD4+ T-Zellklon V32 entstandenen TCR $\alpha\beta$ T-Zellen	68
Tabelle 28: Gebrauch variabler Segmenten von (A) TCR α -, (B) TCR β -Ketten sowie (C) Complexity Scores bei CD 28+ CD4+ und CD8+ T-Zellen der drei Probanden, dargestellt für CD4+ (grau) und CD8+ (schwarz)	73
Tabelle 29: Gebrauch variabler Segmenten von TCR α - und TCR β -Ketten sowie Complexity Scores bei CD 28- CD4+ und CD8+ T-Zellen der drei Probanden, dargestellt für CD4+ (grau) und CD8+ (schwarz).....	75
Tabelle 30: Tab. CDR3-Sequenzen der TRAV-Produkte der CD28- CD8+ und CD28- CD4+ T-Zellen von Proband 2.....	77
Tabelle 31: CDR3-Sequenzen der TRAV-Produkte der CD28- CD8+ T-Zellen von Proband 1.....	78
Tabelle 32: CDR3-Sequenzen der TRAV-Produkte der CD28-CD8+ und CD28- CD4+ T-Zellen von Proband 4	78
Tabelle 33: CDR3-Sequenzen der TRBV-Produkte der CD28-CD8+ T-Zellen von Proband 2.....	78
Tabelle 34: CDR3-Sequenzen der TRBV12-3-Produkte der CD28-CD4+ T-Zellen von Proband 1 nach V β J β -PCR	79
Tabelle 35: CDR3-Sequenz der TRBV12-3-Produkte der CD28-CD4+ T-Zellen von Proband 4 nach V β J β -PCR	80

1. Einleitung

Das menschliche Immunsystem ist ein äußerst komplexes Konstrukt, das den Organismus vor den Myriaden von Krankheitserregern schützt, denen er ein Leben lang ausgesetzt ist. Es gliedert sich in die angeborene Immunität, die bereits niedere Lebensformen besitzen, und die adaptive Immunität, die über die Jahrmillionen von den Wirbeltieren entwickelt wurde. Die angeborene Immunität setzt sich zusammen aus mechanischen Barrieren, die sich dort befinden wo der Körper in Kontakt mit Pathogenen kommt. Dazu gehören die Epithelschichten der Haut und der auf ihr befindliche Schleimfilm, der Speichel in der Mundhöhle, die Schleimhäute, die Magensäure, die Tränenflüssigkeit der Augen und die Flimmerhärchen in den Epithelien der Atemwege. Das angeborene Immunsystem vermittelt auch eine zellbasierte Immunantwort, an der Granulozyten (neutrophil, basophil, eosinophil), Makrophagen und Natürliche Killer- (NK-) Zellen beteiligt sind und Krankheitserreger per Phagozytose oder im Falle von NK-Zellen durch Zellkontakt unschädlich machen. Des Weiteren sezernieren NK-Zellen verschiedene Zytokine und andere Moleküle, lösen damit inflammatorische Prozesse und die Kaskade des Komplementsystems aus. Die angeborene Immunabwehr wird auch als „First Line of Defense“ bezeichnet. Die adaptive Immunantwort passt sich der Bedrohung durch Pathogene an und kann flexibler und dynamischer reagieren. Sie ersetzt dabei nicht die angeborene Immunantwort sondern interagiert mit ihr und ergänzt diese. Dabei stehen der adaptiven Immunität unterschiedliche Zell-Typen wie B-Zellen, T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen (APCs) zur Verfügung. Man unterscheidet zwischen humoraler und zellulärer Antwort: Bei der humoralen Antwort reifen B-Zellen zu Plasmazellen, welche spezifische Antikörper gegen das Antigen produzieren. Diese Antikörper binden und immobilisieren den Krankheitserreger und können von Makrophagen phagozytiert werden. Die zelluläre Antwort hingegen beinhaltet die Reaktion der T-Zellen, deren Reaktionen äußerst komplex sind. Körperfremde Proteine werden von APCs aufgenommen, im Proteasom aufgespalten und diese Bruchstücke auf Majorhistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC) T-Zellen präsentiert.

Der Übergang von angeborener zu adaptiver Immunität ist dabei fließend, verursacht durch Immunzellen, die sowohl Teil der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort sind. Dazu zählen T-Zellen mit einem $\gamma\delta$ TCR ¹, sie tragen zum einen Rezeptoren wie KIRs und TLRs und tragen zur „immediate early response“ bei, zum anderen unterstützen sie B-Zellen bei der Antikörperproduktion ² und können $\alpha\beta$ T-Zellen Antigene präsentieren ³. Auf die Eigenschaften und Besonderheiten der einzelnen Systeme wird in den folgenden Unterpunkten eingegangen.

Einleitung

1.1. Das MHC-System

Die wichtigste Funktion der MHC-Moleküle ist die Präsentation von Peptiden, damit diese von T-Zellen erkannt werden und eine adaptive Immunantwort formieren können. Jede T-Zelle

erkennt einen spezifischen Komplex aus präsentiertem Peptid und MHC-Molekül (MHC-Restriktion). Diese Spezifität erfährt sie während ihrer Reifung im Thymus (s. 1.2). Dadurch sind T-Zellen in der Lage allogene (körperfremde) von autologen (körpereigenen) Strukturen zu unterscheiden und darauf zu reagieren, was z.B. eine Ursache für die Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen ist. Auch bei der Behandlung von akuter myeloischer (AML) und lymphatischer Leukämie (ALL) spielt die Wahl des geeigneten Spenders im Rahmen einer Stammzellspende eine wichtige Rolle. Spender und Empfänger müssen in ihren MHC-Haplotypen eine hohe Übereinstimmung aufweisen um die Effekte einer Graft-versus-Host Disease (GvHD) und deren Folgen möglichst gering zu halten.

Die Gene des MHC-Locus sind hochpolygen, was bedeutet, dass jedes Individuum sein eigenes, spezifisches Set aus MHC-Molekülen trägt, und zudem polymorph, sodass die Zahl der Genvarianten innerhalb der Spezies äußerst hoch ist (Abbildung 1 A und B). Die MHC-Moleküle können in verschiedene Klassen unterteilt werden. Man unterscheidet zwischen MHC Klasse I, Klasse II und MHC-ähnlichen Molekülen (Klasse III). Sämtliche Gene befinden sich beim Menschen in Clustern auf Chromosom 6. Eine andere Bezeichnung für den MHC beim Menschen lautet HLA-System (Humanes Leukozyten Antigen).

Diese Bezeichnung hat historische Gründe, da die ersten Erkenntnisse über dieses System bei Experimenten mit Leukozyten gesammelt wurden. In der menschlichen Population gibt es unterschiedliche MHC-Klassen: Bei MHC I die Phänotypen HLA-A, -B und -C und bei MHC II HLA-DR, -DQ und -DP. Jeder Mensch besitzt seine eigene MHC-Komposition aus 6 MHC I Allelen und 12 MHC II Allelen, die ihm von Mutter und Vater vererbt wurden.

Je tiefer man die MHC-Gene sequenziert, umso mehr Unterschiede treten zwischen verschiedenen Individuen hervor. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein zweiter Mensch mit identischem MHC-Phänotyp existiert, verschwindend gering. Jeden Tag werden neue Varianten von MHC-Allelen entdeckt. HLA-B weist dabei die meisten allelischen Varianten auf. Bisher wurden über 3500 verschiedene Allele identifiziert.

Auch zwischen den menschlichen Ethnien gibt es Unterschiede in der Häufigkeit bestimmter HLA-Varianten. So dominieren bei den Kaukasiern HLA-A01, -A03 und -B08⁴. Diese unterschiedliche Häufigkeit hat durchaus Relevanz, z.B. bei der Wahl von HLA-restringierten T-Zelltargets. Der MHC-Komplex ist ein Transmembranprotein und besteht aus insgesamt vier Untereinheiten. MHC I Moleküle bestehen aus drei α -Ketten (α_1 , α_2 , α_3) und dem genetisch konservierten β_2 -Mikroglobulin, MHC II Moleküle hingegen aus zwei α - (α_1 , α_2) und zwei β -Ketten (β_1 , β_2) (Abbildung 1 C).

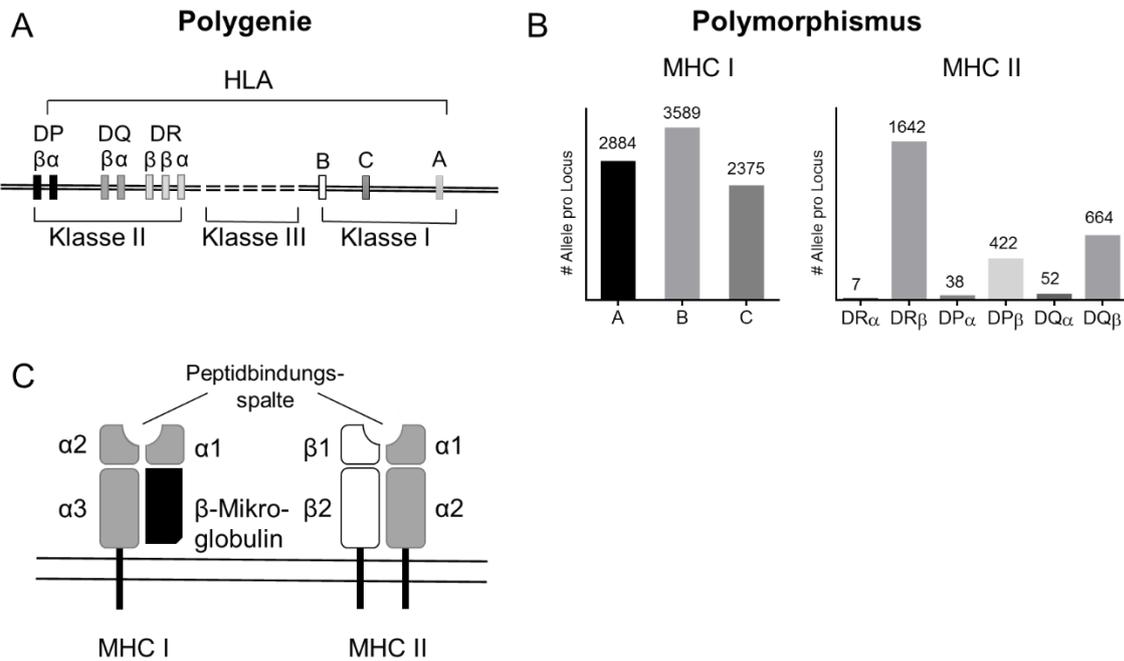


Abbildung 1: (A) Schematischer Aufbau des Locus des MHC-Genclusters auf Chromosom 6, gezeigt sind nur die häufigsten MHC I und II Gene; (B) Anzahl der bekannten Allele pro MHC Gen (Stand 2014, Quelle: Immuno Polymorphism Database); (C) Aufbau des MHC I und MHC II Heterodimers

MHC I Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zelltypen zu finden und präsentieren ihre prozessierten Peptide entsprechenden Effektorzellen, wie zytotoxischen oder regulatorischen T-Zellen als auch T-Helferzellen. Diese zytosmatischen Peptide, körpereigene wie körperfremde, werden fortlaufend in der Zelle im Proteasom auf eine Länge von 8-10 Aminosäuren geschnitten, auf den MHC I Komplex geladen und zur Zelloberfläche transportiert. MHC II Moleküle werden von APCs wie Monozyten und dendritischen Zellen sowie Makrophagen und B-Zellen exprimiert. Die von ihnen präsentierten Peptide werden von CD4+ T-Zellen erkannt. Bei den Peptiden handelt es sich um durch Endozytose aufgenommene, extrazelluläre Proteine, die in Endosomen durch verschiedene Proteasen in Peptide gespalten und anschließend auf den MHC II Komplex geladen werden. Die Länge der von MHC II präsentierten Peptide ist nicht beschränkt, da die Bindungsspalte, im Gegensatz zu MHC I⁵, zu beiden Seiten hin geöffnet ist⁶ und das Peptid darüber hinausragen kann⁷⁻⁹.

1.2. Entstehung von T-Zellen

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) spalten sich in myeloische und lymphatische Vorläuferzellen auf. Die myeloische Linie resultiert sowohl in Zellen der angeborenen Immunität wie Granulozyten und Monozyten als auch in Erythrozyten und Thrombozyten. Lymphatische Vorläuferzellen entstehen nach der Einwanderung von CD34+ CD38low HSCs in den humanen Thymus¹⁰. In diesem frühen Stadium handelt es sich um pluripotente

Einleitung

thymische Vorläuferzellen, die CD34, CD33 und CD7 exprimieren, jedoch nicht CD1, CD2 und CD5. Die Expression von CD2, CD5 und CD38 kennzeichnet Zellen der nächsten Entwicklungsstufe. Diese Zellen sind noch in der Lage sich sowohl zu T-Zellen als auch NK-Zellen zu differenzieren. Als nächstes erfolgt das TCR-Rearrangement. Die Gene der β -Kette rearrangieren dabei vor den Genen der α -Kette. Ist das Rearrangement erfolgreich, bildet die β -Kette mit einer invarianten preT α -Kette den pre-TCR. Durch diesen Zusammenschluss wird ein intrinsisches Signal gesendet, durch das die Zelle zur weiteren Proliferation angeregt wird. Gleichzeitig kommt es zur Expression der Korezeptormoleküle. Dabei wird CD4 vor CD8 exprimiert. Außerdem wird der β -Locus für weitere Rearrangements gesperrt (Allelische Exklusion) und die Zelle exprimiert nun beide Korezeptormoleküle, sie ist somit doppelt positiv für CD4 und CD8. Im Anschluss erfolgt das Rearrangement der α -Kette des TCR. Ist dieses erfolgreich und die Zelle trägt ein TCR-Heterodimer aus α - und β -Kette folgt ein Selektionsprozess zur Ausmerzung möglicher autoreaktiver T-Zellen. Dieser Prozess beginnt mit der Positiv-Selektion; dabei wird die T-Zelle auf die Bindung an Selbst-MHC-Moleküle getestet. Erkennen die T-Zellen die körpereigenen MHC-Moleküle, folgt im Zuge der Negativ-Selektion die Selektion der Zellen, die an Selbst-Peptide binden können, jedoch nicht zu stark, da sie sonst eliminiert werden (Negativ Selektion). Nur wenn T-Zellen beide Selektionsprozesse überstehen, d.h. zum einen in der Lage sind, Selbst-MHC von Fremd-MHC zu unterscheiden und körpereigene Strukturen nicht zu hochaffin zu erkennen, verlassen sie den Thymus als reife, aber naive (Antigen-unerfahrene) T-Zellen. Im Zuge der Positiv-Selektion wird außerdem die Expression des Korezeptors festgelegt. Erkennt die T-Zelle MHC I exprimiert sie CD8, bei Erkennung von MHC II CD4.

1.3. Entstehung der Diversität

Die Anzahl aller möglichen, funktionellen $\alpha\beta$ T-Zellrezeptoren beträgt schätzungsweise 10^{15} bis 10^{20} unterschiedliche Rezeptoren^{11,12}. Diese Zahl kommt durch mehrere Schritte während der Rekombination des TCR zustande. Bei $\gamma\delta$ T-Zellen ist diese Zahl etwas geringer, da ihnen im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T-Zellen weniger Segmente zur Rekombination zur Verfügung stehen. Die Ketten des TCR setzen sich jeweils aus unterschiedlichen Segmenten zusammen, die während der Reifung der T-Zelle im Thymus rekombiniert werden. Über die aus den Rekombinations-aktivierenden Genen 1 und 2 translatierten Enzyme RAG-1 und RAG-2 werden die Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) in den TCR-Ketten Loci erkannt, gebunden und geschnitten. Dadurch entstehen palindromische Sequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende der zu rekombinierenden Segmente. An diesen Enden kann das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) eine zufällige Anzahl von N-Nukleotiden einfügen oder entfernen bevor die Segmente wieder neu miteinander verknüpft werden. Die Rekombination der β - und die der δ -Kette sieht die Neuordnung eines von sechs diversity (D) Segmenten mit einem der 12 möglichen joining (J) Segmente vor, dessen

Einleitung

Fusionsprodukt anschließend mit einem variablen (V) Segment zusammengefügt und mit einem der C Segmente (constant) verknüpft wird (Abbildung 2). α - und γ -Ketten beinhalten keine D-Segmente. Sie rekombinieren ein variables (V) mit einem joining (J) Segment und verbinden diesen Komplex mit der constant (C) Region. Die VDJ-Rekombination erhöht somit die Anzahl an möglichen einzigartigen T-Zellrezeptorketten und damit an TCR-Kombinationen enorm.

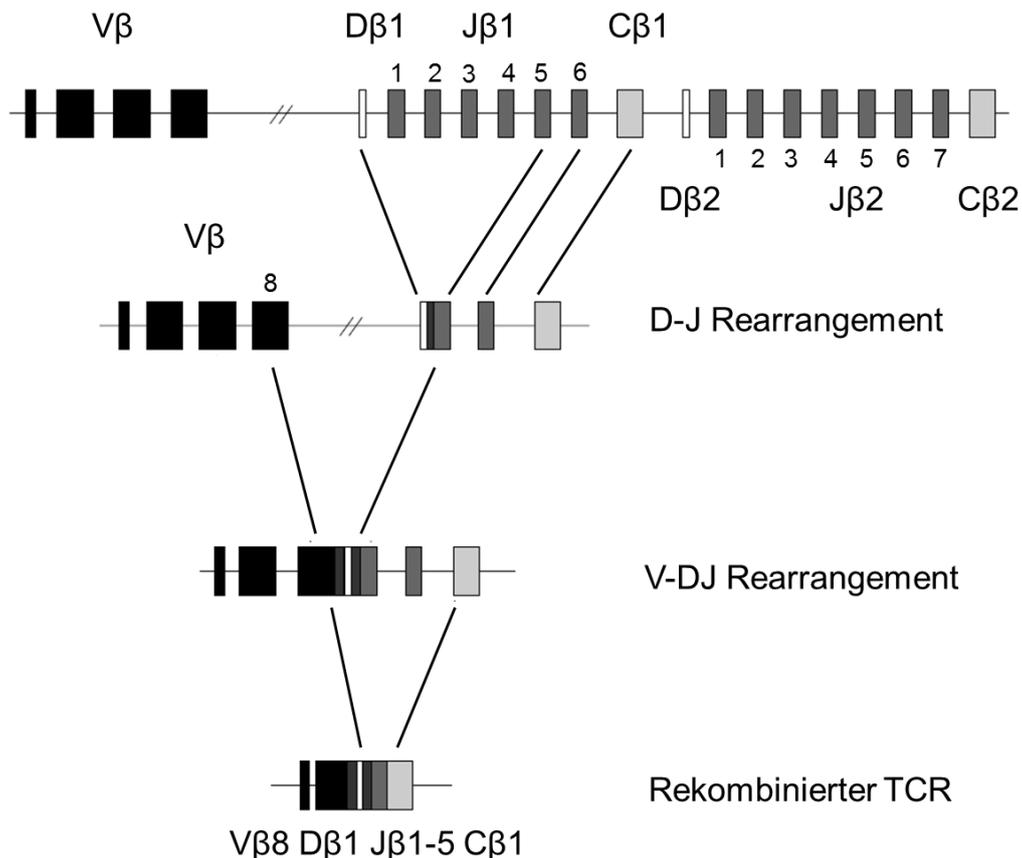


Abbildung 2: Schematische Darstellung der VDJ-Rekombination der β -Kette des TCR, die dunklen Bereiche zwischen D-J und V-DJ sind N-Nukleotide, die durch das Enzym TdT zufällig eingefügt werden

Die Anzahl der bisher molekular identifizierten TCR Segmente des α -, β -, γ - und δ -Locus sind in Tabelle 1 zu finden. Der Locus der β - und γ -Kette befindet sich auf Chromosom 7; die beiden Loci sind relativ weit voneinander entfernt und überschneiden sich nicht. Wohingegen der Locus der δ -Ketten sich innerhalb des Locus der α -Ketten befindet, was sich direkt auf die Expression des TCR auswirkt. Da die δ -Segmente im α -Locus liegen, kann nach Rearrangement der α -Kette keine δ -Kette mehr exprimiert werden. Sie geht beim Rearrangement der α -Kette aus dem jeweilig rearrangierenden α -Locus des Allels verloren. Während der T-Zellreifung im Thymus, wird erst die δ -, dann die γ -, dann die β -Kette rearrangiert. Die sich entwickelnde T Zelle trägt dann entweder ein TCR-Heterodimer bestehend aus einer α - und β -, oder einer γ - und δ -Kette. Ähnlich der allelischen Exklusion bei Immunglobulinen existiert bei T-Zellen der Prozess des TCR-Editing bzw. der TCR-

Revision. Dadurch sind reife T-Zellen in der Lage ihren T-Zellrezeptor und damit ihre Antigen-spezifität zu verändern 13,14

Tabelle 1: Anzahl der zurzeit bekannten, funktionellen V-, D-, J- und C-Segmente im humanen Genom (<http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/genetable/human/geneNumber.html>)

	Variable (V)	Diversity (D)	Joining (J)	Constant (C)
α-Kette / TRA	54	0	61	1
β-Kette / TRB	64-67	2	14	2
γ-Kette / TRG	12-15	0	5	2
δ-Kette / TRD	8	3	4	1

1.4. Der T-Zellrezeptor

Der T-Zellrezeptor (TCR) ist ein Heterodimer aus zwei Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ungefähr 95% aller T-Zellen exprimieren ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Kette. Das TCR-Heterodimer der verbliebenen 5% T-Zellen besteht aus einer γ- und einer δ-Kette. Zusammen mit dem CD3-Komplex, der aus den Untereinheiten CD3γ, CD3δ und zweimal CD3ε besteht, ist der TCR essentiell für die Aktivierung der T-Zelle. Ebenfalls wichtig für die Aktivierung ist CD28, das auf ~80% aller T-Zellen in der Peripherie exprimiert wird. CD28 bindet an zwei Moleküle der B7-Superfamilie, CD80 und CD86, auf der antigenpräsentierenden Zelle und vermittelt der T-Zelle ein für ihre Aktivierung und Proliferation notwendiges kostimulatorisches Signal. Die Oberflächenrezeptoren CD4 und CD8, sogenannte Korezeptoren, befinden sich in räumlicher Nähe zum TCR und binden an die MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzelle. Dabei bindet CD4 an MHC Klasse II und CD8 an MHC Klasse I Moleküle und stabilisieren somit die TCR-MHC Bindung.

Die Antigenerkennung einer T-Zelle geschieht über die hypervariable CDR3-Region (Complementary determining region) des TCR. Sie erkennt das vom MHC präsentierte Peptid auf der Zielzelle. Jede CDR3 Region ist einmalig und charakteristisch für eine bestimmte T-Zelle. Die CDR3-Region entsteht während der Rekombination der TCR-Ketten und wird durch die Wahl der rekombinierten V-, D- und J-Segmente sowie die Anzahl der durch TdT eingefügten N-Nukleotide bestimmt.

Jede Kette des TCR besitzt eine CDR3-Region, die konservierte Strukturen/Motive aufweist. Bei den Vα-Ketten ist dies die Sequenz CA-XXXX-FGXGT, wobei die Aminosäuresequenz CA (Cystein/Alanin) vom V-Segment und die Sequenz FGXGT (Phenylalanin/Glycin/X/Glycin/Threonin) vom jeweiligen J-Segment gebildet werden ¹⁵⁻¹⁸. Die β-Ketten besitzen das Motiv CASS-XXXX-FGXGT. Dabei stammt die Aminosäuresequenz CASS (Cystein/Alanin/Serin/Serin) vom V-Segment und die Sequenz FGXGT vom J-Segment ¹⁹. Die Anzahl und Art der zufällig eingefügten Aminosäuren X kennzeichnet die CDR3-Region und bestimmt die Spezifität des TCR. Bei dem vom J-Segment gebildeten Motiv FGXGT steht X für eine zufällig eingesetzte Aminosäure, gleichzeitig kennzeichnet

Einleitung

dieses Motiv das Ende der CDR3-Region. Weiterhin gibt es eine CDR1- und eine CDR2-Region, die Keimbahn-codiert sind und an Strukturelemente von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen binden ^{20,21}.

In gesunden Individuen präsentiert sich das Verteilungsmuster/Repertoire der TCR-Familien als Gauß'sche Normalverteilung und ist zudem polyklonal. Jeder Mensch besitzt somit viele unterschiedliche TCRs einer V α - oder V β -Kette, die sich in der Länge Ihrer CDR3-Region unterscheiden. Das TCR-Repertoire ist äußerst dynamisch und passt sich Veränderung durch intrinsische und extrinsische Faktoren schnell an. Zu den intrinsischen Faktoren zählen z.B. Polymorphismen in T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren sowie das Alter des Individuums; extrinsische Faktoren sind v.a. Infektionen durch unterschiedliche Viren (HIV, EBV) und andere Pathogene oder Reaktionen auf Superantigene.

1.5. Klassifizierung und Effektorfunktionen von $\alpha\beta$ T-Zellen

TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen bilden ungefähr 70% der Lymphozyten. Sie sind die Hauptakteure der adaptiven Immunität und sind in der Lage eine spezifische Antwort für jedes Pathogen zu generieren.

Je nach Expression des Korezeptors erkennen sie Peptide auf den entsprechenden MHC-Molekülen von Antigen-präsentierenden Zellen, CD4 bindet an MHC II und CD8 an MHC I (s.o.). Kommen APCs in Kontakt mit einem Pathogen wird dieses aufgenommen, prozessiert (wie unter 1.2 beschrieben) und auf MHC-Molekülen den T-Zellen präsentiert. Naive, Antigen-unerfahrene $\alpha\beta$ T-Zellen verlassen den Thymus und reifen nach Antigenkontakt an der APC und dem zusätzlichen notwendigen Costimulus über CD28 (Second Signal) ^{22,23} zu Effektor T-Zellen, die nach erfolgter Immunantwort zu Gedächtnis T-Zellen (Memory T-Zellen) werden. Diese verbleiben ein Leben lang im Körper und gewährleisten eine schnelle, effiziente Immunreaktion bei erneutem Kontakt mit dem jeweils für ihren Antigenrezeptor spezifisch erkannten Antigen. Gedächtnis-T-Zellen des Menschen spalten sich in zwei Subtypen, die durch die Expression spezifischer CD-Moleküle charakterisiert sind. Es handelt sich dabei um CCR7+ central memory (T_{CM}) und CCR7- effector memory (T_{EM}) T-Zellen ^{24,25}, die sich von den naiven T-Zellen durch die Expression von CD45RO unterscheiden. CCR7+ T_{CM}-Zellen wandern in Lymphknoten ein und besitzen keine direkte Effektorfunktion, wie z.B. die Sezernierung von Zytokinen. Durch einen erneuten Antigenkontakt über APCs reifen sie zu T_{EM}-Zellen. CD45RA- CCR7- T_{EM}-Zellen können durch die Zuhilfenahme zusätzlicher Marker weiter unterteilt werden: Man unterscheidet CD27+ CD28+ T_{EM1}-, CD27+ CD28- T_{EM2}-, CD27- CD28- T_{EM3}- und CD27- CD28+ T_{EM4}-Zellen ²⁶. Zellen des T_{EM1}- und T_{EM4}-Kompartmentes sind den T_{CM}-Zellen ähnlich und zeigen nur schwache Effektorfunktionen. Mit dem durch die Zellreifung verursachten fortschreitenden Verlust von CCR7, CD27 und CD28 geht eine gesteigerte zytolytische Aktivität einher.

Einleitung

Jedoch lässt sich anhand der Verortung der T-Zellen im immunologischen Gedächtnis nur bedingt etwas über Ihre Effektorfunktion aussagen. Aussagekräftiger ist in dieser Hinsicht die Expression der Korezeptormoleküle, CD4 und CD8. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen T-Zellkompartimente kurz erläutert.

1.5.1. CD4+ T-Zellen

CD4+ T-Zellen stellen die große Gruppe von T-Zellen, die unter dem Namen T-Helferzellen (T_H) zusammengefasst werden. T-Helferzellen teilen sich auf in T_{H1} -, T_{H2} -, T_{H17} -Zellen, T_H -9, T_{H21} , folliculäre und regulatorische T-Zellen, die unterschiedliche Aufgaben im Immunsystem wahrnehmen. CD4+ T-Zellen sind plastisch, das heißt, sie besitzen nicht von Beginn an einen fixierten Phänotyp; ihr Phänotyp ist vielmehr milieuhabhängig und wandelbar. So sind viele Effektorpopulationen nur funktionelle Zustände, die sich je nach Milieu auch ändern können. Durch die produzierten Zytokine und exprimierten Transkriptionsfaktoren lassen sich die einzelnen Zustände gut voneinander unterscheiden. Wichtig ist, dass die Möglichkeit der Änderung des Phänotyps auch eine Änderung der Wirkweise und Effektorfunktion mit sich bringt, was bei immunmodulatorischen Therapien beachtet werden muss, ebenso wie beim adoptiven Transfer von T-Zellen. Wichtig ist darüber hinaus noch zu erwähnen, dass T-Zellen durch langanhaltende Stimulation in ihrem Phänotyp fixiert werden können. Die Hierarchie dieser Faktoren, die sie plastisch sein lässt bzw. fixiert, sind nicht oder nur unzureichend bekannt.

T-Helferzellen schützen den Organismus vor Pathogenen und Krebszellen hauptsächlich durch die Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems. T_{H1} Zellen entstehen in Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ , produzieren selbst große Mengen IFN- γ , exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet und vermitteln Immunität gegenüber intrazellulären Krankheitserregern. Durch IL-4 wird der Transkriptionsfaktor GATA-3 aktiviert und die T-Zellantwort in Richtung T_{H2} Zellen polarisiert, welche die Zytokine IL-4, -5 und -13 herstellen und extrazelluläre Pathogene bekämpfen. In mucosalen Kompartimenten und der proinflammatorischen Umgebung von IL-6, -21 und -23 sind T_{H17} -Zellen zu finden, die Hauptproduzenten von IL-17. Sie sind gekennzeichnet durch die Expression von ROR γ t und wirken gegen Pilze und extrazelluläre Bakterien. Folliculäre T-Zellen (Tfh) sind notwendig zur Bildung von germinalen Zentren und unterstützen dort die humorale Immunantwort durch die Aktivierung bzw. Reifung von B-Zellen und die damit verbundene Generierung von Antikörpern^{27,28}. Tfh-Zellen unterscheiden sich von T_{H1} - und T_{H2} -Zellen durch die Expression von CXCR5, ICOS und die Ausschüttung von IL-21²⁹.

Regulatorische T-Zellen (Treg) nehmen eine Sonderposition in der T-Zellfamilie ein und schützen den Organismus vor Fehlfunktionen des Immunsystems, indem sie die Stärke der Immunantwort eindämmen^{30,31}. Sie sind es auch, die autoimmune Prozesse unterbinden. Tumorzellen nutzen die immunsuppressive Wirkung von regulatorischen T-Zellen

Einleitung

dahingehend, dass sie durch die Sekretion von Chemokinen die Einwanderung speziell dieser T-Zellen unterstützen und so die Bildung einer antitumoralen T-Zellantwort unterbinden. Regulatorische T-Zellen zeichnen sich durch die Expression verschiedener T-Zell-spezifischer Aktivierungsmarker wie CD25, CD69, CTLA-4, GITR, GARP und FoxP3 aus. Allerdings ist die konstitutive Expression von CD25 im menschlichen Immunsystem im Gegensatz zu der von Mäusen kein zuverlässiges Klassifizierungsmerkmal. Jedoch in Kombination mit CD127, dem IL-7 Rezeptor, der gering (low) exprimiert wird, kann eine Treg-Klassifizierung zuverlässig vorgenommen werden.

1.5.2. CD8+ T-Zellen

T-Zellen, die den Korezeptor CD8 exprimieren, fungieren als zytotoxische T-Zellen. Sie schützen den Organismus durch direkte Vernichtung von durch intrazelluläre Pathogene (Viren, Bakterien) infizierten Zellen oder Krebszellen. Dazu stehen ihnen verschiedene Fertigkeiten zur Verfügung, z.B. die Ausschüttung von Zytokinen mit anti-tumoraler und antimikrobieller Funktion wie TNF- α und IFN- γ . Des Weiteren besitzen CD8+ T-Zellen Vesikel, die mit zytotoxischen Granulae gefüllt sind. Diese Granulae enthalten Perforine und Granzyme, die sich fatal auf die infizierte Zelle auswirken. Perforin durchlöchert die Membran der Zielzelle, wodurch Granzyme ins Zellinnere gelangen und den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Die Zelle geht ein und wird von Makrophagen phagozytiert.

1.5.3. Doppelt-negative CD4- CD8- $\alpha\beta$ T-Zellen

Doppelt-negative (DN) $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren keinen Korezeptor und auch keine NK-Zellmarker. Sie bilden nur einen kleinen Teil (1-3%) der T-Zellpopulation. Für diese DN T-Zellen wurden sowohl inflammatorische^{32,33} als auch regulatorische^{34,35} Funktionen beschrieben. Wie regulatorische T-Zellen fungieren sie als wichtige Komponenten zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen³⁶ oder bei Abstoßungsreaktionen von Transplantaten bzw. zur Verminderung der GvHD³⁷.

1.5.4. Doppelt-positive CD4+ CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen

Doppelt-positive (DP) $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren beide Korezeptoren und treten zum einen als Zwischenstadium bei der T-Zellentwicklung im Thymus zum anderen als periphere Population auf³⁸. Dem doppelt positiven Stadium der T-Zellen im Thymus schließt sich die Negativ- und Positivselektion an, nach der die T-Zellen entweder CD4 oder CD8 als Korezeptor trägt oder zugrunde geht. Von entscheidender Bedeutung beim Übergang vom doppelt-positiven zum einzel-positiven Stadium sind die Transkriptionsfaktoren ThPOK und Runx3, die eigentlich nur im Thymus, nicht in der Peripherie exprimiert werden sollten. Dagegen spricht jedoch die Anwesenheit von CD4+ CD8+ T-Zellen bei unterschiedlichen Krankheiten wie HIV^{39,40}, CMV-Infektion^{41,42}, Rheumatoider Arthritis⁴³ oder GvHD⁴⁴. Die Funktionen von CD4+ CD8+ T-Zellen sind weit gefächert und werden kontrovers diskutiert.

Einleitung

So wurde eine verstärkte zytolytische Aktivität verbunden mit erhöhter Proliferation bei viralen Infektionen beschrieben⁴⁵. Außerdem sezernieren sie Zytokine wie IL-4, IL-10, IFN γ und TGF β und sind in der Lage die Proliferation von T-Zellen zu supprimieren⁴⁴.

1.6. $\gamma\delta$ T-Zellen

Wie bei $\alpha\beta$ T-Zellen ist der TCR von $\gamma\delta$ T-Zellen ein Heterodimer und setzt sich wie unter 1.4 beschrieben aus einer γ - und einer δ -Kette zusammen. Im Vergleich zu $\alpha\beta$ T-Zellen besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich weniger variable TCR-Segmente. So stehen 12-15 variablen TRG- bzw. 8 TRD-Segmenten eine Anzahl von 54 variablen TRA- bzw. 67 TRB-Segmenten gegenüber. Dadurch weisen $\gamma\delta$ T-Zellen eine scheinbar geringere Diversität in ihren TCRs auf als $\alpha\beta$ T-Zellen. Diese geringere Diversität wird durch das breite Spektrum von möglichen Liganden von $\gamma\delta$ T-Zellen kompensiert. Potentielle Liganden können sich stark in Größe und Struktur unterscheiden und umfassen MHC-ähnliche Moleküle wie MICA/B oder die Vertreter der CD1-Familie sowie nicht-Peptidische Antigene, die bei der Isoprenoidbiosynthese oder bei Mykobakterien auftreten. Zudem besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen Rezeptoren, die der angeborenen Immunität zugeordnet werden, sogenannte Pattern Recognition Receptors (PRRs), die sie Stereotypen an „Danger“-Signalen erkennen lassen. Diese stereotypen Erkennungsmuster von Pathogenen werden als Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet. Zu diesen PRRs gehören u.a. TLRs, NOD, RIG und sowie KIR- Rezeptoren.

Im Gegensatz zu den konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert die Mehrheit der $\gamma\delta$ T-Zellen keinen Korezeptor, sie sind doppelt-negativ (DN). Nur etwa 20% exprimieren CD8, weniger als 1% exprimieren CD4. Manchmal ist gar keine CD4+ Fraktion im Peripherblut nachweisbar. Der größte Teil der Population im Peripherblut, ungefähr 90% der $\gamma\delta$ T-Zellpopulation, trägt ein identes TCR Heterodimer bestehend aus einer V γ 9- Kette und einem V δ 2-Segment. $\gamma\delta$ T-Zellen, die die V δ 1-Kette exprimieren, sind selten im Blut, jedoch häufig in den Epithelien zu finden, wo sie mehr als 95% der T-Zellen stellen. Dort sorgen sie für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Integrität des Gewebes.

$\gamma\delta$ und $\alpha\beta$ T-Zellen entstehen aus einem gemeinsamen Progenitor. Im thymischen DN3 Stadium fällt die Entscheidung der Differenzierung in die $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zelle. Wir konnten zeigen, dass ein Subtyp der $\gamma\delta$ T-Zellen, das Potential zur Transdifferenzierung in $\alpha\beta$ T-Zellen besitzt. Dies trifft auf die Untergruppe V δ 1+ CD4+ $\gamma\delta$ T-Zellen zu, die nur einen kleinen Prozentsatz der $\gamma\delta$ T-Zellpopulation bilden⁴⁶.

1.7. Public TCRs

In einem Spectratype der α - und β -Kette des TCR eines gesunden Individuums werden die verschiedenen Klonotypen einer Familie als Fragmente unterschiedlicher Länge dargestellt. Der Abstand zwischen den einzelnen Fragmentlängen, als Peaks (Spitzen) im Spectratype erkennbar, beträgt genau drei Nukleotide, was genau einem Triplet auf mRNA-Ebene entspricht und bei der Translation der mRNA am Ribosom für eine Aminosäure kodiert.

Einleitung

Dieser Abstand ist deshalb gegeben, weil die zu bildenden TCR Ketten ein funktionstüchtiges Protein nur dann herstellen können, wenn sie ihre Genabschnitte dafür „in frame“, das heißt im Leseraster, das ein funktionelles Protein hervorbringt, rearrangiert haben. Alle T-Zellen, die keine Kette rearrangieren, die in diesem Leseraster bleibt, bilden keinen funktionellen TCR und sterben deshalb durch „death by neglect“. Solche nicht funktionellen TCRs bezeichnet man auch als sterile TCRs. Bei einer Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen expandieren diejenigen T-Zellklonotypen am stärksten, deren TCR-Sequenz die höchste Affinität und Bindungsspezifität gegen das Antigen aufweist. Dadurch verändert sich das Verteilungsmuster im Spectratype und die betroffenen α - und β -Ketten zeigen ein oligo- bis monoklonales Bild. Die enorm große Anzahl möglicher T-Zellrezeptoren macht es unwahrscheinlich, dass mehrere Individuen dieselben Rezeptoren besitzen. Dennoch ist genau dies bereits beschrieben worden, sie wurden deshalb auch als public TCRs bezeichnet. Interessanterweise dominieren diese T-Zellrezeptoren oftmals im Kontext einer Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen und in mehreren Individuen einer Spezies⁴⁷⁻⁴⁹. Dabei muss zwischen Keimbahn-codierten und selektionierten, nicht Keimbahn-codierten, public TCRs unterschieden werden. Beschrieben wurden public TCRs bereits in Immunantworten gegenüber CMV⁵⁰⁻⁵⁵, EBV^{47,48,50,51}, HIV⁵⁶⁻⁵⁸, Hepatitis B⁵⁹ und C⁶⁰, Krebs⁶¹⁻⁶⁶, in Autoimmunerkrankungen⁶⁷⁻⁷³ und Alloreaktivität^{74,75}. Oftmals ergeben sich auch Übereinstimmungen bei benutzen TRAV- bzw. TRBV-Segmenten unabhängig vom jeweiligen Ziel der Immunantwort. Um diese Übereinstimmungen besser klassifizieren zu können, wurden folgende Typen von Public Motifs definiert^{76,77}:

- Typ I ist gekennzeichnet durch die Verwendung desselben TRAV-oder TRBV-Segments. Allerdings gibt es keine oder wenig Übereinstimmung in der CDR3-Sequenz und TRAJ- bzw. TRBJ-Segment
- Typ II zeigt teilweise oder ganz übereinstimmende Aminosäuren in der CDR3-Sequenz, verwendet aber unterschiedliche TRAJ- bzw. TRBJ-Segmente
- Typ III steht für die bestmögliche Übereinstimmung, d.h. gleiche TRAJ- oder TRBJ-Segmente und identische CDR3-Sequenz
- Typ IV ist eine Mischung aus II und III, so gibt es teilweise Übereinstimmung in der CDR3-Sequenz sowie der Benutzung von TRAJ- und TRBJ-Segmenten

1.8. T-Zellen in immuntherapeutischer klinischer Anwendung

T-Zellen werden, ebenso wie NK-Zellen, in der Klinik bereits seit Jahren zur Bekämpfung solider Tumoren eingesetzt. Nach adoptivem Transfer *in vitro* geboosteter, geprimter oder gentechnisch modifizierter T-Zellen beruht die Wirkweise auf der zielgerichteten Zerstörung des Tumors durch Tumorantigen assoziierte (TAA), spezifische T-Zellen. Krebs entsteht durch die unkontrollierte Vermehrung von Zellen. Wobei sich je nach Zelltyp verschiedene

Einleitung

Karzinome entwickeln. Die unkontrollierte Teilung wird ausgelöst durch das Ausfallen verschiedener zellulärer Kontrollmechanismen, die wiederum auf nicht korrigierte Genmutationen zurückzuführen sein können. Mutierte Gene können jedoch generell in mutierten Proteinen resultieren. Da diese wie auch jedes andere Protein auf der Zelloberfläche präsentiert werden, können T-Zellen diese mutierten Peptide als Neoantigene erkennen und die sie präsentierende Tumorzelle eliminieren.

Durch die technisch machbar gewordene, rasche Identifizierung spezifischer Tumorantigene können individuelle Cocktails aus eben jenen Proteinbruchstücken synthetisiert werden, die molekular als Patienten-/Tumor-spezifisch identifiziert werden konnten. Enthält der T-Zellpool eine für dieses Peptid spezifische T-Zelle, kann diese gezielt isoliert und expandiert werden. So lassen sich in relativ kurzer Zeit Tumor-spezifische T-Zellen herstellen, die therapeutisch angewandt werden können.

1.9. Zielsetzung

Genmutationen geschehen zufällig und relativ häufig. Man geht davon aus, dass sich innerhalb von 24 Stunden ca. 10000 Mutationen pro Zelle ereignen. Diese Fehler werden jedoch durch verschiedene, effiziente Reparaturmechanismen wieder korrigiert. Wird eine Mutation nicht behoben, kann das schwerwiegende Folgen haben. Betrifft die Mutation nur ein einziges Nukleotid, handelt es sich um einen „Single Nucleotid Polymorphism“ (SNP). Durch das geänderte Nukleotid kann, muss sich aber nicht – aufgrund der Degeneration des genetischen Codes auch die durch das Basentriplett codierte Aminosäure ändern. Eine veränderte Aminosäuresequenz, unabhängig von einer daraus möglicherweise resultierenden Strukturänderung des Proteins, kann immunogenen Charakter besitzen. Da alle Selbstproteine im Proteasom prozessiert und die dabei entstehenden Peptide an der Zelloberfläche präsentiert werden, kann das mutierte Peptid vom Immunsystem als fremd erkannt und die Zelle, die es präsentiert, durch T-Zellen eliminiert werden.

In der Behandlung von Tumoren kommen SNPs deshalb eine besondere Bedeutung zu. Zum einen können sie generell in Patienten-individualisierten Vakzinierungsstrategien als Tumor-spezifische Targets angesteuert werden, wenn es sich um neo-Epitope handelt, also um im Tumor mutierte Gensequenzen. Zum anderen können SNPs, wenn sie in Genen vorkommen, die eine Gewebe-restringierte Expression aufweisen, als Ziele für Donor T-Zellen dienen, die gegen Gewebe-restringierte SNPs des Patienten generiert werden. So sind SNPs in Hämatopoese-restringierten Genen nur auf Blutzellen zu finden, womit eine Immunreaktion auf das hämatopoetische System beschränkt ist und Nebenwirkungen ausgeschlossen sind. Durch konventionelle Suche wurden bisher nur etwa 6 dieser SNPs entdeckt. Durch in silico Suche in Datenbanken, die Genexpressionen auf RNA und Proteinebene anzeigen, konnten wir 77 Gene identifizieren, die Hämatopoese-restringiert exprimiert werden. Die Behandlung einer Leukämie kann durch die Transplantation allogener

Stammzellen erfolgen. Spender und Empfänger müssen dabei bestmöglich übereinstimmen um die Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Die durch einen SNP ausgelöste Disparität kann starken Einfluss auf die Akzeptanz der allogenen Stammzellen gegenüber dem Empfängergewebe haben und ist in der Lage allein eine systemische Graft-versus-Host Disease (GvHD) auszulösen⁷⁸, die im schlimmsten Fall tödlich verlaufen kann. Ein positiver Nebeneffekt einer GvHD ist eine Graft-versus-Tumor (GvT) bzw. im Fall von Leukämie eine Graft-versus-Leukemia (GvL) Wirkung⁷⁹, denn dadurch werden nicht nur die SNP tragenden Spenderzellen, sondern auch Tumorzellen, die diesen SNP tragen, angegriffen und beseitigt. Die Dissektion von verhängnisvoller und unerwünschter GvHD und gewolltem GvT-Effekt ergibt sich aus der Verwendung von Gewebe-restringierten SNPs als Ziele einer T-Zellbasierten Tumortherapie. Dabei spielt es keine Rolle ob der Patient selbst gegen die Tumorspezifischen SNPs geimpft wird oder ob SNP spezifische T-Zellen – generiert *in vitro* oder *in vivo* - adoptiv transferiert werden.

Diese Dissektion wurde erstmals beobachtet durch Donor-Lymphozyten mit GvL-Wirkung gegen Minorhistokompatibilitätsantigene (MiHAgs) des Empfängers bei Patienten mit akuten Leukämien⁸⁰. Goulmy et al gelang es, aus dem Blut von Patienten mit starker GvHD HLA-A*201-restringierte, für Minorantigene des Empfängers spezifische CD8+ zytotoxische T-Zell-Klone zu isolieren⁸¹. Sie und andere konnten zeigen, dass ein Mismatch in einem einzigen immundominanten Minorallel im MHC-abgeglichenen Transplantations-Setting eine letale GvHD induzieren kann^{82,83}. Es folgten weitere Berichte über CTLs – spezifisch gegen MiHAgs des Empfängers in Patienten, die genotypisch HLA-identische Spender hatten und trotzdem an einer schweren GvHD erkrankten^{84,85}.

Um SNP-basierte Immuntherapien in die Klinik bringen zu können, müssen einige Hürden überwunden werden. Zu den zahlreichen Faktoren, die der Effizienz einer SNP-basierten Therapie entgegen stehen, gehören: Die Restriktion des SNP enthaltenden Peptids auf das Gewebe, aus dem der Tumor hervorging, die Frequenz des SNP, die Häufigkeit des HLA-Moleküls, auf dem das jeweilige SNP-Epitop präsentiert werden kann in der Bevölkerung und die sich daraus ergebende statistische Wahrscheinlichkeit für eine therapeutisch erforderliche Verteilung der SNP-Varianten in Empfänger und Spender. Die von uns identifizierten 77 Hämatopoese-restringierten Gene weisen allesamt Exon-codierende SNPs auf. Die Gesamtzahl der SNPs beläuft sich auf über 200. Wir haben sie nach HLA-Bindungsspezifität klassifiziert.

In der vorliegenden Arbeit sollten mindestens 10 dieser Hämatopoese-restringierten SNPs als Ziele validiert werden, das heißt *in vitro* daraufhin untersucht werden ob sie immunogenes Potential besitzen. Dies sollte mit HLA-typisierten Spenderkohorten versucht werden, die entsprechend homozygot genotypisiert für jeweils eine der Peptidvarianten des untersuchten SNP waren. Die Induktion sollte mit naiven CD8+ T-Zellen erfolgen und die so

Einleitung

generierten Minorantigen-spezifischen T-Zellen sollten auf anti-tumorales Potential, Spezifität, Verortung im immunologischen Gedächtnis klassifiziert sowie eine komparative Analyse der CDR3-Region des TCR durchgeführt werden.

Da sich im Verlauf der Arbeit zeigte, dass keiner der untersuchten SNPs immunogen war, sollte als Folge untersucht werden ob die Generierung Epitop-spezifischer $\alpha\beta$ T-Zellen aus einem extrathymisch reifen $\alpha\beta$ T-Zellprogenitor, den $V\delta 1+$ $CD4+$ $\gamma\delta$, *ex vivo in vitro* möglich ist.

2. Material und Methoden

Um die verwendeten Materialien und Geräte anschaulich darzustellen, folgt zunächst die tabellarische Übersicht. Anschließend werden die relevanten immunologischen Methoden beschrieben und die experimentellen Ansätze erklärt. Den Abschluss bildet die Übersicht der molekularbiologischen Methoden, inklusive einer Auflistung der verwendeten PCR-Programme und Primer.

2.1. Material

Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Alexa Fluor 350	Life Technologies, Carlsbad, USA
Biocoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bovines Serumalbumin 7,5%	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphate	Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland
DNA-Längenstandard	peqGOLD 100bp DNA-Ladder Plus PEQLAB Biotechnologies, Erlangen, Deutschland
EDTA	Universitätsapotheke Tübingen, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
GelRed Nucleic Acid Stain Gel	Biotium, Hayward, USA
GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Hi-Di™ Formamid	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Interleukin-2	Immunotools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-6	Immunotools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-6 Rezeptor (gelöst)	Immunotools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-7	Immunotools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-15	Immunotools GmbH, Friesoythe, Deutschland
6x Ladepuffer	6xLoading Dye Solution, MBI Fermentas, St. Leonrot, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lyse-Puffer	Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland
1x PBS (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	GIBCO, Eggenstein, Deutschland
Penicillin/Streptavidin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Material und Methoden

Phytohämagglutinin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RNAase, DNAase freies Wasser	GIBCO, Eggenstein, Deutschland
10x TBE-Puffer, pH8,0	Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland
TGF- β	Immunotools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Trypan blue solution (0,4%)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
<i>Geräte</i>	
Brutschrank	B6060, Heraeus, Hanau, Deutschland
Gelelektrophorese-System	Minicell® Primo EC 370 M, Holbrook, New York, USA Modell 40-1214
PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen	
FACS	BD FACSCalibur, BD LSR II Becton Dickison, Heidelberg, Deutschland
Gen-Sequenzierer	3130 xl Genetic Analyzer Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Lightcycler	CFX96 Real-time System, C1000™ Thermal Cycler Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Magnete	MiniMACS™ Separator Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskope	IX50, CX40, Olympus
Odyssey Fc Imaging System	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
PCR Thermocycler	Gene AMP PCR System 9700
Pipetten	Gilson P2, P10, P20, P100, P200, P100 Gilson, Villers-le Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	Accu-Jet® Braun, Melsungen, Deutschland
Spannungsquelle für Agarose-Gele	Bachhofer, Reutlingen, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop ND-2000 PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
Vortexgerät	REAX top Heidolph, Nürnberg, Deutschland
Waage	BP121 S Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	WB 14 Mettler, Schwerdtfeger, Wehrheim, Deutschland

Material und Methoden

Zentrifugen Mikro 22 R, Rotixa 50 RS, Rotanta 46 RSC
Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Laborzubehör

Verschiedene Glaswaren Schott Duran®
Schott, Mainz, Deutschland

Kryo-Röhrchen Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Pasteur-Pipetten Fortuna, Barking, England

PCR-Reaktionsgefäße Thermo-Strips™
PEQLAB, Erlangen Deutschland

Pipettenspitzen (verschiedene Größen) Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Biozym, Oldendorf, Deutschland

Stabpipetten Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Spritzen(Verschiedene Größen) Braun, Melsungen, Deutschland

Sterilfilter Ministart® (20 µm, 40 µm) Satorius, Göttingen, Deutschland

Zellsieb BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

Zellkulturflaschen(verschiedene Größen) BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

Zellkulturplatten
(6-well, 12-well, 24-well, 96-well) BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

Immunologische Kits

Kit zur Isolierung von PE Anti-PE Microbeads
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Kit zur Isolierung von FITC Anti-FITC Microbeads
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-FITC Multisort Kit
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Kit zur Isolierung von CD4+ Zellen Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit
Invitrogen, Groningen, Niederlande

Kit zur Expansion von humanen T-Zellen Dynabeads human T Activator CD3/CD28
Invitrogen, Groningen, Niederlande

Material und Methoden

Molekularbiologische Kits

Gene Expression Assay PTCRA	Cat.Nr.: # 4331182 Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Kit zur Isolierung von RNA	RNeasy® Mini Plus Kit Qiagen, Hilden, Deutschland
Kit für cDNA-Synthese	Super Script® III First-Strand Synthesis SuperMix Invitrogen, Groningen, Niederlande
LightCycler® -Primer Set	Human RorC Search LC., Heidelberg, Deutschland

Enzyme

Taq-Polymerase (inkl. 10x Puffer, 50mM MgCl ₂)	Taq DNA Polymerase Invitrogen, Groningen, Niederlande
AmpliTaq® Gold 360 DNA Polymerase	Taq DNA Polymerase Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
iQ™ SYBR® Green Supermix	iTaq™ DNA Polymerase Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Light Cycler® FastStart DNA Master SYBR™ Green I	FastStart Taq DNA Polymerase Roche, Mannheim, Deutschland
BigDye Terminator v3.1 Master Mix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

DNA-Längenstandard

Als DNA-Längenstandard wurde ausschließlich das Produkt peqGold 100bp DNA-Ladder-

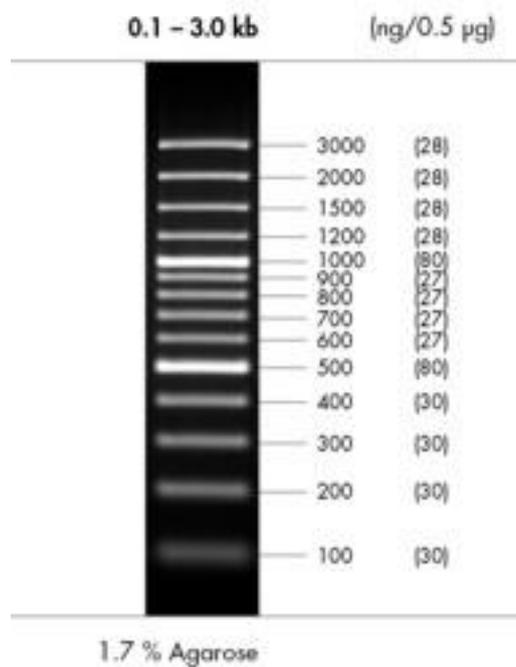


Abbildung 3: Verwendeter DNA-Längenstandard im Agarosegel

Plus von PeqLab Biotechnologies GmbH (Erlangen) verwendet (Abbildung 3).

Antikörper

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

Antigen (human)	Klon	Fluorochrom	Firma
CD3	SK7	FITC, PerCP	BD
CD3	MEM-57	APC	Immunotools
CD4	SK3	PE, PerCP, VioBlue	BD
CD8 α	SK1	FITC, PerCP, APC, APC-H7	BD
CD8 β	2ST8.5H7	APC	BD
CD25	2A3	FITC, PE	BD
CD27	LT27	PE-Dy590	ExBio
CD28	CD28.2	FITC	BD
CD34	581	PE, APC	BD
CD45RA	HI100	FITC	BD
CD45RO	UCHL1	PE	BD
CD69	L78	PerCP	BD
C β	VH31	unlabeled	
C δ	5A6.E9	FITC	Life Technologies
HLA-A,B,C	G46-2.6	FITC	BD
HLA-DR	L243	PerCP	BD
MICA/B	6D4	PE	BD
TCR- $\gamma\delta$	11F2	FITC, PE	BD
TCR-V δ 1	TS8.2	FITC	Endogen
TCR-V δ 2	B6	PE	Thermo Scientific
TCR-V γ 9	7A5	FITC	Thermo Scientific
TCR $\alpha\beta$	T10.B9	FITC, PE	BD

Tabelle 3: Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper für die FACS Analyse

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
Ratte anti-Maus IgG1	A85-1	FITC	BD
Ratte anti-Maus IgG1	A85-1	PE, APC	BD
Streptavidin	-	PE, APC	BD

Tabelle 4: Liste der Antikörper für die Isotyp-Kontrollen in der FACS Analyse

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
Maus IgG1	X40	FITC, PE, APC	BD
Maus IgG2a	X39	PerCP	BD

Tabelle 5: Liste der verwendeten Blocking-Antikörper für funktionelle Assays

Antigen (human)	Klon	Fluorochrom	Firma
DLL4	MD4-46	unlabeled	Biolegend
HLA-A,B,C	W6/32	unlabeled	Biolegend
HLA-DR	L243	unlabeled	Biolegend
MICA/B	6D4	unlabeled	Biolegend

2.2. Immunologische Methoden

Nach einer allgemeinen Einführung in die etablierten Methoden der Zellseparation und –detektion folgt eine Auflistung der auf diese Weise gewonnenen Zellpopulationen. Die Zusammensetzung der Kultivierungsansätze, inklusive Zytokinmilieu und die Dauer der Experimente verschiedener Zellpopulationen werden darauffolgend beschrieben.

2.2.1. Die magnetaktivierte Zellseparation (MACS)

Das Prinzip dieser immunologischen Technik beruht auf der Bindung von Antikörpern an magnetische „Microbeads“ und der anschließenden Trennung von an den Antikörper-Bead-Komplex gebundenen Zellen von nicht gebundenen Zellen im magnetischen Feld.

Dabei kann man zwischen Positiv-, Negativ-Selektion und der Chromophoranreicherung

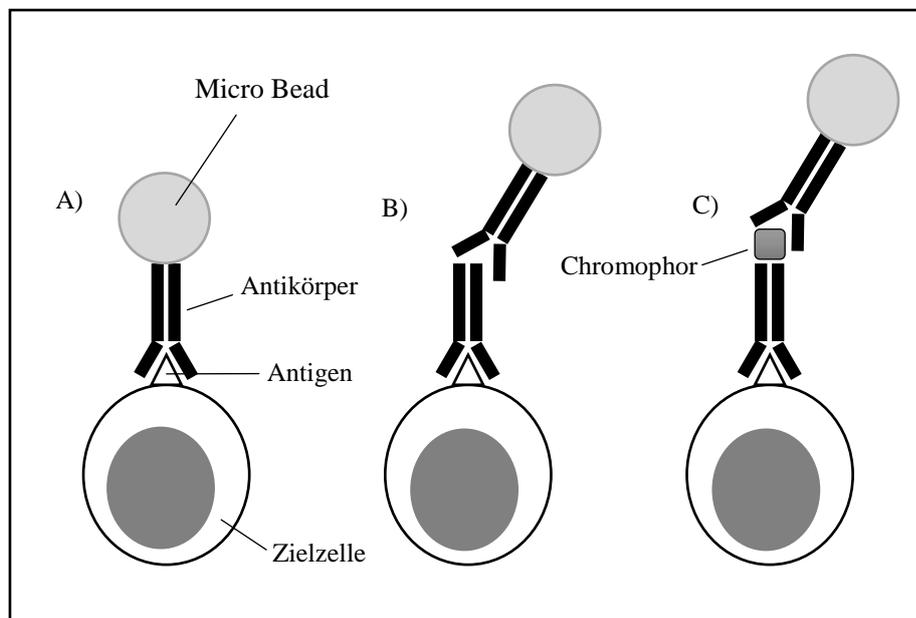


Abbildung 4: Verschiedene Möglichkeiten zur magnetaktivierten Zellseparation; A) direkt, B) indirekt und C) Chromophoranreicherung

unterscheiden (Abbildung 4). Bei der Positiv-Selektion können die Zellen direkt oder indirekt markiert werden; die Negativ-Selektion wird auch als „untouched“ Selektion bezeichnet. Bei der sogenannten „untouched“ Selektion werden nur die Zellen gebunden, die man depletieren möchte. Dabei kommt ein Antikörpercocktail zum Einsatz, in dem die verschiedenen Antikörper mit Biotin versehen sind.

Material und Methoden

Gibt man nun die Anti-Biotin-Beads dazu und trägt das Gemisch auf die MACS-Säule auf, passieren die gewünschten Zielzellen unberührt das Magnetfeld. Das kann von Vorteil sein, wenn man eine Aktivierung dieser Zellen unbedingt vermeiden möchte.

Bei der direkten Markierung sind die Antikörper mit den „Beads“ direkt verbunden und die Zielzellen können nach Inkubation im magnetischen Feld festgehalten werden. Bei der indirekten Markierung ist der primäre Antikörper ungebunden und muss dann über einen sekundären Antikörper, welcher an den „Bead“ gebunden ist, isoliert werden, wodurch man auch die gewünschte Zielzelle erhält. Daraus lässt sich ableiten, dass die Anti-Chromophoranreicherung eine Art der indirekten Markierung ist, da man einen sekundären Antikörper benötigt, der das Chromophor erkennt.

Isolation von CD8+ CD45RO- T-Zellen

Per untouched Isolation wurden CD8 positive T-Zellen (Isolation Kit (Miltenyi) aus dem Blut gesunder Spender gewonnen. Aus der so gewonnenen CD8+ T-Zellfraktion wurden Antigen-erfahrene, CD45RO+ T-Zellen mit einem PE-gelabelten CD45RO-Antikörper und Anti-PE Beads (Miltenyi) depletiert. Die Isolationsprozeduren erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Reinheit der CD8+ CD45RO- T-Zellfraktion wurde im FACS analysiert.

Isolation von TCRαβ+ CD28- CD4+ / CD8+ T-Zellen

Von vier gesunden Spendern - davon zwei < 30 Jahre und zwei > 30 Jahre alt - wiesen die beiden älteren Spender eine interessante Krankheitsvorgeschichte auf: Proband 1 hatte als Kind eine schwere Autoimmunerkrankung (Muskel) und erkrankte im Alter von 41 Jahren an einem Melanom, von dem er trotz zweimaliger Resektion lokaler Rezidive, in Remission ist. Proband 2 leidet seit einer schweren Virusinfektion im Alter von 16 Jahren an einer autoimmunen Thyroiditis (Hashimoto) und hatte im Alter von 31 und 33 Jahren jeweils nach einer Schwangerschaft zweimal ein akutes Guillain-Barrée Syndrom, mit Ausprägung einer Tetraplegie innerhalb von sechs Stunden. Der Spontanverlauf war jedoch jeweils vollständige Wiederherstellung der Gesundheit. Zum Zeitpunkt der Analyse waren beide älteren Spender jedoch symptomfrei. Die beiden jüngeren Spender hatten eine unauffällige Krankheitsvorgeschichte.

Nach Blutentnahme wurden die Lymphozyten per Dichtegradientenzentrifugation isoliert, die Zellzahl bestimmt und initiale FACS-Analysen auf das Vorhandensein der Zielpopulationen gemacht. TCRαβ+ Zellen wurden mit dem TCRαβ-PE mAb und Anti-PE Microbeads positiv angereichert. Diese Fraktion wurde mit CD28-FITC mAb (BD) und Anti-FITC Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) inkubiert um die CD28+ und CD28- Zellen zu erhalten. Aus diesen beiden Fraktionen wurden mit dem CD4 Positive Isolation Kit (Dyna) die CD4+ und die CD4- Subfraktion isoliert. Da der Prozentsatz der doppelt negativen Zellen als sehr niedrig anzusehen ist, wurden die CD4- Populationen als CD8+ klassifiziert. Somit wurden

Material und Methoden

von jedem Proband vier Subpopulationen von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen isoliert und analysiert: CD28+ CD4+, CD28+ CD8+, CD28- CD4+ und CD28- CD8+ Zellen.

Isolation von TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen zur Expansion BZLF-1 spezifischer T-Zellen

Aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMNCs, peripheral blood mononuclear cells) von Spendern mit dem HLA-Haplotyp B*35:01 wurden die TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen mit einem PE-gelabelten TCR $\alpha\beta$ -Antikörper sowie Anti-PE Beads (Miltenyi) depletiert. Dieser Vorgang wurde zur maximalen Depletion der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellfraktion zweimal durchgeführt. Aus der TCR $\alpha\beta$ negativen PBMNC Zellfraktion wurden anschließend mittels eines FITC-gelabelten V δ 1-Antikörpers und des Anti-FITC Multisort Kit (Miltenyi) die V δ 1+ T-Zellen positiv gewonnen. Die Reinheit der TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen wurde im FACS überprüft.

Isolation von V δ 1+ T-Zellen zur Kultivierung von „Bulk“ V δ 1 T-Zellen

Per Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMNCs aus dem Blut gesunder Spender gewonnen und anschließend per Fluoreszenz aktivierter Zellsortierung (FACS, fluorescence activated cell sorting) auf den Prozentsatz der V δ 1+ T-Zellen hin überprüft. War dieser entsprechend hoch ($\geq 1,0\%$) wurden die V δ 1+ T-Zellen mit dem Anti-FITC Multisort Kit (Miltenyi) und einem FITC-gelabelten V δ 1-Antikörper isoliert. Die so isolierten Zellen wurden als „Bulk“ Kulturen bezeichnet, da sie sich aus V δ 1+ T-Zellen sämtlicher Korezeptorexpression zusammensetzen.

Isolation von V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen

V δ 1+ T-Zellen wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben gewonnen. Aus diesen wurden mit dem CD4 Positive Isolation Kit (Dyna) die V δ 1+ CD4+ T-Zellen isoliert.

2.2.2. Die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)

Bei der Fluoreszenz aktivierten Zellsortierung handelt sich um ein Verfahren, bei dem eine große Anzahl Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren und auf ihre Größe und Granularität untersucht werden können. Die Ergebnisse erhält man in Form eines „Dot Blots“, in dem der „Forward Scatter“ (FSC) die Größe und der „Side Scatter“ (SSC) die Granularität angibt. Des Weiteren ist es durch den Einsatz Fluorochrom-markierter Antikörper möglich Antigene (extra- oder intrazellulär) auf diesen Zellen zu detektieren. Werden diese Fluorochrome von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, emittieren sie dies in einer anderen Wellenlänge, was von einem FACS-Gerät erkannt werden kann.

Zellen können dabei direkt oder indirekt markiert werden. Bei der direkten Markierung wird nur ein Antikörper verwendet, an den das Chromophor gebunden ist. Im Falle der indirekten Markierung, muss ein Sekundärantikörper eingesetzt werden, der das Chromophor trägt und spezifisch den eingesetzten Primärantikörper bindet. Außerdem gibt es auch biotinylierte Antikörper, die von einem Sekundärantikörper, der mit Streptavidin gekoppelt ist, erkannt werden. Im Zuge dieser Arbeit kamen unterschiedliche Färbungsmethoden und FACS-

Material und Methoden

Geräte zum Einsatz. Zum einen der FACS Calibur und zum anderen der FACS LSR II, beide von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland). An ersterem wurden nur Vier-Farbanalysen, d.h. vier Chromophore (FITC, PE, PerCP, APC), durchgeführt. Der LSR II kann 17 unterschiedliche Fluoreszenzen messen und wurde für die Analyse der meisten Experimente verwendet. Die eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Zur direkten Färbung der verschiedenen Oberflächenmoleküle wurden 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen pro FACS-Röhrchen eingesetzt und die Antikörper gemäß den Mengenvorgaben des Herstellers zugegeben. Zusätzlich wurde immer eine Isotypkontrolle mit Antikörpern der gleichen Immunglobulinklasse für die eingesetzten Chromophore gelabelten Antikörper geführt. Dann wurden die Zellen für 15 Minuten (min) im Dunkeln inkubiert und anschließend in 1 ml 4°C kalten FACS-Puffers für 2 min bei 660xg gewaschen. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen im verbliebenen Flüssigkeitsvolumen vor der Messung vorsichtig gevortext. Bei der indirekten Färbung wurde zuerst der ungefärbte Primärantikörper zugegeben, nach einer Inkubation von 15 min im Dunkeln die Zellen in 1 ml 4°C kalten FACS-Puffers aufgenommen und 2 min bei 660xg ab zentrifugiert. Danach wurden sie weitere 15 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert, anschließend noch einmal gewaschen, sanft gevortext und danach gemessen.

2.2.3. Zellkulturen

Um kernhaltige Zellen des Blutes von den kernlosen zu trennen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur ausgeführt. Zuerst wird das Blut mit 1x PBS im Verhältnis 1:3 gemischt und vorsichtig auf die Biocoll (Ficoll-Hypaque)-Lösung geschichtet, die sich in einem konisch zulaufenden 15 bzw. 50ml Falcon Röhrchen befindet. Das Verhältnis Blut/PBS-Gemisch zu Biocoll-Lösung sollte dabei 3:1 betragen. Danach wurde der Gradient bei 800 g für 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der durch die Dichtegradientenzentrifugation entstandene Lymphozytenring, der die mononukleären Zellen des Blutes enthält, wird abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (1. 500 g, 12 min 2. 350 g 10 min beides mit Bremse). Anschließend werden die in der Lymphozytenfraktion verbliebenen Erythrozyten mittels Lyse-Puffer lysiert (6 min), die nach der Lyse empfindlichen Zellen werden bei 250 g für 10 min zentrifugiert. Nach Resuspension in 10 ml 1x PBS wird die Zellzahl nach Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer bestimmt.

Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre bei 5% CO_2 -Gehalt kultiviert.

Zellkulturmedien

Das Standardmedium für die Zellkultur bestand aus RPMI 1640, das zusätzlich noch mit: 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptavidin-Lösung (10^4 U/ml, 10^4 µg/ml) und 1% Glutamin-Lösung (2mM) versetzt wurde. Das FCS wurde bei 56 °C für 50 Minuten 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.

Für die Expansion peptid-spezifischer T-Zellen wurde das Medium, um der Expansion unspezifischer T-Zellen vorzubeugen, nicht mit FCS, sondern mit 10% autologen Serum, sowie zusätzlich mit 25 mM HEPES-Puffer versetzt.

Herstellung von 3/28 stimulierten Feederzellen

Lymphozyten (allogen oder autolog) wurden über Nacht mit α -CD3/CD28 Beads im Verhältnis 1:1 und 30 U/ml IL-2 kultiviert. Vor Verwendung wurden die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen, der Überstand verworfen und die verbliebenen Beads per Magnet entfernt.

Coating der Microsphären

Zur Expansion von peptid-spezifischen T-Zellen wurden 40 µg Microsphären (Bangs Laboratories, Fishers, USA) mit 1 µg Peptid-MHC Gemisch und 3 µg biotinyliertem α -CD28 Antikörper inkubiert. Die Prozedur wurde durchgeführt gemäß den Angaben des Herstellers. Die MHC-Monomere sowie die SNPs beinhaltenden Peptide wurden freundlicherweise von der AG Stefanovic hergestellt und biotinyliert. Die zur Detektion von SNP-spezifischen T-Zellen eingesetzten MHC-Peptid Pentamere wurden ebenfalls von der AG Stefanovic hergestellt.

Expansion SNP-spezifischer T-Zellen

Eingesetzt wurden die wie unter 2.2.1. beschrieben isolierten CD8⁺ CD45RO⁻ T-Zellen von sieben gesunden, HLA-typisierten Spendern. 5×10^6 Zellen wurden in 1ml Zellkulturmedium aufgenommen, auf 24-Well-Platten ausgesät und mit 5 ng/ml IL-12 und 30 U/ml IL-2 supplementiert. 1×10^6 der benetzten Microsphären wurden initial der Zellkultur beigemischt. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit frischem Medium, 30 U/ml IL-2, 5 ng/ml IL-7 und 5 ng/ml IL-15 versorgt. Eine Woche nach Beginn der Expansion wurden die Zellen zum ersten Mal mit den benetzten Microsphären restimuliert und mit 30 U/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-12 supplementiert. Dieser Stimulationszyklus wiederholte sich für die nächsten drei Wochen. Die Expansion der Peptid-spezifischen T-Zellen wurde anhand von MHC-Pentamer-Analysen im FACS ermittelt.

Virus-spezifische T-Zellen

Bei der Ausgangszellpopulation handelte es sich um $V\delta 1+$ T-Zellen von drei verschiedenen, gesunden Probanden, die per MACS (s. 2.2.1.) aus den TCR $\alpha\beta$ -depletierten Lymphozyten HLA-B*3501 positiver Spender isoliert wurden. Zur Generierung Virus-spezifischer T-Zellen wurden jeweils das EBV-Peptid BZLF-1 (Proimmune, Oxford, UK), der Peptivator AdV5 Hexon (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und der CMV-Peptidcocktail Peptivator pp65 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) eingesetzt. Autologe Feederzellen wurden eine Stunde mit 10 μg des jeweiligen Peptids inkubiert, anschließend zweimal mit PBS für 10 min bei 300xg gewaschen und mit 80 Gy bestrahlt. 1×10^5 autologe, Peptid-gepulste Feederzellen wurden im Verhältnis 1:1 mit absolut TCR $\alpha\beta$ -freien, $V\delta 1+$ T-Zellen gemischt und zusätzlich mit 30 U/ml IL-2 supplementiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit frischem Medium sowie mit 30 U/ml IL-2 versorgt und nach weiteren drei Tagen mit autologen, peptid-gepulsten Feedern und 30 U/ml IL-2 restimuliert. Die Anzahl entstandener TCR $\alpha\beta$ + Peptid-spezifischer T-Zellen wurde einmal pro Woche über vier Wochen bei vier Probanden hinweg im FACS detektiert.

Kultivierung $V\delta 1+$ T-Zellkulturen

Nach Isolation per MACS wie unter 2.2.1. beschrieben wurden $V\delta 1+$ T-Zellen in 96-Well-Platten á 5×10^4 Zellen ausgesät und mit 50 U/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA supplementiert. Zusätzlich wurden die $V\delta 1+$ T-Zellen mit bestrahlten, allogenen oder autologen Feederzellen, je nach Experiment, versorgt. Die Supplementation der Zytokine erfolgte zweimal, die Versorgung mit Feederzellen einmal pro Woche.

Expansion $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellklonen

Nach Isolation und Zellzahlbestimmung der $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellen wurden diese auf mehreren 96-Well-Platten ausgesät. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass sich 0,3 Zellen in 100 μl Medium befanden, sodass theoretisch eine Zelle in jedem dritten Well zu finden sein sollte. Dies wurde mikroskopisch überprüft und photodokumentiert. Die verbliebenen Zellen wurden zur späteren RNA-Isolation in β -RLT+ Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Um das Überleben der $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellklone zu gewährleisten wurden 2×10^4 bestrahlte, allogene Feederzellen hinzugefügt. Zusätzlich wurde das Medium mit 200 U/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA supplementiert. Die Supplementation der Zytokine erfolgte zweimal, die Versorgung mit Feederzellen einmal pro Woche.

Einfrieren von Zellen

Beim Einfrieren von Zellen wurde darauf geachtet, dass zügig gearbeitet wurde und sowohl Einfriermedium (90% Kulturmedium, 10% DMSO) als auch die Zentrifuge bereits auf 4°C gekühlt worden waren. Die Zellen wurden bei 300xg für 10 Minuten bei 4°C pelletiert, in Einfriermedium aufgenommen und in „Cryoboxen“ überführt. Diese Proben wurden bei -80°C

Material und Methoden

eingelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen von Zellen

Auch beim Auftauen von Zellen sollte darauf geachtet werden, dass Medium und Zentrifugen auf 37°C vorgewärmt sind und zügig gearbeitet wird, um den Verlust an Zellen minimal zu halten. Die in Kryoröhrchen tiefgefrorenen Zellen wurden aus dem Flüssigstickstofftank entnommen, auf Trockeneis gelagert und durch langsames Zirkulieren im Wasserbad aufgetaut, sodann rasch in 10 ml erwärmtes Mediums überführt. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 250 g bei 37°C zentrifugiert und in frischem Medium vorsichtig resuspendiert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen Ansätze auf die verschiedenen Zellpopulationen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden standardisierte Methoden und Verfahren angewendet. Individuell gestaltete PCR-Programme und Primer werden in den einzelnen Unterpunkten erläutert bzw. tabellarisch aufgelistet.

RNA-Isolation

Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) benutzt wobei wie im Protokoll des Herstellers angegeben vorgegangen wurde.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 10 min bei 300xg zentrifugiert, der Überstand wurde komplett abgenommen. Währenddessen wurde der RLT Plus Puffer aus 1 ml RLT Plus Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol hergestellt. War die Zellzahl kleiner als 5×10^6 wurden die Zellen in 350 µl RLT Plus Puffer lysiert, bei Zellzahlen bis 1×10^7 wurden 700 µl des RLT Plus Puffers eingesetzt. Nach Homogenisierung des Lysats wurde dieses auf eine QIA Shredder-Säule transferiert und 3 min bei 14000 rpm (Höchstgeschwindigkeit) zentrifugiert. Das Lysat wurde auf eine gDNA Eliminator Spin Säule geladen und 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert um genomische DNA zu entfernen. Dann wurde eine dem RLT Plus Puffer Volumen entsprechende Menge 70%iges Ethanol zugegeben und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Bis zu 700 µl der Probe wurden auf eine RNeasy Spin Säule geladen und 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde mit 700 µl des RW1 Puffers für 15 s bei 10000 rpm gewaschen, der Durchfluss wiederum verworfen. Als nächstes wurde die Säule mit 500 µl RPE Puffer beladen und 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert, erneut wurde der Überstand verworfen. Dieser Schritt wiederholt sich nun, jedoch wurde 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Um verbliebenes Ethanol aus der Säule zu entfernen wurde diese in ein neues Sammelgefäß (2 ml) gesetzt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der RNA kam die Säule in ein weiteres Sammelgefäß (1,5 ml) und wurde mit 30-50 µl RNase freiem Wasser 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert.

cDNA Synthese

Bei der Synthese von cDNA fand der Super Script® III First-Strand Synthesis SuperMix von Invitrogen (Groningen, Niederlande) Verwendung. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

Da die Zellzahlen, aus denen RNA während dieser Arbeit isoliert wurde, relativ klein waren, wurde auf eine Konzentrationsbestimmung verzichtet und immer das größtmögliche Volumen von 6 µl RNA zur cDNA Synthese eingesetzt. Diese 6 µl RNA wurden in PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt, dazu pipettierte man 1 µl Oligo(dT)-Primer (50 µM) und 1 µl Annealing-Puffer. Der Reaktionsmix wurde zur Denaturierung im Cyclor für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend für mindestens 1 min auf Eis gelagert, um eine Renaturierung zu vermeiden. Dazu kamen 10 µl 2x First-Strand Reaction Mix und 2 µl SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte durch Erhitzen auf 50 °C für 50 min und den anschließenden Abbruch der Reaktion durch weitere 5 min bei 85 °C. Danach wurden die Proben bei -20 °C eingelagert oder direkt für weitere Experimente eingesetzt.

PCR-Primer

Die Auswahl der Primer erfolgte auf der Basis von Publikationen, deren Sequenzen wurden mit Hilfe der NCBI-Datenbank verifiziert. Die Synthese vollzog die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland). Sie wurden als Lyophilisat geliefert, in DEPC-Wasser gelöst und aliquotiert (Konzentration 20 pmol/µl) und bei -20°C gelagert. Nicht genannte Primersequenzen können bei der AG Schilbach nachgefragt werden.

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR beruht auf der mehrfachen Wiederholung dreier Reaktionsschritte, die zusammen einen Zyklus bilden. Dabei wechseln sich Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen (Temperatur variiert nach GC-Gehalt der DNA und eingesetzter Taq-Polymerase), Anlagerung (Annealing) von spezifischen Oligonukleotidsequenzen (Primer) an die Einzelstränge und Elongation durch das Enzym Taq-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) und Zugabe der vier Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dTTP, dCTP und dGTP. So können in relativ kurzer Zeit geringe Mengen DNA quantitativ vervielfältigt bzw. gewünschte Produkte spezifisch angereichert werden.

Prinzip der nested PCR

Bei einer nested PCR werden die bereits bestehenden PCR-Produkte durch eine Wiederholung der PCR mit denselben oder anderen Primern erneut vervielfältigt und noch spezifischer angereichert. Es muss darauf geachtet werden, dass die sekundären Primer 5'-downstream bzw. 3'-upstream der Sequenz der primären forward bzw. reverse Primer

liegen. Denn bereits nach der ersten Runde der PCR bieten die nicht spezifischen Produkte keine komplementären Sequenzen für die inneren Primer mehr und können nicht mehr als Matrize genutzt werden. Wird in der zweiten PCR nur einer der beiden Primer verändert, spricht man von einer semi-nested PCR. Zur Detektion der Fragmente im Sequenzierer muss einer der beiden Primer, in der Regel der reverse Primer, ein bestimmtes Fluorochrom, z.B. FAM (Carboxyfluorescein) am 5'-Ende, tragen.

TRAV-Spectratype

Hierbei handelt es sich um eine semi-nested PCR zur Analyse des TCR α -Ketten Repertoires. Diese umfasst zwei PCR-Runden, die mit jeweils gleichen forward Primern jedoch unterschiedlichen reverse Primern und Bedingungen durchgeführt wurden. Das untersuchte TRAV-Repertoire umfasste 32 unterschiedliche TRAV-Segmente. Die Sequenzen der Primer und die PCR Bedingungen wurden von Han *et al*⁸⁶ übernommen und sind zusätzlich in Tabelle 6 sowie Tabelle 7 zu sehen.

Material und Methoden

Tabelle 6: Sequenzen der im V α -Spectratype verwendeten Primer, einschließlich der Zuordnung ihres TRAV-Segments

V α Familie	TRAV Segment	Primer-Sequenz	TRAC Segment	Primer-Sequenz
1A	8-4	TCTGGTATGTGCAATACCCCAACC	TCA4	GTTGCTCTTGAAGTCCATAGACC
1B	8-1	CTGAGGAAACCCTCTGTGCA	TCRAC	GCAGACAGACTTGTCACTGG
2	12-1	GATGGAAGGTTTACAGCACAGCTC		
3	17	CACAGTGAAGATTAAGAGTCACGC		
4A	26-2	AACAGAATGGCCTCTCTGGC		
4B	26-1	GGATTGCGCTGAAGGAAGAG		
5	6	TGAAGGTCACCTTTGATACCACC		
6	14DV4	AATCCGCCAACCTTGTCTCTCCG		
7	1-1	AACTGCACGTACCAGACATC		
8	13-1	ACCCTGAGTGTCCAGGAGGG		
9	16	CACTGCTGACCTTAACAAAGGCG		
10	27	TCCTGGTGACAGTAGTTACG		
11	2	AGGCTCAAAGCCTTCTCAGCAGGG		
12	19	TCCACCAGTTCCTTCAACTTCACC		
13	22	TTCATCAAAAACCCTTGGGGACAGC		
14	38-1	CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT		
15	5	GGATAAACATCTGTCTCTGCG		
16	3	AAGGGAATCCTCTGACTGTG		
17	23DV6	GATAGCCATACGTCCAGATG		
18	24	TGCCACTCTTAATACCAAGGAGGG		
19	41	ACACTGGCTGCAACAGCATC		
20	4	TTACAAACGAAGTGGCCTCC		
21	29DV5	ACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCC		
22	9-2	CTTGGAGAAAGGCTCAGTTC		
23	21	TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG		
24	10	TCCCAGCTCAGCGATTGAGCCTCC		
25	35	GTCCTGTCCTCTTGATAGCC		
26	34	AGCCCAGCCATGCAGGCATCTACC		
27	39	TTGATACCAAAGCCCGTCTC		
28	36DV7	GAACATCACAGCCACCCAGACCGG		
29	30	GCAAAGCTCCCTGTACCTTACGG		
30	20	TTTCTGCACATCACAGCCCC		
31	40	AGCAAAAACCTTCGGAGGCGG		
32	25	AAGGAGAGGACTTCACCACG		

Tabelle 7: Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Programm des V α -Spectratypes

PCR Name	PCR Mastermix		PCR Bedingungen
Vα-1	AmpliAq Gold DNA Polymerase	1U/reaction	12min 95°C;35x (30s 95°C, 30s 60°C, 90s 72°C)
	Primer 5'-TRAV	20 pmol	
	Primer 3'-TCA4	20 pmol	
	cDNA	1 μ l	
	H ₂ O	ad 25 μ l	
Vα-2	10x Puffer	1x	3x (2 min 95°C;2 min 60 °C; 10min 72°C)
	50mM MgCl ₂	2 mM	
	Primer 5'-TRAV	20 pmol	
	Primer 3'-TCRAC-FAM	20 pmol	
	PCR-Produkt	5 μ l	
	dNTPs	0,2 mM pro dNTP	
	Taq-Polymerase	0,5 U	
	H ₂ O	ad 20 μ l	

TRBV-Spectratype

Zur Detektion des TCR β -Ketten-Repertoires wurde eine zweistufige PCR durchgeführt, die aus einem initialen Denaturierungsschritt bestand, gefolgt vom eigentlichen PCR-Programm. Untersucht wurden 26 verschiedene TRBV-Segmente. Die Primersequenzen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Zusammensetzung der beiden Mastermixe und die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 8: Sequenzen der Primer für das V β -Spectratype, einschließlich der Zuordnung ihres TRBV-Segmentes

V β Familie	TRBV Segment	Primer Sequenz	TRBC Segment	Primer Sequenz
1	9	CTAAACCTGAGCTCTCTGGAG	C beta	GCTTCTGATGGCTCAAACACAG
2	20-1	GCTTCTACATCTGCAGTG		
3	28	CTGGAGTCCGCCAGCACC		
4	29-1	GCAACATGAGCCCTGAAG		
5-1	5-1,3	GATGAATGTGAGCACCTTGGA		
5-3	5-5,6,7,8	GCTGAATGTGAACGCCTTGTT		
6-1	7-2,8	GATCCAGCGCACACAGC		
6-2	7-3,5,6,9	GATCCAGCGCACAGAGC		
7	4-1,2,3	CCTGAATGCCCAACAGC		
8	12-3,4,5	CCAGCCCTCAGAACCCAG		
9	3-1,2	CCCTGGAGCTTGGTGACTCTG		
10	21-1	CCAGTCCACGGAGTCAGG		
11	25-1	CCCTGGAGTCTGCCAGGC		
12	10-3	CTCTGGAGTCCGCTACCAG		
13	6-5	GCTCAGGCTGCTGTCTGGCTGC		
14	27	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGG		
15	24-1	CCCTAGAGTCTGCCATCC		
16	14	GGTGCAGCCTGCAGAAC		
17	18	GGATCCAGCAGGTAGTGC		
18	30	CCTCCTCAGTGACTCTGGC		
19	19	CACTGTGACATCGGCCAAAAG		
20	23-1	CCTGTCCTCAGAACCGGG		
22	13	CTGAACATGAGCTCCTTGG		
23	2	CCGGTCCACAAAGCTGGA		
24	15	CATCCGCTCACCAGGCCTG		

Material und Methoden

Tabelle 9: Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Programm des V β -Spectratypes

PCR Name	PCR Mastermix		PCR Bedingungen
V β - Denaturierung	10x Puffer	1x	4min 99°C; 1min 80°C; 5min 4°C
	50mM MgCl ₂	2 mM	
	Primer 5'-TRBV	20 pmol	
	Primer 3'-TRBC	20 pmol	
	cDNA	1 μ l	
	H ₂ O	ad 15 μ l	
V β - Spectratype	dNTPs	0,2 mM pro dNTP	4min 94°C; 40x (45s 94°C; 30s 55°C; 43s 72°C); 7min 72°C
	Taq-Polymerase	0,5 U	
	H ₂ O	ad 5 μ l	

J β -PCR

Zur Subklassifizierung des V β -Kettenrepertoires wurden PCRs mit den Bedingungen und forward Primern des TRBV-Spectratypes jedoch anderen reverse Primern, spezifisch für die 13 J β -Segmente des humanen Genoms, durchgeführt (Tabelle 10). Die Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt, mit GelRed gefärbt und auf dem LI-COR Odyssey Fc visualisiert.

Tabelle 10: Sequenzen der Primer für die J β -PCR, einschließlich der Zuordnung ihres TRBJ-Segmentes

J β Familie	TRBJ Segment	Primer Sequenz
1-S1a	1-1	TGAGTCTGGTGCCTTGTCCAAA
1-S2	1-2	TTAACCTGGTCCCCGAACCGAA
1-S3	1-3	TGAGCCAACTTCCCCTCTCCAAA
1-S4	1-4	AGAGCTGGGTTCCTACTGCCAAA
1-S5	1-5	AGAGTCGAGTCCATCACAAA
1-S6	1-6	TGAGCCTGGTCCCGTTCCAAA
2-S1	2-1	TGAGCCGTGTCCCTGGCCCGAA
2-S2	2-2	TCAGCCTAGAGCCTTCTCCAAA
2-S3	2-3	TCAGCCGGGTGCCTGGGCCAAA
2-S4	2-4	AGAGCCGGGTCCCGGCGCCGAA
2-S5	2-5	GGAGCCGCGTGCCTGGCCCGAA
2-S6	2-6	TCAGCCTGCTGCCGGCCCCGAA
2-S7	2-7	TGAGCCTGGTGCCCGGCCCGAA

TRDV-Spectratype

Zur Analyse des TCR δ -Ketten-Repertoires wurde wie beim TRAV-Spectratype eine semi-nested PCR durchgeführt. Zwei unterschiedliche reverse Primer, die sich im C δ -Segment befinden, sorgten für eine hochspezifische Anreicherung der exprimierten TCR δ -Ketten. Die Primersequenzen von C δ 1 und C δ 2 und PCR-Bedingungen wurden von Gatenby *et al*⁸⁷ übernommen. Die Sequenzen der acht forward Primer befinden sich in den V δ -Segmenten des TCR δ -Locus. Bei Interesse kann die genaue Sequenz bei der AG Schilbach erfragt werden.

TRGV-Spectratype

Auch für das TCR γ -Ketten-Repertoire wurde eine semi-nested PCR genutzt. Die zwei unterschiedlichen reverse Primer, die sich im C γ -Segment des TCR γ -Locus befinden, und die PCR Bedingung stammen von Gatenby *et al.* ⁸⁷, die Sequenzen der forward Primer für die 5 V γ -Segmente können bei PD Dr. Karin Schilbach erfragt werden. Zur Unterscheidung der beiden TRGC-Segmente, C γ 1 und C γ 2, wurden je ein neuer forward und reverse Primer hergestellt (Tabelle 11). Die Bedingungen und der Reaktionsansatz des Mastermixes für die C γ -PCR entsprachen dem des TRDV- und TRGV-Spectratypes.

Tabelle 11: Sequenzen der zur Differenzierung von C γ 1- und C γ 2-Segmentes eingesetzten Primer

Primer	Primer Sequenz
Cy forward	ATGTTCCAGCCTTCTGGAG
Cy reverse	GACCACACTCTTGAGGAGCAG

Agarose Gel-Elektrophorese

Es wurden 2%ige Agarosegele aus 1x TBE Puffer und Agarosepulver von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) hergestellt. Unter Erhitzen wurden die Gele geschmolzen, leicht abgekühlt und in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Nach etwa 30 min waren sie ausgehärtet und konnten mit den Proben beladen werden. Diese wurden zuvor 1:5 mit dem 6x loading dye gemischt. Dabei wurden von dem Marker 1,5 μ l eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE Puffer verwendet. Je nach Größe der Gele wurden diese 1 h bei 80 V oder 1,5 h bei 110 V laufen gelassen. Als Positiv-Kontrolle für die Validität der PCR-Produkte wurde das in Zellen ubiquitär exprimierte Molekül β -Aktin verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes und die PCR-Bedingungen entsprachen denen des V β -Spectratypes. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 12 zu finden.

Tabelle 12: Sequenzen der Primer für die β -Aktin PCR

Primer	Primer Sequenz
β -Aktin forward	ATCTGGCACCACCTTCTACAATGAGCTGCG
β -Aktin reverse	CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC

GelRed-Färbung

Zur Anfärbung der Agarosegele wurde der Farbstoff GelRed in einer Verdünnung von 1:20000 direkt in das noch flüssige Agarosegel gegeben oder das Gel nachträglich gefärbt. Die Gelbanden wurden im LI-COR Odyssey Fc visualisiert.

Quantitative Realtime PCR

Eine der modernsten Methoden zur Quantifizierung von DNA-Proben ist die Realtime PCR. Dabei wird jedoch nicht die Menge an synthetisiertem Produkt gemessen, sondern man zieht anhand der Reaktionskinetik Rückschlüsse auf die Expression des Produkts. Die

untersuchten Genprodukte, der PCR-Mastermix sowie PCR Bedingungen sind unter Tabelle 13 aufgelistet. Die Sequenzen der Primer können bei Interesse bei der AG Schilbach erfragt werden. Zur Durchführung der Realtime PCR gibt es verschiedene Ansätze. In dieser Arbeit wurde fast ausschließlich mit SYBR® Green I, einem Farbstoff, der in doppelsträngiger DNA interkaliert, die PCR aber nicht inhibiert, gearbeitet. Steigt nun die Menge an doppelsträngiger DNA, steigt automatisch auch die Fluoreszenz.

Tabelle 13: Mastermix und Bedingungen der mit SYBR Green durchgeführten Realtime PCRs

PCR Mastermix		Gen	PCR Bedingungen
SYBR Green I	10µl	FoxP3	95°C 10min 50x (95°C 10s; 68°C 10s; 72°C 16s) + Schmelzkurve
Primer forward	20 pmol	Granzym B	95°C 5min 40x (95°C 30s; 62°C 45s;) + Schmelzkurve
Primer reverse	20 pmol	Perforin	95°C 5min 40x (95°C 30s; 58°C 45s) + Schmelzkurve
cDNA	10ng	RORC	95°C 10min 35x (95°C 10s; 68°C 10s; 72°C 16s) + Schmelzkurve
H ₂ O	Ad 20µl	T-bet	95°C 5min 40x (95°C 30s; 60°C 45s) + Schmelzkurve

Die Expression des untersuchten Gens wurde mit der eines Haushaltsgens (housekeeping gene) verglichen. Hierzu wurde Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet. Zuerst wurde der $\Delta C(t)$ Wert aus der Differenz des C(t) des Zielgens und des C(t) des Referenzgens berechnet. Über die Formel $2^{-\Delta C(t)}$ wurde das Verhältnis der Expression des Zielgens gegenüber GAPDH ermittelt.

Der Nachweis von preT α wurde mit einem kommerziell erhältlichen Gene-Expressionassay von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. PCR-Bedingungen und der Mastermix des Reaktionsansatzes entsprachen den Angaben des Herstellers.

Kapillar-Elektrophorese

Zur Kapillar-Elektrophorese wurde der 3130xl Genetic Analyzer von Life Technologies benutzt. Da die Produkte der verschiedenen Spectratypes durch den mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten reverse Primer amplifiziert wurden, konnten sie von einem Laser im Gerät angeregt und ihre Emission gemessen werden. Mit dem Auswertungsprogramm GeneMapper v4.0 und dem verwendeten Größenstandard GeneScan™ 600 LIZ® von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) konnten die detektierten Emmissionspeaks als Fragmentlängen in Basenpaaren angegeben werden. Als Kontrolle wurden hierbei die Spectratypes der PBMNC cDNA ausgewertet. Da der Größenstandard und die PCR-Produkte lichtempfindlich sind, sollte im Dunkeln gearbeitet werden.

Die PCR-Produkte wurden 1:10 mit RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt. Danach wurde ein Mastermix aus 13,5 µl Hi-Di Formamid und 0,5 µl des Größenstandards erstellt und jeweils 14 µl pro PCR-Reaktionsgefäß verteilt. Zu den 14 µl des PCR-Ansatzes wurde 1 µl verdünntes PCR-Produkt gegeben und für 2 min bei 94°C denaturiert, danach wurden die Proben mindestens 2 min auf Eis aufbewahrt. Dieser Mix wurde durch Auf- und Abpipettieren

Material und Methoden

noch einmal ordentlich gemischt, je 10 µl auf eine 96-well Platte gegeben und im Sequenzer analysiert.

Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Didesoxymethode oder Kettenabbruchmethode, die von Sanger und Coulson in den 70er Jahren entwickelt wurde. Im PCR-Ansatz befanden sich die vier mit unterschiedlichen Fluorochromen gelabelten Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dTTP, dCTP und dGTP. Diese wurden durch ein Enzym zur Amplifikation in das spezifische Produkt eingebaut. Die Fluorochrome wurden durch einen Laser angeregt und emittierten Licht in einer bestimmten Wellenlänge. Diese Signale wurden vom Sequenzierer detektiert und in einem Elektropherogramm dargestellt.

Zur Sequenzierung vorgesehene PCR-Produkte wurden mit einem ungelabelten reverse Primer mit den entsprechenden PCR-Bedingungen quantifiziert. Anschließend wurden sie mit dem Mini Elute PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration mit dem NanoDrop bestimmt. Je nach Länge des Fragments wurden 1,5 – 3 ng in der Sequenzierungs-PCR mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Der PCR-Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 14 zu finden.

Tabelle 14: Mastermix und Bedingungen für einen Sequenzierungsansatz

PCR Name	PCR Mastermix		PCR Bedingungen
Denaturierung	5x Puffer	1x	5min 98°C; 5min 4°C
	Primer	1,8 pmol	
	DMSO	5%	
	H ₂ O	ad 9,5 µl	
Sequenzierung	BigDye Terminator v3.1 Mix	0,5 µl	96°C 1min; 25x (96°C 10s, 50°C 5s, 60°C 4min)

Ethanol-Präzipitation

Nach erfolgter PCR schloss sich eine Ethanol-Präzipitation zur Aufreinigung der Sequenzierungs-Produkte an. Die PCR-Produkte wurden mit 250 nM EDTA, 1,5 M Natriumacetat und 100% Ethanol 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in der Tischzentrifuge 30 Minuten bei 4° C mit 14000 rpm zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 70% Ethanol aufgenommen und weitere 15 min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Tubes blieben geöffnet unter der Bench im Dunkeln stehen, bis sich sämtliches Ethanol verflüchtigt hatte (mindestens eine Stunde). Die gefällten Produkte wurden in Formamid aufgenommen und auf dem 3130xl Genetic Analyzer analysiert, die Auswertung erfolgte mit der Sequence Analysis Software v.5 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland).

3. Ergebnisse

Nach einem Überblick über das Immunsystem und die verschiedenen T-Zellpopulationen sowie der eingesetzten Materialien und Methoden folgt nun die Sammlung der in dieser Arbeit neu gewonnenen Daten und Erkenntnisse. Anhand zahlreicher Abbildungen und Tabellen werden die Ergebnisse der verschiedenen Themenbereiche anschaulich dargestellt. Sofern die Stichprobenanzahl dies zuließ wurden die Daten statistisch ausgewertet.

3.1. Validierung der Hämatopoese-restringierten SNPs

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) sind natürlich vorkommende Punktmutationen der Nukleotidsequenz, durch die ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird. Dies hat möglicherweise Auswirkungen auf die durch das veränderte Basentriplett (Codon) codierte Aminosäure und damit Folgen für die Struktur des daraus sich zusammensetzenden Proteins. Translatiert das veränderte Codon die gleiche Aminosäure wie die ursprüngliche Sequenz, spricht man jedoch von einem synonymen SNP. Änderungen in der Aminosäuresequenz können unterschiedliche Auswirkungen auf die Faltung, Funktion und Bindungsaffinität des Proteins haben, je nachdem in welchem Bereich der SNP liegt. In der Behandlung von Tumoren kommt SNPs eine besondere Bedeutung zu, da sie in den meisten Fällen in Genen vorkommen, die eine Gewebe-restringierte Expression aufweisen. Für die folgenden Experimente wurden Hämatopoese-restringierte SNPs ausgewählt.

Da die Zielstruktur der T-Zellen sich somit nur auf den Zellen der Hämatopoese befindet, erfolgt ein Angriff und die Elimination nur im hämatopoetischen System, resultiert also in der Vernichtung der Leukämiezellen des Empfängers. Dies hat nicht nur den gewünschten antileukämischen Effekt, sondern beschränkt die möglichen Nebenwirkungen durch CD8+ Peptid-spezifische T-Zellen auf ein Minimum. So ist davon auszugehen, dass die Schädigung von Organen (Leber, Niere) entfällt.

Sieben HLA-typisierte Spender (Tabelle 15) wurden auf die Expression der zu validierenden SNPs per Sanger-Sequenzierung der relevanten PCR-Produkte aus allelisch diskriminierenden PCRs getestet und dann CD8+ CD45RO- T-Zellen, also naive CD8+ T Zellen, aus ihrem Blut isoliert.

Ergebnisse

Tabelle 15: HLA-Allele und Zielgene der sieben gesunden Spender zur Expansion SNP-spezifischer T-Zellen

Donor	HLA-Restriktion	Zielgene
P1	HLA-A*02	HMHA1, BTN3A1, PTPRC, STK10, TRAF3IP3
P2	HLA-A*02	HMHA1, BTN3A1, PTPRC, STK10, TRAF3IP3
P3	HLA-A*02/*03	HMHA1, BTN3A1, PTPRC, STK10, TRAF3IP3, DPYD
P4	HLA-A*03/*11	DPYD
P5	HLA-A*02	HMHA1, BTN3A1, PTPRC, STK10, TRAF3IP3
P6	HLA-A*03	DPYD
P7	HLA-A*02	HMHA1, BTN3A1, PTPRC, STK10, TRAF3IP3

Dabei stellte sich heraus, dass die meisten der Probanden heterozygot für die SNPs waren, folglich nicht die Möglichkeit der Generierung einer Peptid-spezifischen Antwort besteht. Zwei Sequenzen eines Probanden sind in Abbildung 5 zu finden. Um die Generierung von SNP-spezifischen T-Zellen zu gewährleisten, müssen die Allele des immunogenen SNPs beim Spender homozygot vorliegen. Die SNP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen werden nur effizient sein, wenn eine Disparität der SNPs bei Spender und Empfänger vorliegt. Der Spender muss homozygot für die nicht-immunogene, der Empfänger dagegen sollte heterozygot, im Besten Fall homozygot, für die immunogene Variante sein.

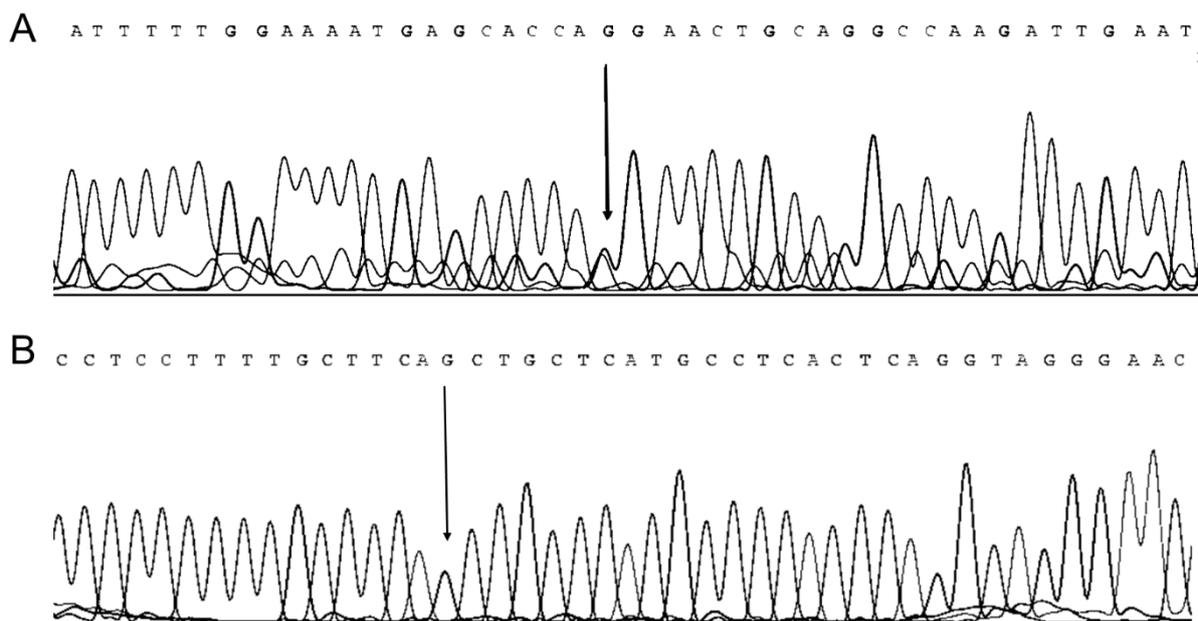


Abbildung 5: Nukleotidsequenzen zweier zu untersuchender Gene eines HLA-A*02+ Probanden (A) TRAF3IP3: der Pfeil markiert die Position des SNPs. Deutlich zu erkennen ist die Überlagerung der Signale von Guanin und Thymin (B) BTN3A1: Keine Überlagerung der Sequenz zu erkennen, Gen liegt homozygot in seiner nicht-immunogenen Variante vor

3.2. Expansion von SNP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Zur Generierung SNP-Peptid-spezifischer T-Zellen wurden aus einem Pool von mehreren hundert Genen, die Hämatopoese-restringierte SNPs enthalten, 16 Gene (Tabelle 16) mit hoher Allelfrequenz ausgewählt. Weitere Auswahlkriterien waren die HLA-Restriktion des

Ergebnisse

abgeleiteten SNP-Peptides, also die Häufigkeit der HLA Variante von der das SNP Peptid präsentiert werden würde, sowie der zu erwartende Bindungswert des MHC-Peptid Komplex. Bestimmt wurde der Bindungswert mittels der Analyse der jeweiligen Aminosäuresequenz in der SYFPETHI-Datenbank (<http://www.syfpeithi.de>). Für eine effiziente Präsentation sollte dieser Bindungswert möglichst hoch sein. Die aus den SNPs der 16 Gene abgeleiteten Peptide sollten auf ihre Immunogenität untersucht und durch Expansion SNP-spezifischer T-Zellen verifiziert werden.

Tabelle 16: Auflistung der gewählten 16 Gene, inklusive HLA-Restriktion, Bindungswert und Aminosäuresequenz der natürlich vorkommenden und der SNP-Aminosäuresequenz

Gen	HLA-Restriktion	Bindungswert	Half max score	Sequenz
HMHA1	A*0201	23	18	VL R DDLLEA
		23		VL H DDLLEA
BTN3A1	A*0201	27	18	LLL NF RVCL
		27		LLL NF HVCL
DPYD	A*0301	23	22	TL C STSAKK
		26		TL R STSAKK
ZC3HAV1	B*0702	24	15	Q PKATTSSVSL
		25		E PAKTSSVSL
PTPRC	A*0201	24	18	G IDAMLEGL
		23		R IDAMLEGL
STK10	A*0201	23	18	GL T EPQIQV
		23		GL K EPQIQV
TRAF3IP3	A*0201	25	18	Q LQAKIECL
		22		E LQAKIECL
LAPTM5	A*0301	26	22	SVEEK R NSK
		25		SVEEK K NSK
TRIM38	A*0201	23	18	GIFLDYEAG V
		22		GIFLDYEAR V
STK38	A*0201	25	17	ILVEA D SLWV
		25		ILVEA N SLWV
BTN2A1	A*0101	25	19,5	AQENGTY R CY
		25		AQENGTY C CY
LRCH4	A*0301	30	21	GLRTALEA V K
		27		GLRTALEA M K
AKNA	B*0702	22	16,5	RPPPGLW Y L
		22		RPPPGLW C L
GRK6	A*0101	27	20	GGDLKFH I Y
		27		GGDLKFH M Y
WIPF1	B*2705	28	19	RRERGA P PL
		27		RRERGA G PPL
NLRC5	A*0201	24	18	LL V GQLMET
		26		LL A GQLMET

Zur Generierung von SNP-spezifischen CD8+ T-Zellen sollten naive T-Zellen eingesetzt werden, denn nur naive T-Zellen können geprimed und expandiert werden. Naive T-Zellen exprimieren die Isoform CD45RA im Gegensatz zu Antigen-erfahrenen T-Zellen, die CD45RO+ sind. Nach Positiv-Isolation von CD8+ T-Zellen aus Lymphozyten des peripheren

Ergebnisse

Bluts der Spender wurden CD45RO+ Zellen depletiert und die Reinheit der CD8+ CD45RO- T-Zellen im FACS überprüft (Abbildung 6).

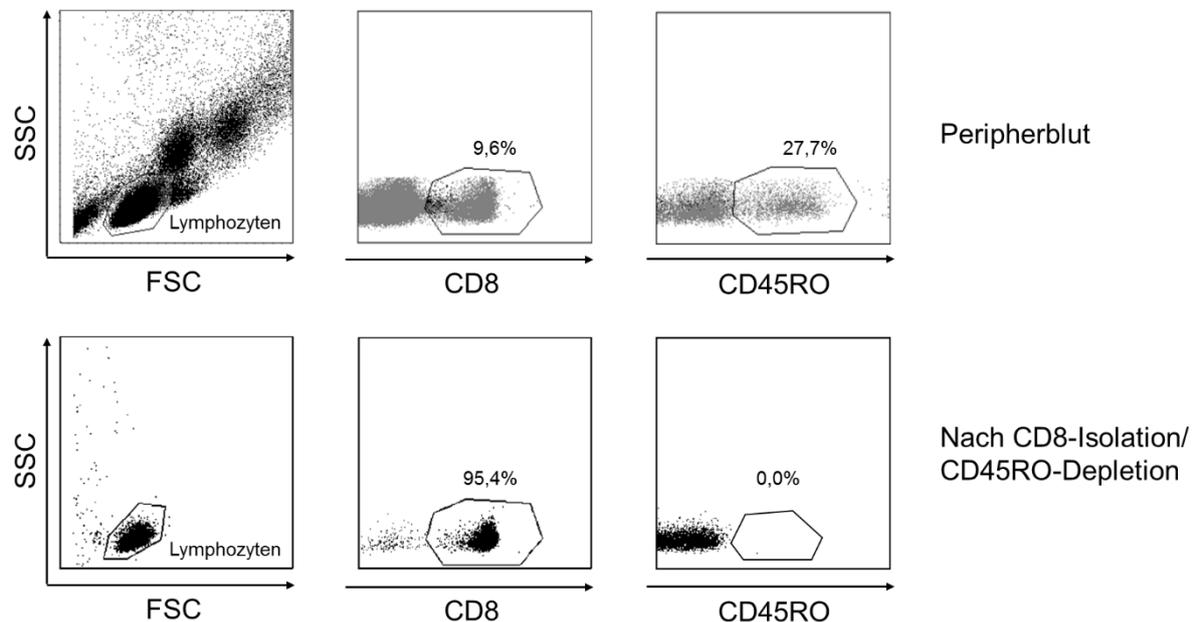


Abbildung 6: FACS zur Reinheitsprüfung der zur Expansion eingesetzten T-Zellen, nach CD8-Isolation und CD45RO-Depletion, beispielhaft gezeigt für einen Probanden

Die isolierten CD8+ CD45RO- T-Zellen wurden nur zur Induktion und Generierung SNP-spezifischer T-Zellen verwendet, wenn die Reinheit der isolierten CD8+ T-Zellfraktion >95% war und keine CD45RO+ Zellen mehr enthalten waren.

In keinem der Ansätze konnten nach vier Wochen SNP-spezifische T-Zellen im FACS mit dem spezifischen MHC-Pentamer nachgewiesen werden. Ein geringer Prozentsatz war CD137+ (~0,3%), was sich jedoch nicht mit dem Nachweis von SNP-spezifischen T-Zellen vereinen ließ (Abbildung 7). CD137 (4-1BB) ist ein kostimulatorisches Molekül, das nach Stimulation mit einem spezifischen Antigen/Peptid auf CD4+ oder CD8+ T-Zellen zu finden ist. Die Spezifität von CD137+ T-Zellen wurde in unterschiedlichen Arbeiten mit MHC-Tetrameren im FACS validiert ^{88,89}.

Ergebnisse

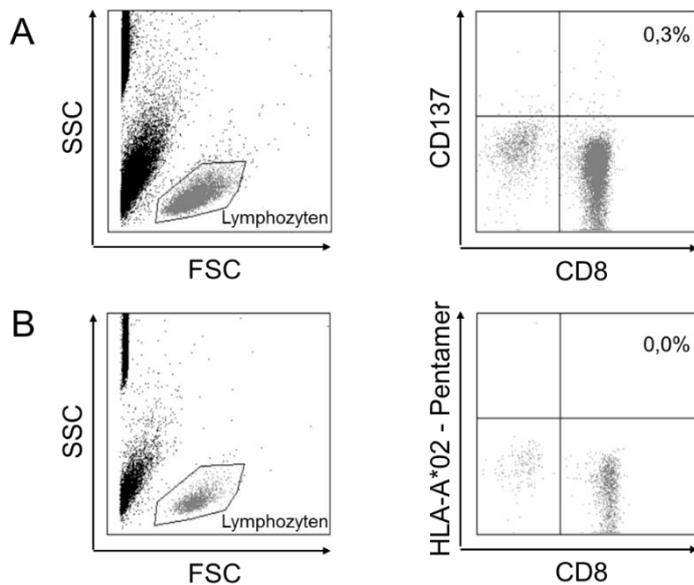


Abbildung 7: (A) Expression von CD137+ und (B) MHC-Pentamer spezifischen CD8+ T-Zellen nach vier Wochen Kultivierung mit einem HLA-A*02 assoziierten SNP-Peptid gepulsten Feederzellen, exemplarisch gezeigt für einen Probanden

Auch die Isolation der entstandenen CD137+ T-Zellen per MACS und deren weitere Kultivierung resultierte nicht in der Expansion SNP-spezifischer T-Zellen. Die so gewonnenen T-Zellen gingen innerhalb relativ kurzer Zeit zu Grunde.

Die untersuchten SNPs sind demnach nicht immunogen. Von weiteren Versuchen wurde aufgrund des zeitintensiven Aspekts der Experimente abgesehen. Vielversprechender könnte ein Exomscreening von Patient und Spender sein um a) die jeweils individuellen SNPs und die Disparität zwischen Spender und Empfänger zu detektieren und um b) eventuelle Tumorgewebe-restringierte Neoantigene zu identifizieren. Anhand dieser Informationen ist es möglich einen Peptidcocktail aus den SNP-disparaten Peptiden herzustellen um Gewebe-spezifische T-Zellen im Spender, bzw. Tumor-spezifische T-Zellen im Patienten zu induzieren.

3.3. Bulk V δ 1-Kulturen

Bulk V δ 1-Kulturen bestehen aus der Gesamtheit der peripheren V δ 1 T-Zellpopulation und enthalten sowohl DN V δ 1 T-Zellen, CD8+ V δ 1 T-Zellen als auch CD4+ V δ 1 T-Zellen. In verschiedenen experimentellen Ansätzen soll untersucht werden, wie dynamisch die Kulturen auf die Stimulation oder bei Blockierung verschiedener Moleküle reagieren. Wie bereits in vorangehenden Experimenten von der AG Schilbach gezeigt, besitzen V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen die Fähigkeit zur Transdifferenzierung in $\alpha\beta$ T-Zellen. Jedoch gelingt dies nicht in jedem der Ansätze in gleichem Ausmaße. Der Prozentsatz an entstandenen $\alpha\beta$ T-Zellen reicht von 1,0 – 90% der Zellen. Um ein formales Rezept, das dieser Transdifferenzierung zu Grunde liegt, zu evaluieren, wurden unterschiedliche Kultivierungsansätze getestet.

3.4. Isolation von V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen

V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen wurden per MACS isoliert wie unter 2.2.1 beschrieben. Die gewonnenen V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen wurden nur zur Kultivierung verwendet, wenn die Reinheit > 98% war und sie keine TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen mehr enthielten (Abbildung 8). V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen sind CD3+ und in der Mehrzahl DN (80%), etwa 20% tragen als Korezeptor CD8 und nur sehr wenige exprimieren CD4. In manchen Spendern beträgt der Prozentsatz von CD4+ V δ 1 T-Zellen im Blut weniger als 0,1% oder es sind gar keine dieser Zellen nachweisbar.

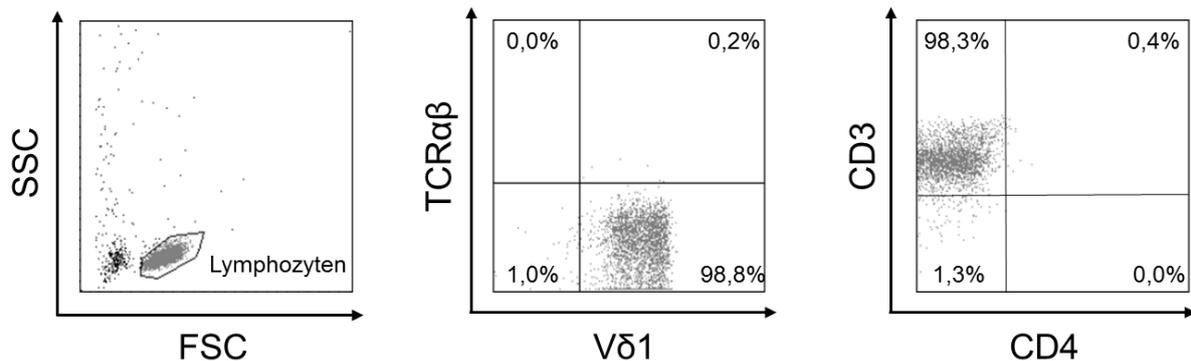


Abbildung 8: FACS-Dot Plots zur Überprüfung der Reinheit von V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen nach Isolation, exemplarisch gezeigt für einen Probanden

3.4.1. Kultivierung von Bulk V δ 1 T-Zellen mit allogenen und autologen Feederzellen

Die Herkunft der verwendeten Feederzellen hat möglicherweise einen Einfluss auf die Entwicklung der V δ 1+ T-Zellen in Kultur, auch wenn $\gamma\delta$ T-Zellen in der Regel nicht MHC-restringiert sind^{90,91}. Deshalb sollte geprüft werden ob allogenes oder autologes Setting sich darin unterscheiden, die Transdifferenzierung zu fördern oder zu inhibieren. Die Experimente bestätigten, dass die Herkunft bzw. der Spender der Feederzellen keinen Einfluss auf die Entstehung von $\alpha\beta$ T-Zellen hat. Transdifferenzierung kann im Kontext mit allogenen oder autologen Feederzellen stattfinden.

3.4.2. Verwendung α -CD3/ CD28 stimulierter PBMNCs als Feederzellen

Durch die Stimulation von PBMNCs im Verhältnis 1:1 mit α -CD3/CD28 Beads ist es möglich, die darin enthaltenen T-Zellen unspezifisch zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen. Verschiedene Oberflächenmoleküle wie u.a. MHC I und II, CD14, CD40, CD154, Fas und Fas-Ligand wurden 24h nach Stimulation mit α -CD3/CD28 Beads und 50 U/ml IL-2 per FACS untersucht. Als Kontrolle dienten mit 50 U/ml IL-2 supplementierte PBMNCs.

Es zeigten sich keine Expressionsunterschiede durch die Stimulation mit α -CD3/CD28 Beads bei MHC I, MHC II, CD40, CD154, Fas und Fas-Ligand gegenüber den unstimulierten PBMNCs (Abbildung 9), die Expression des MHC-ähnlichen Moleküls MICA/B stieg jedoch stark an. CD14+ Zellen wie Monozyten oder Makrophagen verschwanden durch die Stimulation mit α -CD3/CD28 Beads nach 24 Stunden.

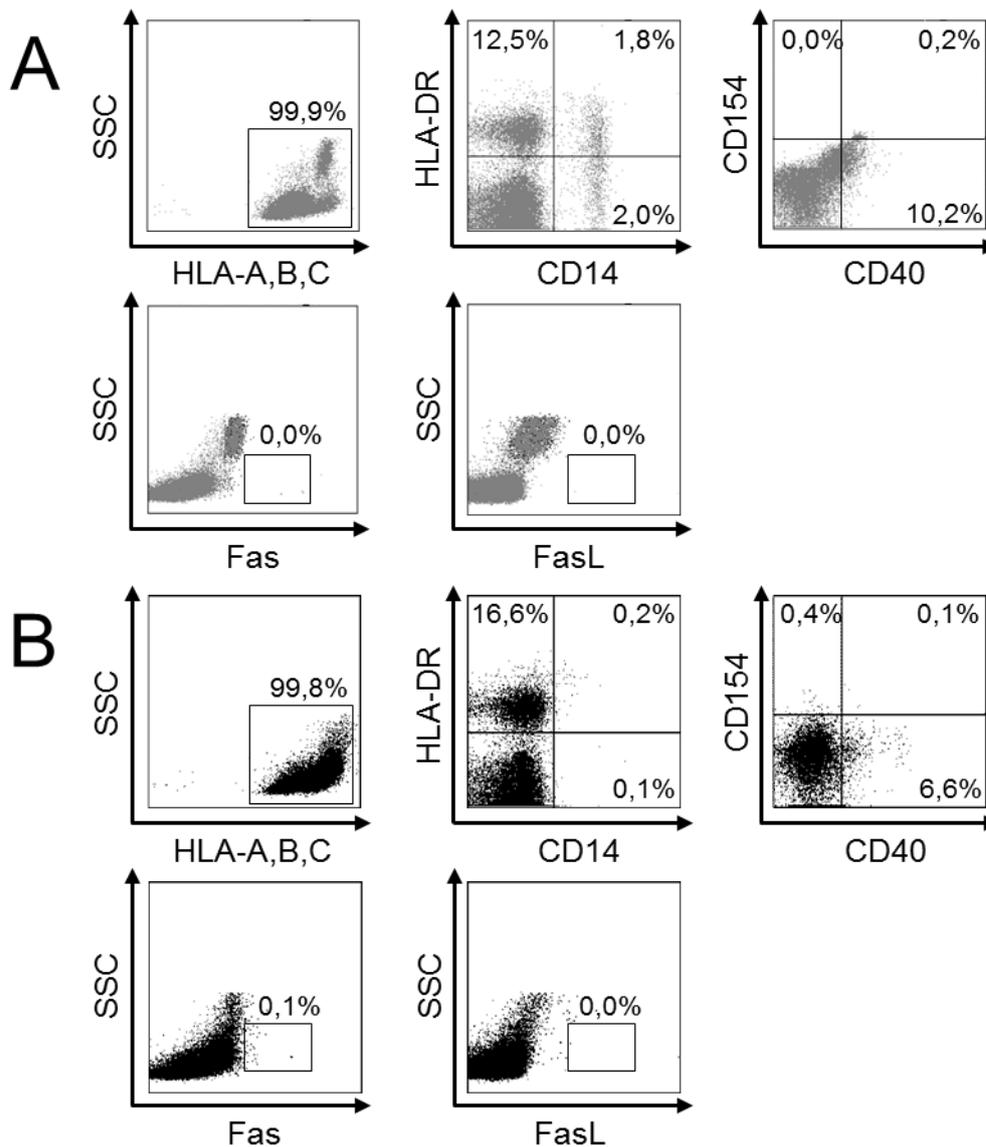


Abbildung 9: Expression verschiedener Oberflächenmoleküle bei (A) unstimulierten Feederzellen und (B) mit α CD3/CD28 Beads stimulierten Feederzellen jeweils nach 24 Stunden Kultivierung

3.4.3. Expression von MICA/B auf den verwendeten Feederzellen

MICA/B ist ein MHC-ähnliches Molekül und ein Ligand für NKG2D, einem natürlichen Killerrezeptor, der von NK-Zellen^{92,93}, sowie einigen zytotoxischen T-Zellen^{94,95}, und auch iNKT Zellen⁹⁶ und $\gamma\delta$ T-Zellen⁹⁷ exprimiert wird. In Zusammenhang mit V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen kommt MICA/B eine besondere Bedeutung zu, denn MICA/B gilt als der einzige für V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen bekannte TCR Ligand^{98,99}. So konnten Groh *et al* zeigen, dass die Anzahl von V δ 1+ $\gamma\delta$ Tumor-infiltrierenden T-Zellen bei Tumoren mit starker MICA/B-Expression immens erhöht ist¹⁰⁰.

Die Expression von MICA/B auf PBMCs, die als Feederzellen eingesetzt wurden, war 24h nach α -CD3/CD28 Stimulation stark erhöht (Abbildung 10). Vor allem CD4+ und CD8+ T-Zellen, die durch den Stimulus über CD3/CD28 aktiviert werden, exprimieren MICA/B. Ein

Ergebnisse

Nebeneffekt der Behandlung scheint die nahezu vollständige Entfernung von CD14+ Zellen zu sein.

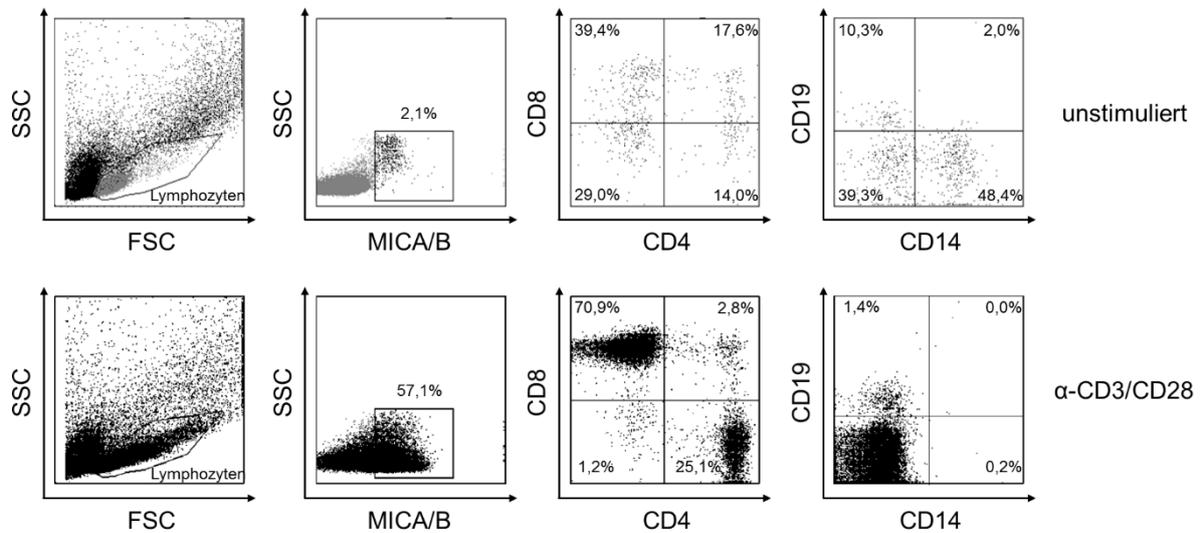


Abbildung 10: MICA/B-Expression von unstimulierten und α -CD3/CD28 stimulierten Feederzellen nach 24h, sowie Charakterisierung der MICA/B+ Zellen nach CD4 – CD8 und CD14 – CD19

3.4.4. Blockieren von Oberflächenmolekülen auf den verwendeten Feederzellen

Da der Auslöser der Transdifferenzierung von $V\delta 1+$ T-Zellen zu $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen nicht bekannt, jedoch möglicherweise Zellkontakt-abhängig ist, wurden verschiedene Oberflächenmolekül-spezifisch blockierende Antikörper eingesetzt. In unterschiedlichen Ansätzen wurden die Auswirkungen des Blockierens von HLA-A, B, C (MHC I), HLA-DR (MHC II), DLL4 und MICA/B untersucht. Folgende Erkenntnisse konnten dadurch gewonnen werden:

Die Blockierung von MHC I und II hatte keinen Einfluss auf die Entstehung von $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen, jedoch wirkte es sich auf die Korezeptorexpression der Bulk $V\delta 1+$ T-Zellen aus. Durch die Blockade von MHC I stieg die Anzahl $CD4+$ $V\delta 1+$ T-Zellen gegenüber $CD8+$ $V\delta 1+$ T-Zellen im Zuge der Kultivierung stark an. Im Gegensatz dazu führte das Blocking von MHC II zu einem starken Anstieg von $CD8+$ $V\delta 1+$ T-Zellen und wenigen $CD4+$ $V\delta 1+$ T-Zellen (Abbildung 11). Die nicht vorhandene Präsenz der Moleküle fördert folglich die Entstehung der konträren Population. $CD8+$ T-Zellen benötigen zum Überleben bzw. zur Proliferation Kontakte über MHC I ebenso wie $CD4+$ T-Zellen Kontakte durch MHC II. Anzumerken ist außerdem, dass nahezu alle verbliebenen $V\delta 1+$ T-Zellen, die in Kultur mit MHC I geblockten Feederzellen waren, einen Korezeptor exprimieren und somit der Anteil der doppelt negativen $V\delta 1+$ T-Zellen sehr gering (6,3%) ist. In Kultur mit MHC II geblockten Feederzellen hingegen behält der Großteil der $V\delta 1+$ T-Zellen (50,8%) seinen doppelt negativen Charakter und exprimiert keinen Korezeptor.

Ergebnisse

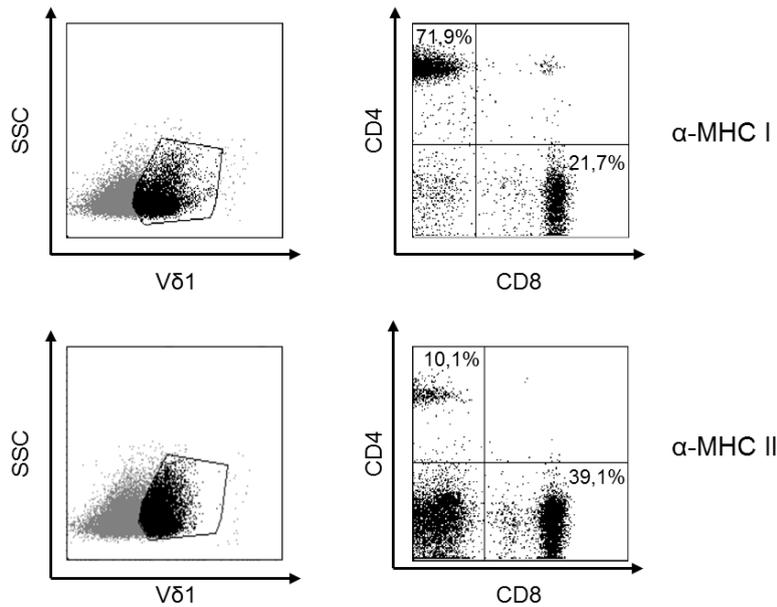


Abbildung 11: Auswirkungen der Blockierung von MHC I und MHC II auf die Korezeptorexpression von Bulk V δ 1 T-Zellen (n=1)

Delta-like Ligand 4 (DLL4) ist Mitglied der Notch-Familie und an unterschiedlichen Signalkaskaden bei $\gamma\delta$ T-Zellen involviert¹⁰¹. Durch die Blockierung dieses Moleküls wurde die Transdifferenzierung von V δ 1 Bulk T-Zellen zu $\alpha\beta$ T-Zellen bei zwei Probanden etwas erhöht (Abbildung 12). Auf die Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 hatte die Blockierung von DLL4 keinen signifikanten Einfluss, weder bei den entstandenen TCR $\alpha\beta$ T-Zellen noch bei den verbliebenen V δ 1+ T-Zellen.

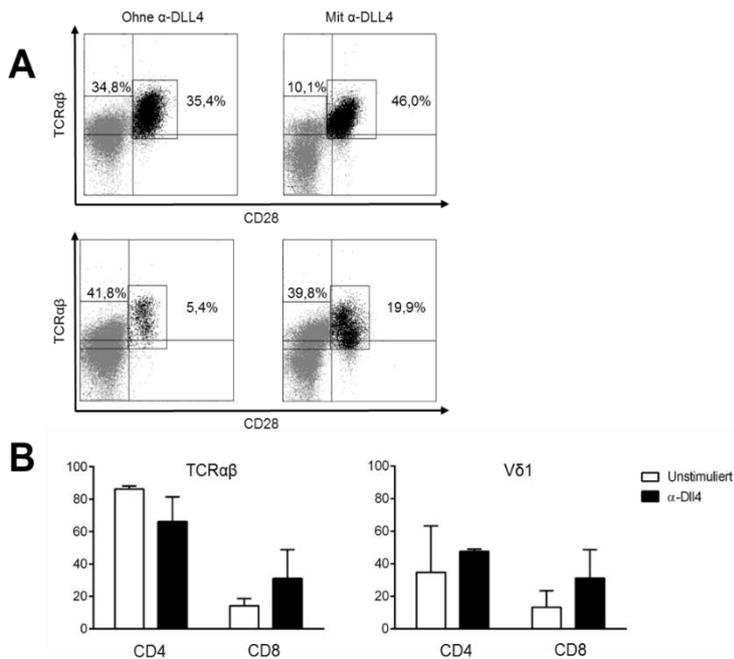


Abbildung 12: Einfluss der Blockierung von α -DLL4 auf (A) die Transdifferenzierung von $\alpha\beta$ T-Zellen aus Bulk V δ 1 T-Zellkulturen und (B) die Expression von CD4 und CD8 (n=2)

Ergebnisse

Die Blockierung von MICA/B durch spezifische Antikörper hatte, abhängig vom Spender, einen Einfluss auf die Transdifferenzierung von $V\delta 1+$ T-Zellen zu $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen (Abbildung 13). Bei einem von zwei Probanden verringerte sich der Prozentsatz transdifferenzierter $\alpha\beta$ T-Zellen bei Blockierung von MICA/B gegenüber der Kontrollgruppe mit unstimulierten Feederzellen. Beim zweiten Probanden gab es hingegen keinen erkennbaren Einfluss der Kultivierungsmethode auf die Transdifferenzierung von $\alpha\beta$ T-Zellen. In allen Ansätzen wurde ungefähr der gleiche Prozentsatz an $\alpha\beta$ T-Zellen detektiert. Allerdings gab es auch hier wie bei den Ansätzen mit Bulk $V\delta 1$ T-Zellen starke Schwankungen bei der Effizienz der Transdifferenzierung. Jedoch war keine Korrelation zwischen den Probanden erkennbar, wodurch angenommen werden kann, dass der Parameter MICA/B keine oder nur eine untergeordnete Relevanz für die Induktion der Transdifferenzierung hat. Wahrscheinlicher ist, dass individuelle Besonderheiten zwischen den jeweiligen Probanden möglicherweise der Schlüssel zum formellen Verständnis der Transdifferenzierung ist. Über die Art dieser Besonderheiten kann momentan noch nur spekuliert werden (s. Diskussion). Auf die Korezeptorexpression transdifferenzierter $\alpha\beta$ T-Zellen hatte die Blockierung von MICA/B keine Auswirkung. Das Verhältnis zwischen dem Ansatz mit MICA/B geblockten und unstimulierten Feederzellen war nahezu gleich, wohingegen die nach zwei Wochen Kultivierung verbliebenen $V\delta 1+$ T-Zellen bei der Blockierung von MICA/B zu einem hohen Prozentsatz (84,3%) $CD8+$ waren. Die verbliebenen $V\delta 1+$ T-Zellen im Kontrollansatz mit unstimulierten Feederzellen exprimierten kaum $CD8$ (1,7%). Jedoch bestand keine Korrelation zwischen der Abnahme von $CD4+$ $V\delta 1$ T-Zellen und der Anzahl neu gebildeter $\alpha\beta$ T-Zellen.

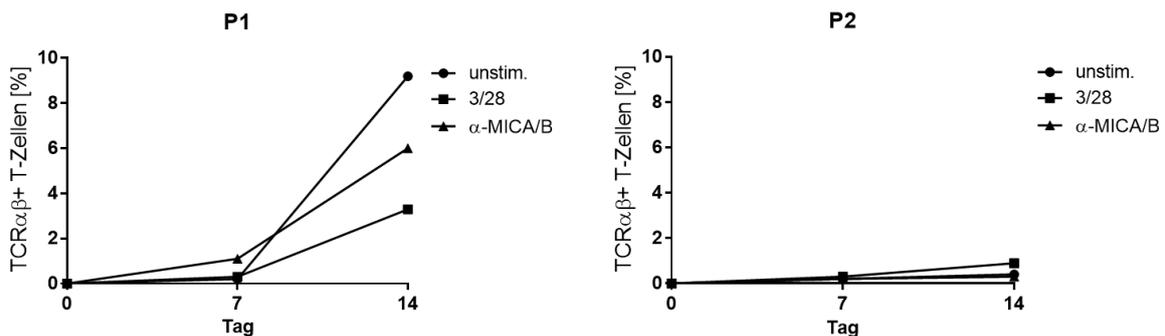


Abbildung 13: Entstehung von $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen aus Bulk $V\delta 1+$ T-Zellen bei zwei unterschiedlichen Probanden, verglichen wurden die Auswirkungen von 3/28 stimulierten und α -MICA/B geblockten Feederzellen, als Kontrolle diente ein Ansatz mit unstimulierten Feederzellen

3.5. Generierung Peptid-spezifischer $\alpha\beta$ T-Zellen aus Bulk $V\delta 1$ T-Zellkulturen

Die Generierung Peptid-spezifischer T-Zellen aus naiven oder der Gesamtheit aller $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen des peripheren Blutes ist eine etablierte Methode¹⁰² in der Immunologie und translationalen Forschung. Dies mit explizit $TCR\alpha\beta$ -depletierten Zellen des Peripherblutes zu

Ergebnisse

versuchen ist ein Ansatz, der bisher noch nicht umgesetzt wurde. Die nach TCR $\alpha\beta$ -Depletion verbleibenden Zellen setzen sich zusammen aus Monozyten, Granulozyten und TCR $\gamma\delta$ T-Zellen. Es handelt sich dabei um einen Zellpool, der nach derzeitiger Lehrmeinung nicht in der Lage sein sollte, Peptid-spezifische $\alpha\beta$ T-Zellen zu generieren. In diesem Zusammenhang ist es jedoch von besonderer Bedeutung, dass $\gamma\delta$ T-Zellen unter anderem als hochpotente APCs fungieren¹⁰³ und die Expansion Peptid-spezifischer T-Zellen initiieren und vorantreiben können.

3.5.1. Depletion der PBMCs von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen

Wie unter 2.2.1. beschrieben wurden die Lymphozyten von vier gesunden HLA*B35:01+ Spendern von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen depletiert. Diese Depletion war jedoch nicht zu 100% effizient, es verblieben auch nach zweimaliger MACS-Prozedur TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen in der Population (Abbildung 14). Wahrscheinlich internalisieren die TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen ihren T-

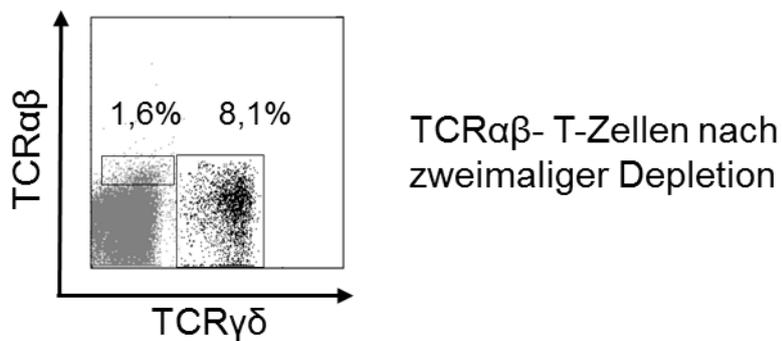


Abbildung 14: Dot Blot zur Überprüfung der Effizienz der TCR $\alpha\beta$ T-Zelldepletion, es verbleiben auch nach zweimaliger Depletion TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen in der Population (~1,6%)

Zellrezeptor durch die Bindung des Antikörper-Bead-Komplexes und entgehen somit der Depletion in der Säule.

3.5.2. Stimulation der TCR $\alpha\beta$ - Zellpools mit verschiedenen viralen Peptiden

Zur Induktion von Peptid-spezifischen $\alpha\beta$ T-Zellen wurde der autologe $\alpha\beta$ T-Zell-depletierte Feederpool separat mit je einem der zwei Peptide stimuliert: Einem ADV-Hexonpeptidcocktail oder dem EBV-Peptid BZLF-1. Als Kontrollansatz dienten ungepulste autologe Feederzellpools. Bereits nach zwei Tagen zeigten sich erste TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen in allen Ansätzen in unterschiedlichem Ausmaße. Dieser Wert steigerte sich bis zu Tag 10 des Versuches zu einem Wert von 34,8% TCR $\alpha\beta$ + beim ADV-Hexonpeptid, 22,8% bei BZLF-1 und 32,0% beim Kontrollansatz (Abbildung 15A und B).

Ergebnisse

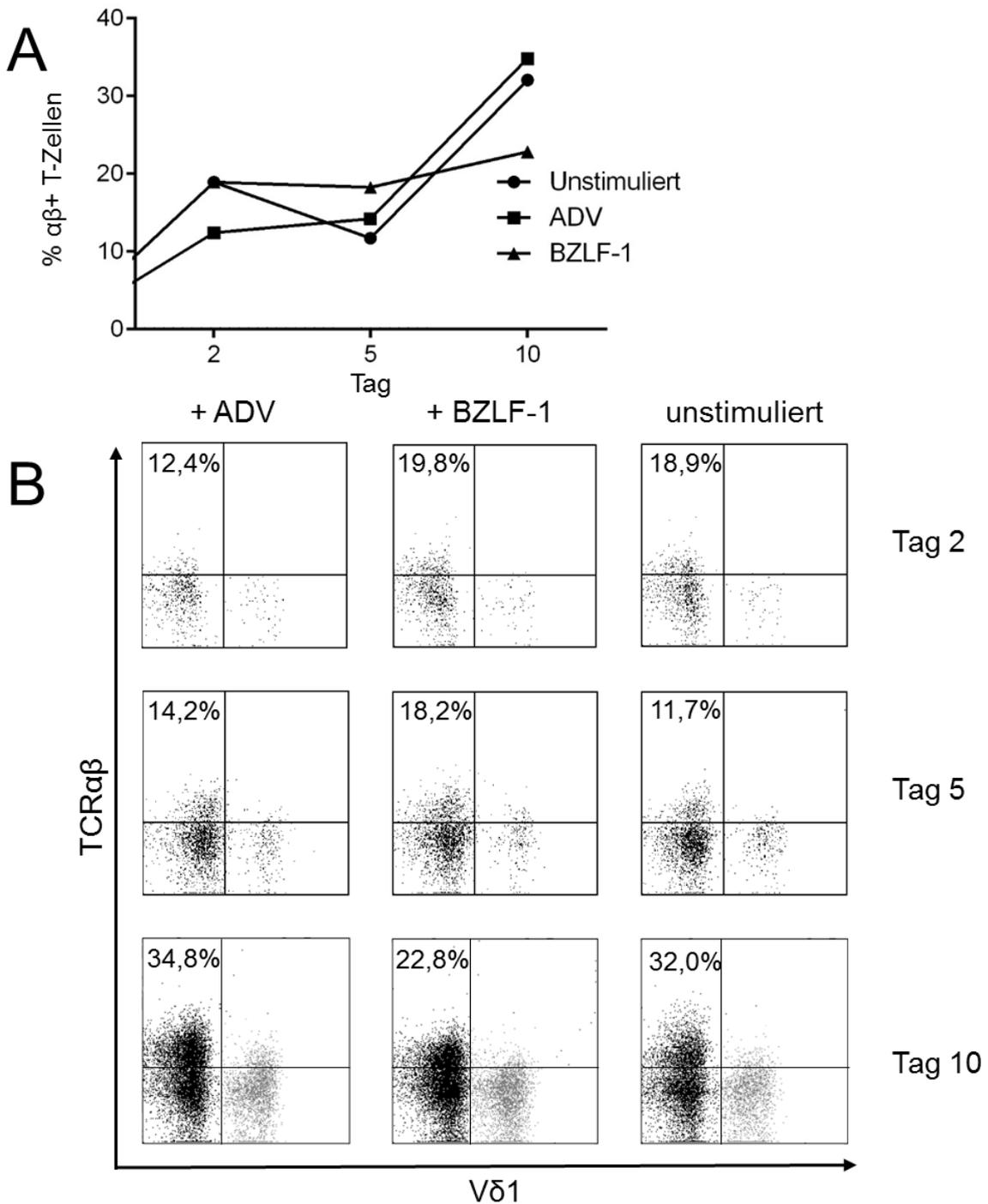


Abbildung 15: (A) Expansion der TCR $\alpha\beta$ - Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen, kultiviert wurden die TCR $\alpha\beta$ - Zellen entweder mit ADV-Hexon gepulsten, BZLF-1 gepulsten oder unstimulierten Feederzellen; (B) Dot Blots der TCR $\alpha\beta$ + und V δ 1+ positiven Fraktion an Tag 2, 5 und 10 des Experimentes.

Beim Ansatz mit dem MHC I-restringierten ADV-Peptid waren die entstandenen TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen überwiegend CD8+, was eine Reaktion auf dieses Peptid nahelegt (Abbildung 16). Im Gegensatz dazu war die Zahl CD4+ oder CD8+ T-Zellen in BZLF-1 stimulierten und unstimulierten Ansätzen in etwa gleich groß (Abbildung 16). Dieses Verhältnis ist unerwartet,

Ergebnisse

da das verwendete EBV-Peptid ebenfalls MHC I-restringiert ist. Allerdings wurden schon CD4⁺ T-Zellen beschrieben, die auch MHC I-restringierte Epitope erkennen können ¹⁰⁴.

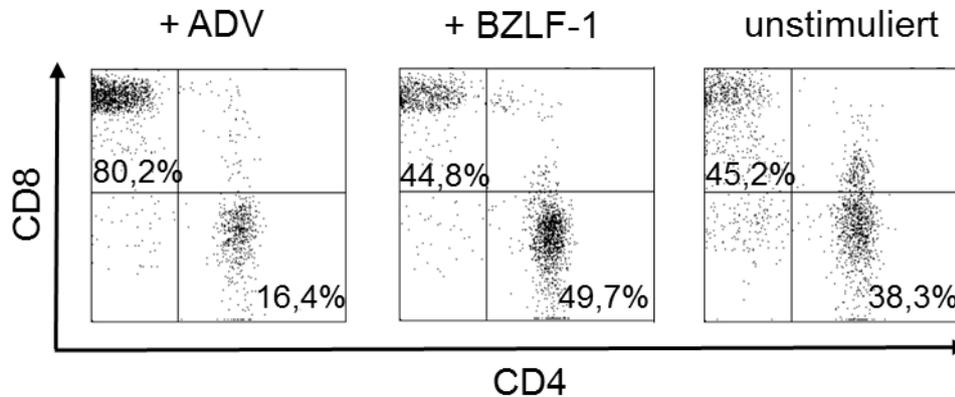


Abbildung 16: Korezeptorexpression der entstandenen TCR $\alpha\beta$ T-Zellen an Tag 10 in den drei Ansätzen.

Der extrem frühe Zeitpunkt des Auftretens und der nahezu identische Prozentsatz entstandener TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen in allen Ansätzen ließ jedoch vermuten, dass die Ausgangspopulation nicht zu 100% von TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen depletiert war. Bei den detektierten TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen handelt es sich wahrscheinlich um T-Zellen, die der Depletion entgingen und in der Kultur stark proliferiert sind.

3.5.3. Isolation der TCR $\alpha\beta$ ⁻ V δ 1⁺ T-Zellen

Wie unter 2.2.1. beschrieben wurden aus dem Blut von vier gesunden HLA-B*35:01 Spendern TCR $\alpha\beta$ ⁻ V δ 1⁺ T-Zellen per MACS isoliert. Die Effizienz der TCR $\alpha\beta$ -Depletion wurde per FACS überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass auch nach Verwendung zweier Depletionssäulen immer noch ca. 1% der Zellen TCR $\alpha\beta$ ⁺ vorhanden waren. Aus diesen TCR $\alpha\beta$ -depletierten Zellen wurden die V δ 1⁺ T-Zellen positiv angereichert. Nur Zellisolate mit einer Reinheit von >98% und keinerlei Verunreinigung durch residuelle TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen wurden in der Zellkultur eingesetzt (Abbildung 17).

Ergebnisse

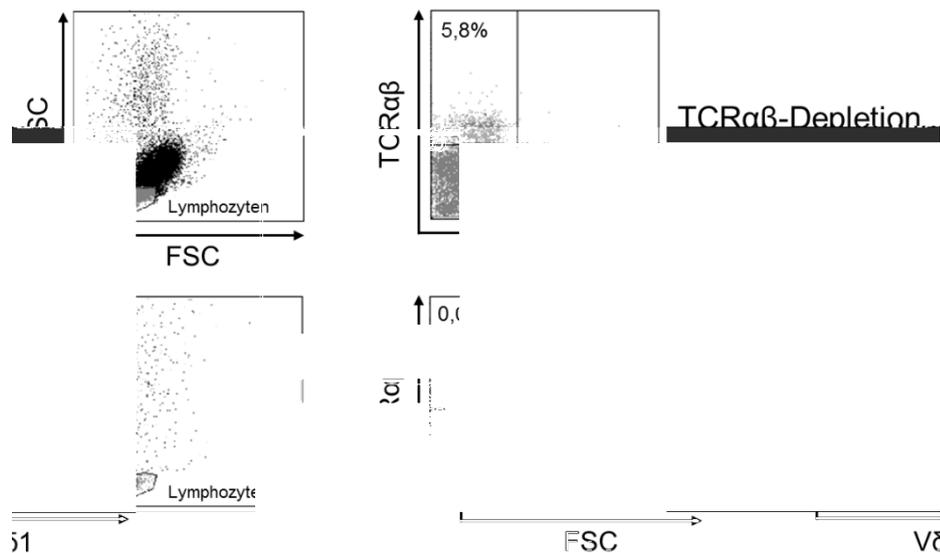


Abbildung 17: Effizienz der TCRαβ T-Zelldepletion und Vδ1-Anreicherung per MACS

Ein kleiner Teil der isolierten Zellen war doppelt positiv für TCRαβ und Vδ1 (~1%). Dabei handelt es sich entweder um unspezifisch angefärbte tote Zellen oder um ein zelluläres Intermediat eines CD4+ Vδ1 αβ T-Zellprogenitors, der extrathymisch, wie von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, zu TCRαβ+ T-Zellen transdifferenzieren kann.

3.5.4. Expansion BZLF-1 spezifischer T-Zellen

Über einen Zeitraum von bis zu neun Wochen wurden die isolierten TCRαβ- Vδ1+ T-Zellen von drei Probanden expandiert und einmal pro Woche mit BZLF-1 gepulsten autologen Feederzellen versetzt. Als Kontrollgruppe dienten TCRαβ- Vδ1+ T-Zellkulturen, die mit unstimulierten, autologen Feederzellen versorgt wurden. Insgesamt wurde dieses Experiment bei drei verschiedenen HLA-B*3501+ Probanden durchgeführt. Aber wie auch schon die Transdifferenzierungsexperimente der Bulk Vδ1+ T-Zellkulturen zeigen, ist die Transdifferenzierung zu αβ T-Zellen nicht immer von Erfolg gekrönt (s. 3.3.).

Die Entstehung von TCRαβ+ T-Zellen in der Kultur wurde im FACS überprüft und Peptid-spezifische T-Zellen mit einem BZLF-1 beladenen MHC-Pentamer nachgewiesen. Bereits nach einer Woche zeigten sich erste TCRαβ+ T-Zellen, deren Prozentsatz über den Zeitraum des Experiments stetig zunahm. In einem Ansatz waren am Ende des Experimentes, nach acht Wochen, die mit autologen, BZLF-1 gepulsten Feederzellen versorgten Vδ1+ TCRαβ- T-Zellen zu 94,6% TCRαβ+ T-Zellen. Die als Kontrollgruppe dienenden, mit unstimulierten, nicht Peptid-gepulsten Feedern inkubierten Vδ1+ TCRαβ- T-Zellen waren nach acht Wochen zu 97,2% TCRαβ+ T-Zellen. Exemplarisch ist dies für einen Probanden, bei dem auch die Transdifferenzierung der Bulk Vδ1 T-Zellkulturen zu αβ T-Zellen erfolgreich war, in Abbildung 18 zu sehen.

Allerdings gelang es nur bei diesem einem der drei Probanden einen hohen Prozentsatz von αβ T-Zellen zu generieren. Die Bulk Vδ1 Kulturen der beiden anderen Probanden zeigten

Ergebnisse

weder im Ansatz mit den BZLF-1 gepulsten Feederzellen noch in dem Ansatz mit unstimulierten Feederzellen ein entsprechend hohes Niveau an transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen. Auch die TRAV- und TRBV-Spectratypes sowie die darauffolgenden Sequenzierungen der CDR-Regionen erbrachten kein verwertbares Ergebnis. Sämtliche der folgenden Ergebnisse entstammen folglich nur einem der drei Probanden und können nur mit bereits publizierten Daten verglichen werden.

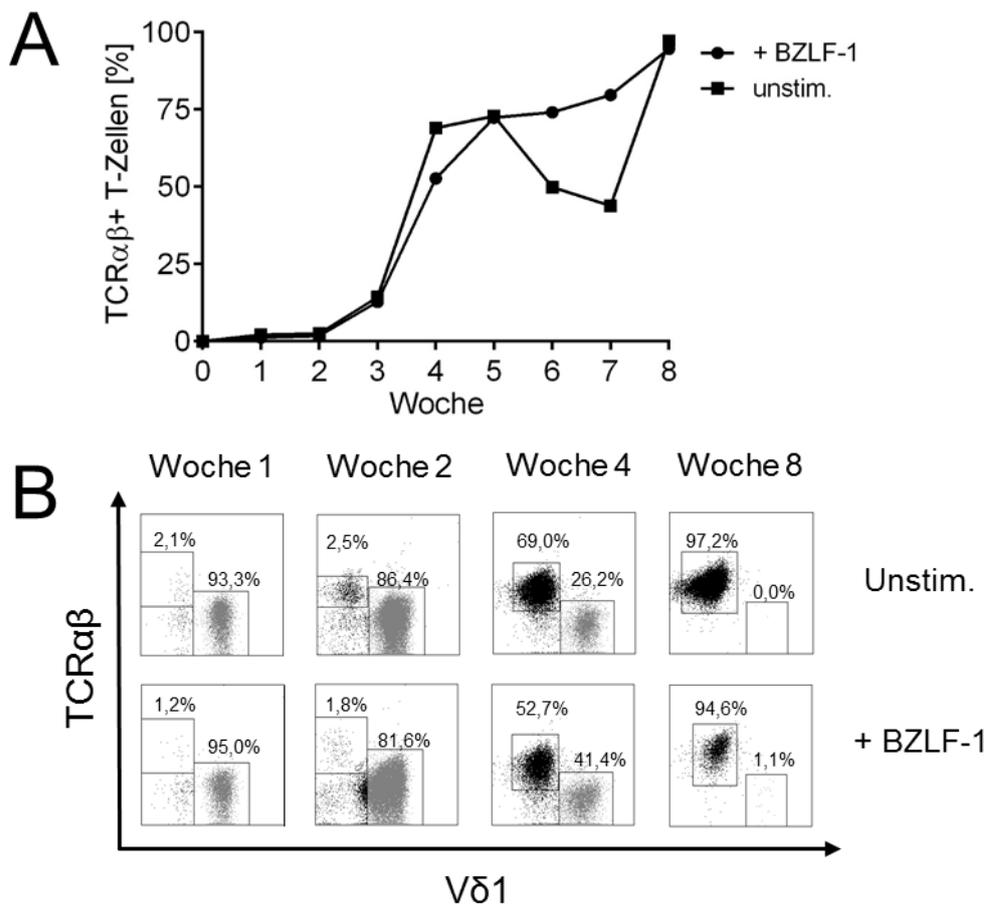


Abbildung 18: (A) Entstehung TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen über die Dauer des Experimentes; (B) FACS-Abbildungen der Expansion von TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen bei Kultivierung mit BZLF-1 stimulierten und unstimulierten Feeder-Zellen, gezeigt für Woche 1, 2, 4 und 8.

Trotz erfolgreicher Transdifferenzierung und einem Prozentsatz von ca. 95% $\alpha\beta$ + T-Zellen konnten keine BZLF-1-spezifischen T-Zellen detektiert werden. Per FACS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass weder in der Kultur mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen noch in der Kontrollgruppe CD8+ MHC-Pentamer-spezifische Zellen vorkommen (Abbildung 19).

Ergebnisse

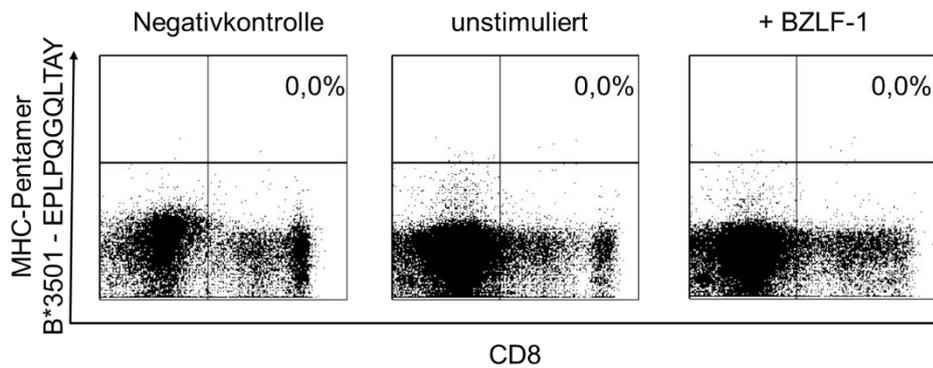


Abbildung 19: Detektion von CD8+ Pentamer-spezifischen T-Zellen in Woche 4 der Kultivierung; gezeigt für einen HLA-B*3501 negativen Probanden, TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen inkubiert mit unstimulierten und BZLF-1 gepulsten Feederzellen.

Auch die Expression des Korezeptors spricht nicht für eine Expansion Peptid-spezifischer T-Zellen, da durch die Stimulation mit dem auf MHC-I präsentierte BZLF-1 vornehmlich CD8+ T-Zellen entstehen sollten. Dies ist jedoch nur in begrenztem Maße der Fall. So sind die aus TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen entstandenen $\alpha\beta$ + T-Zellen, wenn sie über einen Zeitraum von 8 Wochen mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen kultiviert werden, zu ungefähr gleichen Teilen CD4+ (40,4%) und CD8+ (45,2%) (Abbildung 20 oben). Werden die TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen mit unstimulierten Feederzellen inkubiert, sind die entstandenen TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen interessanterweise vornehmlich CD8+ (90,3%) und nur zu einem geringen Anteil CD4+ (8,9%) (Abbildung 20 unten).

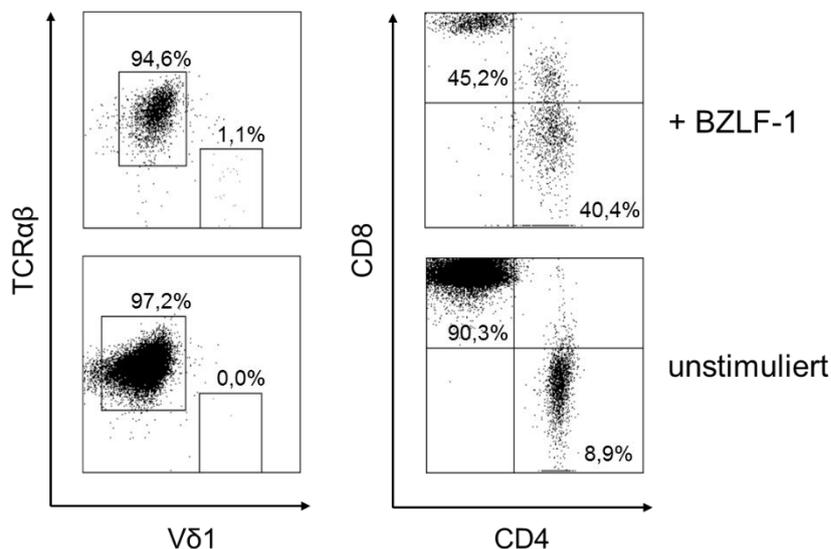


Abbildung 20: Expression der Korezeptormoleküle CD4 und CD8 bei TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen in Woche 8, kultiviert entweder mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen (oben) oder ungepulsten Feederzellen (unten).

3.5.5. Analyse des TRBV-Repertoires im FACS

Zur genaueren Bestimmung des V β -Kettenrepertoires wurden FACS-Experimente mit spezifischen V β -Antikörpern (Beckman Coulter) gemacht. Dabei zeigte sich ein Unterschied zwischen der Kultur, die BZLF-1 gepulste Feeder erhielt, und der Kontrollkultur mit

Ergebnisse

ungepulsten Feederzellen. So exprimieren die BZLF-1-spezifischen TCR $\alpha\beta$ T-Zellen in Woche 8: TRBV4-1 (25,5%), TRBV28 (8,9%), TRBV18 (6,1%), TRBV19 (5,1%), TRBV5-1 (3,6%), TRBV30 (2,7%), TRBV5-6 (2,3%), TRBV11-2 (1,7%), TRBV27 (1,7%) und TRBV6-2 (1,5%) (Abbildung 21A). Insgesamt konnten für 65,7% der Zellen TRBV-Segmente nachgewiesen werden, ungefähr die Hälfte der Zellen trägt TRBV4-1 auf der Oberfläche (Abbildung 22A). Da aber nahezu 100% der Zellen TCR $\alpha\beta$ + sind, müssen noch weitere V β -Familien vorhanden sein, die jedoch durch das Kit nicht abgedeckt sind.

Die Kontrollgruppe mit ungepulsten Feedern hingegen: TRBV28 (85,5%), TRBV11-2 (8,0%), TRBV13 (4,1%), TRBV5-1 (1,9%), TRBV6-2 (1,7%) und TRBV5-5 (1,4%) (Abbildung 21B). Für die in der Kontrollgruppe entstandenen TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen konnten bei 106,6% der Zellen TRBV-Segmente nachgewiesen werden (Abbildung 22B). Die überschüssigen Prozente sind wohl auf unspezifische Bindungen der V β -Antikörper zurück zu führen. Was jedoch sofort auffällt, ist der dominierende Prozentsatz an TRBV28+ T-Zellen (85,5%), was stark für eine klonale Expansion spricht. Ob diese möglicherweise gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet ist, kann nur vermutet werden. Im Kontext mit Cytomegalievirus wurde allerdings bereits ein public TCR, bestehend aus dem Heterodimer TRBV28/TRBV1-4 und TRAV17/TRAJ33 beschrieben ¹⁰⁵. Auch TRAV17 ist bereits ab Woche 2 per Spectratype nachzuweisen, sowohl in der Kultur mit BZLF-1 gepulsten, als auch in den mit ungepulsten Feederzellen.

Ergebnisse

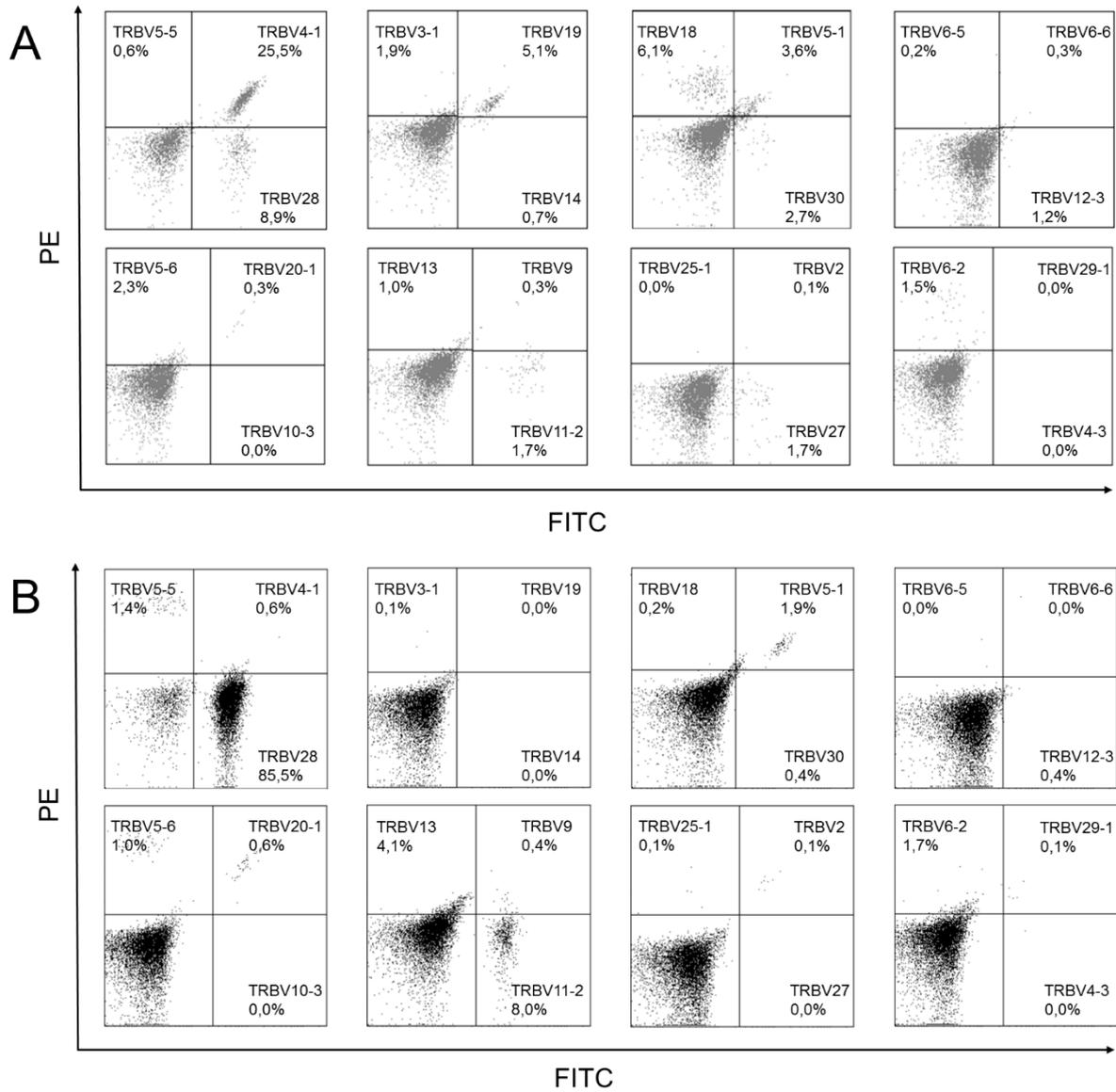


Abbildung 21: Dot Blots der TRBV-Segmente der TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellkultur in Woche 8, (A) BZLF-1 gepulste Feeder (B) unstimulierte Feeder, gezeigt für einen Probanden.

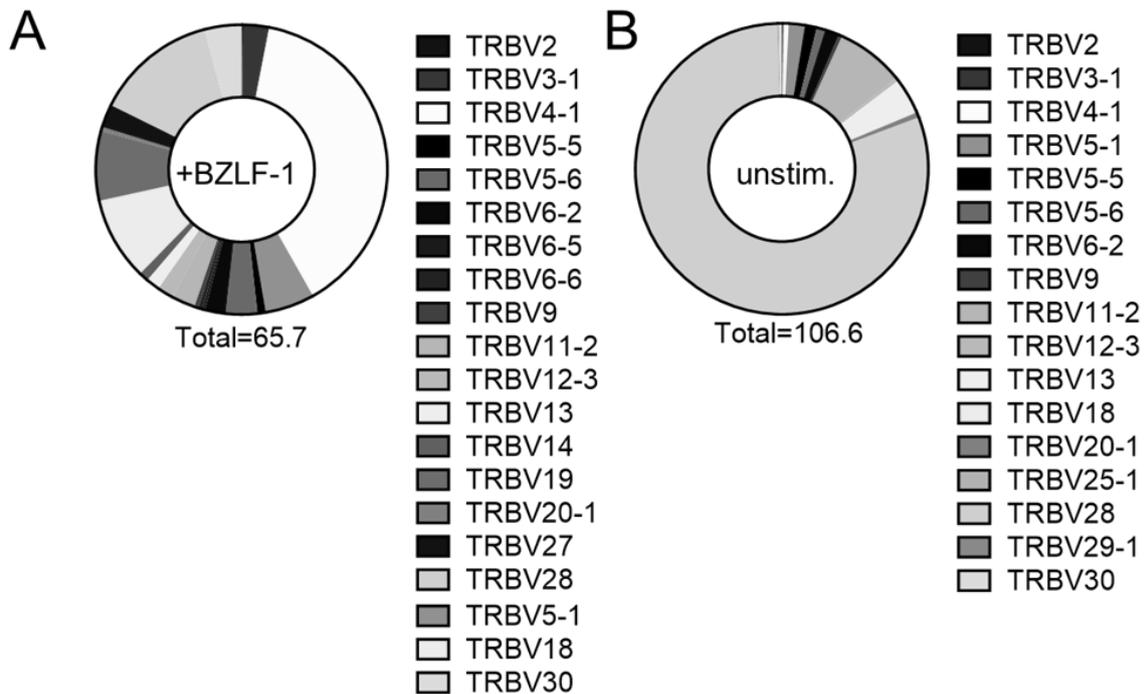


Abbildung 22: Expression der TRBV-Segmente der V δ 1+ TCR $\alpha\beta$ - T-Zellen in Woche 8 gemessen im FACS, angefärbt mit dem TCR V β Repertoire Kit von Beckman Coulter. (A) + BZLF-1 gepulste Feeder (B) unstimulierte Feeder.

3.5.6. Analyse des TRAV- und TRBV-Repertoires der kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen per Spectratype-PCR

Zusätzlich zu den FACS-Analysen wurde wöchentlich ein Aliquot der kultivierten Zellen entnommen, daraus die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und das V α - und V β -Kettenrepertoire detektiert. Das V α -Repertoire wurde bis Woche 4, das V β -Repertoire bis einschließlich Woche 2 und zusätzlich zum Ende des Versuches in Woche 8 analysiert.

Es zeigte sich, dass die Anzahl der TRAV-Segmente bis zu Woche 5, unabhängig davon ob BZLF-1 gepulste oder ungepulste Feederzellen verwendet wurden, beständig anstieg (Tabelle 18 & Abbildung 23A) um nach 8 Wochen in einem eingeschränkten Repertoire (BZLF-1 gepulste Feederzellen = 14; ungepulste Feederzellen = 11) zu resultieren.

Dies gilt ebenso für den Complexity Score der V α -Ketten. Bei steigender Anzahl exprimierter Segmente wurden die einzelnen Segmente zunehmend komplexer (Abbildung 23A). Der Complexity Score definiert die Gesamtzahl der vorhandenen TRAV- oder TRBV-Segmente eines Individuums. Ein Segment besteht bei einem gesunden Menschen nicht aus einer einzigen CDR3-Sequenz, sondern aus mehreren verschiedenen Sequenzen, die sich im Spectratype durch unterschiedliche Peaks identifizieren lassen. Der Unterschied zwischen den Peaks beträgt drei Nukleotide, die sich in eine Aminosäure übersetzen lassen.

Für die Expression der TRBV-Segmente gilt dasselbe, auch wenn bei diesen bereits nach 2 Wochen fast alle Familien exprimiert und äußerst komplex waren (Tabelle 17 & Abbildung

Ergebnisse

23B). Dabei fällt auf, dass die mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen inkubierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen mehr TRBV-Segmente nach 2 Wochen exprimierten und auch den höheren Complexity Score besaßen (Abbildung 23B). In Woche 8 reduzierte sich auch bei den TRBV-Segmenten das Repertoire auf wenige Familien (mit BZLF-1 gepulste Feederzellen = 11; unstimulierte Feederzellen = 11) mit eingeschränkter Komplexität (mit BZLF-1 gepulste Feederzellen = 18; unstimulierte Feederzellen = 21).

Tabelle 17: Gebrauch variabler Segmenten von TCR α - und TCR β -Ketten bei TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen über den Zeitraum des Versuches, kultiviert mit BZLF-1 gepulsten oder unstimulierten Feederzellen.

TRAV	BZLF-1						ohne BZLF-1						TRBV	BZLF-1			o BZLF-1		
	w1	w2	w3	w4	w5	w8	w1	w2	w3	w4	w5	w8		w1	w2	w8	w1	w2	w8
1-1																			
2													2						
3													3-1,2						
4													4-1,2,3						
5													5-1,3						
6													5-5,6,7,8						
8-1													6-5						
8-4													7-2,8						
9-2													7-3,5,6,9						
10													9						
12-1													10-3						
13-1													11-2						
14DV4													12-3,4,5						
16													13						
17													14						
19													15						
20													18						
21													19						
22													20-1						
23DV6													21-1						
24													23-1						
25													24-1						
26-1													25-1						
26-2													27						
27													28						
29DV5													29-1						
30													30						
34																			
35																			
36DV7																			
38-1																			
39																			
40																			
41																			

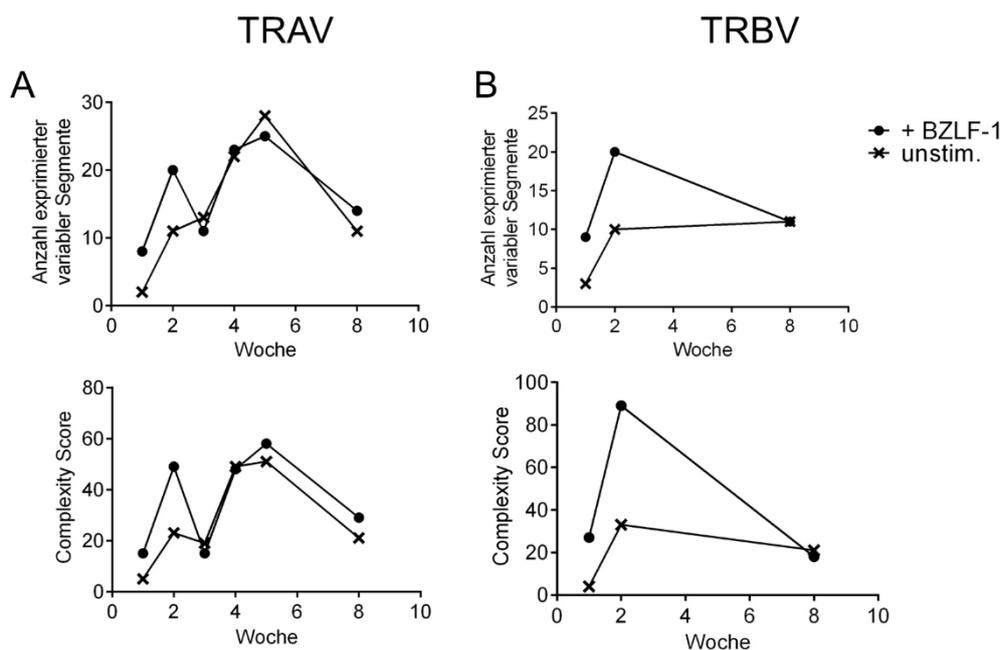


Abbildung 23: Anzahl exprimierter Segmente und Complexity Scores der (A) α - und (B) β -Ketten von TCR $\alpha\beta$ -V δ 1+ T-Zellen kultiviert mit BZLF-1 gepulsten oder unstimulierten Feederzellen über einen Zeitraum von acht Wochen.

Die in den Spectratypes auf RNA-Ebene nachgewiesenen TRBV-Segmente bestätigen die im FACS auf Proteinebene gefundenen V β -Ketten. Da aber nicht für alle Segmente Antikörper vorhanden waren, war die Bestätigung nicht komplett möglich. Außerdem ist es auch möglich, dass manche Ketten als Transkript exprimiert jedoch nicht translatiert werden. Versuche dieses Ergebnis zu reproduzieren waren nur bedingt erfolgreich. Zwar entstanden immer TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen über den Zeitraum des Versuches, es konnte aber kein annähernd so hoher Prozentsatz wie im Initialexperiment ermittelt werden.

3.5.7. Sequenzierung der Single Peaks in TRAV- und TRBV-Segmenten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen kultiviert mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen

Betrachtet man die Spectratypes von TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen, die mit BZLF-1 gepulsten oder ungepulsten Feederzellen kultiviert wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten, so zeigen sich bei beiden Kultursystemen deutlich erkennbare Single Peaks (Abbildung 24).

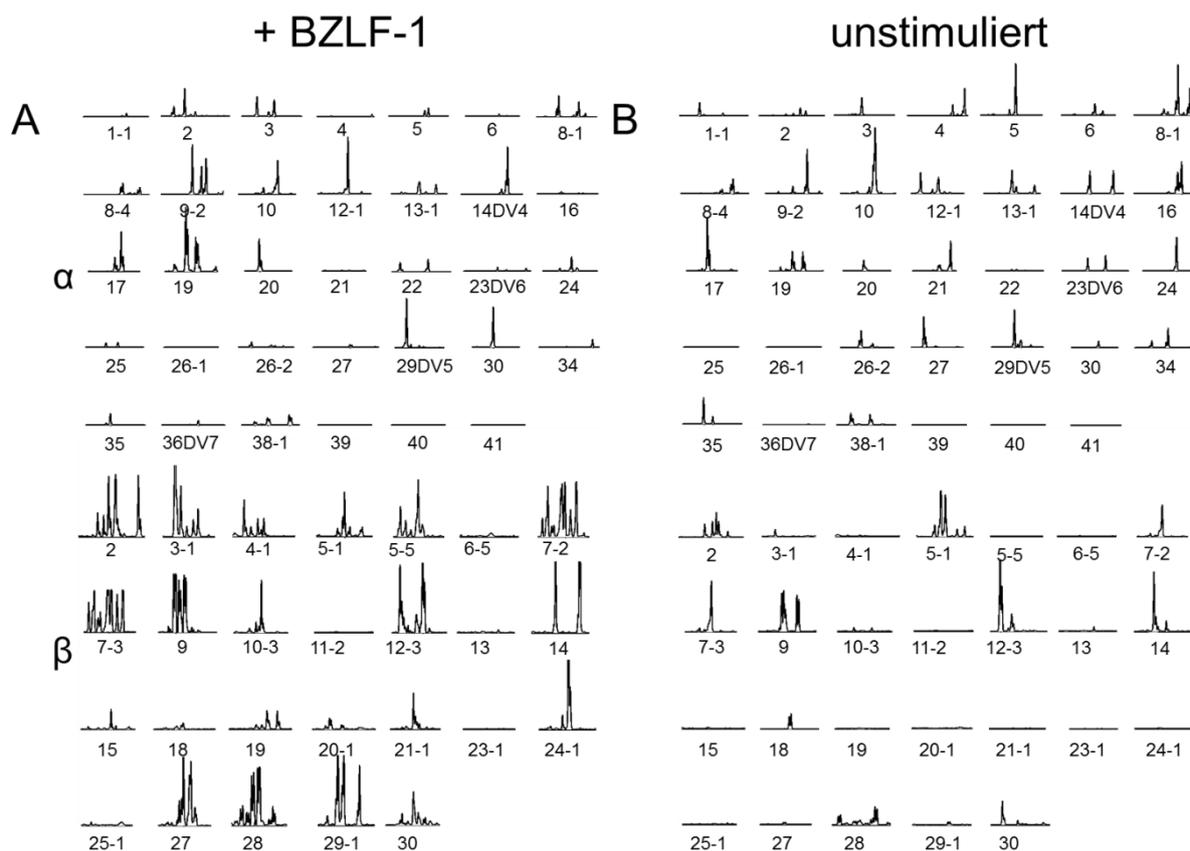


Abbildung 24: TRAV- und TRBV-Expression gezeigt durch Spectratype-PCR und Fragmentlängenanalyse von TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 5 (TRAV) bzw. Woche 2 (TRBV) kultiviert mit A) BZLF-1 gepulsten Feederzellen und B) unstimulierten Feederzellen.

Bei den mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen inkubierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen erschienen bereits nach einer Woche Single Peaks im V α -Repertoire für TRAV3 und TRAV14DV4, in Woche 2 folgten TRAV5 und TRAV24. Sieben weitere Single Peaks innerhalb der TRAV-Segmente folgten in Woche 4: TRAV12-1, 20, 25, 30, 35, 36DV7 und 38-1 (Abbildung 24A). Die Single Peaks der Segmente TRAV12-1, 14DV4, 20, 25 und 35 waren auch noch am Ende des Experimentes in Woche 8 detektierbar. Diese TRAV-Segmente lieferten durch direkte Sequenzierung eine spezifische Sequenz der CDR3-Region (Tabelle 19). Die CDR3-Sequenz von TRAV3/TRAJ5 wurde bereits bei Reaktion auf dieses EBV-Peptid beschrieben und charakterisiert ein public Motif Typ II ¹⁰⁶.

Ergebnisse

Tabelle 18: CDR3-Sequenzen der TRAV-Segmente von mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ -V δ 1+ T-Zellen in Woche 1, 2 und 4

	TRAV	TRAJ	Variabel	CDR3	Joining	Public motif
Woche 1	3	5	CAV	SPD	TGRRALTFGSGT...	Typ II
	14DV4	9	CAM	SPT	NTGGFKTIFGAGT...	
Woche 2	4	5	CLVG	VKG	DTGRRALTFGSGT...	
	24	45	CAF	R	GGGADGLTFGKGT...	
Woche 4	12-1	22	CVV	LSL	SGSARQLTFGSGT...	
	20	21	CAV	EEE	VNKFYFGSGT...	Typ I
	25	39	CAG	ALG	NAGNMLTFGGGT...	
	30	42	CGTE	P	GSQGNLIFGKGT...	
	35	49	CAG	RLG	TGNQFYFGTGT...	
	36DV7	37	CA	GPLR	GNTGKLIFGQGT...	
	38-1	32	CAF	NPGLG	GGATNKLIFGTGT...	

Die Direktsequenzierung der Segmente, die im TRBV-Spectratype als Peaks erkennbar waren, gestaltete sich schwieriger, da die meisten TRBV-Segmente in Woche 2 bereits oligoklonal vorlagen, abgesehen von TRBV10-3 und TRBV15 (Abbildung 24A). In Woche 8 wiesen TRBV4-1, 7-2 und 7-6 einen Single Peak auf und waren direkt sequenzierbar (Tabelle 20). Interessanterweise sind die Sequenzen von TRBV7-2 und TRBV7-6 in ihrer CDR3-Region identisch und auch die N-Nukleotide in der CDR3-Region stimmen überein. Die Unterschiede liegen nur im Gebrauch des V-Segments (konvergente CDR3 Formation). In HLA-B*08+ Individuen wurden EBV-spezifische public TCRs mit der Kombination TRBV7-2/TRBJ2-7 in CD8+ CD45RO+ Memory T-Zellen beschrieben ¹⁰⁷. Unter den in dieser Publikation ebenfalls untersuchten naiven CD8+ CD45RA+ T-Zellen gibt es Klone mit der Kombination TRBV7-2/TRBJ2-2 bzw. TRBV7-6/TRBV2-2, deren CDR3-Sequenzen ein Public Motif Typ III zu den hier gefundenen Sequenzen darstellen. Die Kombination TRBV10-3/TRBJ2-5 mit der Sequenz CAIR – AGTSGD – KTQYFGPGT ebenso wie TRBV4-1/TRBJ2-5 mit der Sequenz CASS – HADRV – KTQYFGPGT sind ein Public Motif Typ IV und wurden im Zusammenhang mit Hepatitis C beschrieben ¹⁰⁸.

Tabelle 19: CDR3-Sequenzen der TRBV-Segmente von mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ -V δ 1+ T-Zellen in Woche 2 und 8

	TRBV	TRBJ	Variabel	CDR3	Joining	Public motif
Woche 2	10-3	2-5	CAIR	AGTSGD	KTQYFGPGT...	Typ IV
	15	2-3	CATSR	DNIP	TDTQYFGPGT...	
Woche 8	4-1	2-5	CASS	HADRV	KTQYFGPGT...	Typ IV
	7-2	2-2	CAST	PGTSVG	YTGELFFGEGS...	Typ III
	7-6	2-2	CAST	PGTSVG	NTGELFFGEGS...	Typ III

Ergebnisse

3.5.8. Sequenzierung der Single Peaks in TRAV- und TRBV-Segmenten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen kultiviert mit unstimulierten Feederzellen

Bei den mit ungepulsten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen waren in Woche 3 Single Peaks bei TRAV26-1 und TRAV29DV5 erkennbar. In Woche 4 kamen TRAV5, 9-2, 22 und 24 hinzu (Abbildung 24B). Sämtliche Single Peaks waren direkt sequenzierbar und lieferten eine spezifische Sequenz der CDR3-Region (Tabelle 20).

Tabelle 20: CDR3-Sequenzen der TRAV-Segmente von mit unstimulierten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 3 und 4

	TRAV	TRAJ	Variabel	CDR3	Joining	Public motif
Woche 3	26-1	44	CIVR	L	TGTASKLTFGTGT...	
	29DV5	49	CAA	TKSP	TGNQFYFGTGT...	
Woche 4	5	4	CAE	R	PGGYNKLIFGAGT...	
	9-2	53	CALS	DQ	GSNYKLTFGKGT...	
	22	17	CAVE	KVG	GNKLTFGGGT...	
	24	3	CAF	SS	GSASKIIFGSGT...	

Bei den TRBV-Segmenten war die direkte Sequenzierung trotz eindeutiger Single Peaks in mehreren Peaks nur für TRBV28 in Woche 8 erfolgreich (Tabelle 21). Ein wichtiger Befund, denn wie im FACS bereits gezeigt stellen die TRBV28+ Zellen nahezu die gesamten Population (85,2%) der generierten TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen dar. Für TRBV28 gibt es bereits mehrere beschriebene Public TCRs, unter anderem bei HLA-B*3501+ Individuen in Zusammenhang mit CMV^{105,109} sowie dem EBV-Peptid BZLF-1¹⁰⁶ und bei HLA-A*0201+ Probanden in Reaktion auf das Melanompeptid Melan-A/MART1⁶⁴. Die Kombination aus TRBV28/TRBJ2-5 mit der Sequenz CASS – LWTSSGAR zeigt jedoch lediglich in der Verwendung von TRBV28 Übereinstimmung mit den in den Publikationen beschriebenen Public TCRs. Somit handelt es sich um ein Public Motif Typ I.

Tabelle 21: CDR3-Sequenz der TRBV-Segmente von mit unstimulierten Feederzellen kultivierten TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen in Woche 8

	TRBV	TRBJ	Variabel	CDR3	Joining	Public motif
Woche 8	28	2-5	CASS	LWTSSGAR	ETQYFGPGT...	Typ I

3.5.9. Expansion pp65-spezifischer T-Zellen aus TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen

Die in der Kultur mit unstimulierten Feederzellen entstandenen TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen waren äußerst viabel und zeichneten sich durch eine starke Proliferation aus. Wie durch die FACS-Analyse gezeigt, tragen die TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen zu 85,5% das TRBV28 Segment als Teil des TCR-Heterodimers. Für die Kombination aus TRAV17 und TRBV28 wurde bereits ein Public TCR beschrieben¹⁰⁵. Beim Vergleich mit der aus Direkt-Sequenzierung erhaltenen CDR3-Sequenz ergeben sich jedoch keine Übereinstimmungen, abgesehen vom benutzten V-Segment. Es handelt sich somit um ein Public Motif Typ I zu dieser Sequenz.

Ergebnisse

Um weitere Informationen über die Spezifität der aus dem Kontrollansatz entstandenen TCR $\alpha\beta$ - V δ 1+ T-Zellen zu erhalten, wurden die verbliebenen T-Zellpools drei weitere Woche mit pp65 gepulsten autologen Feederzellen kultiviert. Das V α - und V β -Spectratype veränderte sich innerhalb dieser drei Wochen. Mehrere TRBV-Segmente, unter anderen TRBV28, verschwanden aus dem Repertoire, dafür erschienen TRBV10-3, TRBV2 und TRBV13-1 (Abbildung 25A & B). Auch im TRAV-Repertoire verschwanden mehrere Segmente und neu hinzu kamen TRAV2, TRAV10, TRAV19 und TRAV24 (Abbildung 25A & B). Einen Single Peak wiesen TRBV10-3 sowie TRAV10 und TRAV26-1 auf. Diese Segmente lieferten eine verwertbare CDR3-Sequenz durch Direkt-Sequenzierung (Abbildung 26). Keine der ermittelten Sequenzen wies eine Übereinstimmung zu bei CMV-assoziierten Public TCRs auf.

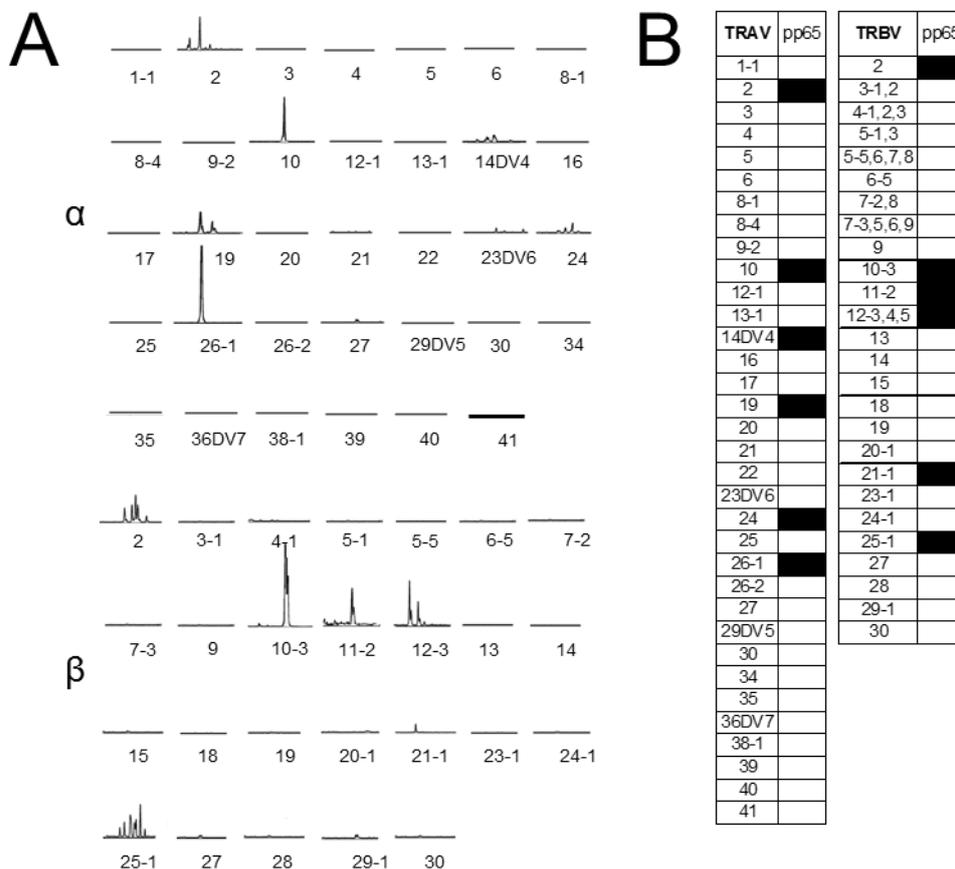


Abbildung 25: V α - und V β -Repertoire von transdifferenzierten TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen nach Kultivierung mit pp65 gepulsten, autologen Feederzellen, gezeigt als (A) Spectratype und (B) tabellarisch.

Die durch Direkt-Sequenzierung erhaltene Sequenz von TRAV10/TRAJ24 weist eine Besonderheit auf, nämlich, dass sie keine N-Nukleotide enthält, die Sequenz ist vollständig Keimbahn-kodiert (Abbildung 26A). Die Expression von TRAV10 (V α 24) und eine Keimbahn-kodierte CDR3-Sequenz ist ein Charakteristikum von iNKT-Zellen¹¹⁰⁻¹¹², allerdings nur in

Ergebnisse

Kombination mit TRAJ18 und präferentiell gepaart mit TRBV25-1 (V β 11)¹¹³. Das Segment TRBV25-1 war bei den kultivierten TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen im Spectratype ebenfalls nachzuweisen (Abbildung 25) jedoch konnte die FACS-Analyse mit einem iNKT-Zell-spezifischen Antikörper für V α 24/V β 11 diese Präsenz auf der Zelloberfläche nicht bestätigen (Abbildung 26B).

Die Kombination TRAV26-1/TRAJ23 mit der Sequenz CIVR – LQGGKLIFGQGT (Abbildung 26A) wurde bei Patienten mit Zöliakie (Glutenintoleranz) in CD4+ T-Lymphozyten gefunden, es handelt sich um ein public Motif Typ IV¹¹⁴. In Zusammenhang mit Zöliakie wurden noch weitere public TCRs für TRAV26-1 beschrieben. Allerdings weisen diese, bis auf das benutzte V-Segment, keine Ähnlichkeiten mit den hier identifizierten Sequenzen auf und kennzeichnen ein public Motif Typ I¹¹⁵. Es konnten keine pp65-spezifischen T-Zellen generiert werden. Die Expression von TRBV28 auf der Oberfläche der zuvor aus TCR $\alpha\beta$ -V δ 1+ T-Zellen hervorgegangenen TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen steht somit nicht in Zusammenhang mit einer Reaktion auf das pp65-Peptid von CMV.

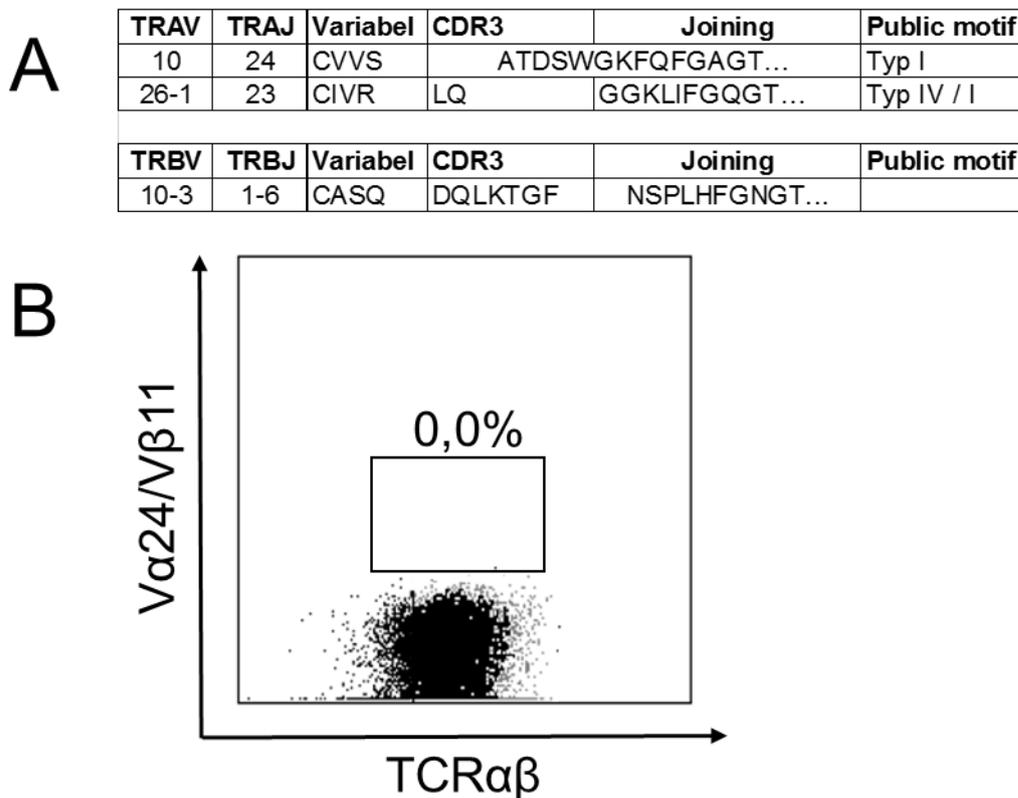


Abbildung 26: (A) CDR3-Sequenzen der Single Peaks von TRAV- und TRBV-Segmenten der transdifferenzierten TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen nach dreimaliger Stimulation mit pp65 gepulsten, autologen Feederzellen; (B) FACS-Dot Blot der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen auf Expression von V α 24/V β 11.

3.6. Charakterisierung V δ 1+ CD4+ T-Zellen

V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen sind zum Großteil doppelt negativ, nur wenige tragen die Korezeptoren CD8 oder CD4. Ein geringer Prozentsatz V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert den Stammzellmarker CD34 (2,3% \pm 0,5%) (Abbildung 27A) zudem sind nahezu alle V δ 1+ CD34+ $\gamma\delta$ T-Zellen CD3+ (91,2% \pm 4,5%). Der größte Teil der V δ 1+ CD34+ T-Zellpopulation ist CD4+ (95,1% \pm

Ergebnisse

0,4%) und wenige sind doppelt positiv für CD4 und CD8 (Abbildung 27B). Es konnten keine CD8+ Zellen, die CD34+ koexprimieren, bei den sechs Probanden detektiert werden. Wie von uns bereits publiziert, besitzen Bulk V δ 1+ T-Zellkulturen und insbesondere V δ 1+ CD4+ T-Zellklone die Fähigkeit zur Transdifferenzierung in $\alpha\beta$ T-Zellen. Die Expression von CD34 unterstreicht einen möglichen Stammzell-ähnlichen Charakter dieser Zellen.

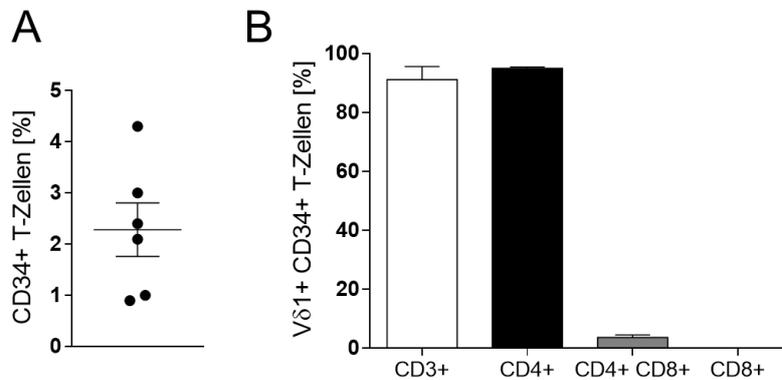


Abbildung 27: (A) Prozentualer Anteil CD34+ Zellen in der Bulk V δ 1 T-Zellpopulation von 6 gesunden Probanden; (B) Expression von CD3, CD4, CD4/CD8 und CD8 bei V δ 1+ CD34+ T-Zellen.

3.6.1. Isolation von V δ 1+ CD4+ T-Zell-Klonen

V δ 1+ CD4+ $\gamma\delta$ T-Zellen wurden per MACS isoliert wie unter 2.2.1. beschrieben und ihre Reinheit wurde im Durchflusszytometer überprüft. Nur V δ 1+ CD4+ T-Zellen, die zu mehr als 98% rein waren wurden zur Klonierung verwendet.

3.6.2. Transdifferenzierung von V δ 1+ CD4+ $\gamma\delta$ T-Zellen zu $\alpha\beta$ T-Zellen

Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden V δ 1+ CD4+ T-Zellklone von drei Probanden mit allogenen Feederzellen kultiviert und die Entstehung von $\alpha\beta$ + T-Zellen per FACS verfolgt. Nicht alle der ausgesäten Klone transdifferenzierten zu $\alpha\beta$ T-Zellen. Falls doch waren in den meisten Fällen 50% oder mehr der V δ 1+ CD4+ T-Zellklone zu $\alpha\beta$ T-Zellen geworden (Abbildung 28B & Tabelle 23). Die V δ 1 CD4 T-Zellklone, die keine Transdifferenzierung vollzogen, behielten entweder den Korezeptor CD4 oder wurden doppelt negativ (Abbildung 28A).

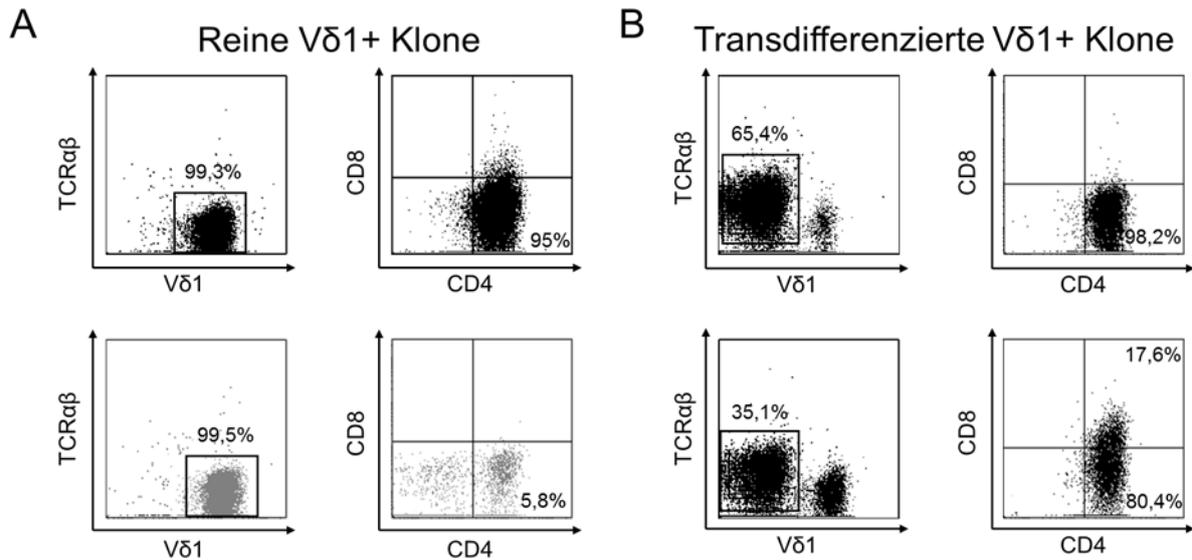


Abbildung 28: FACS-Analyse der Vδ1+ CD4+ T-Zellklone nach drei Wochen Kultivierung; (A) nicht transdifferenzierte Vδ1+ T-Zellklone, die CD4+ (schwarz) oder nur teilweise CD4+ bzw. doppelt negativ sind. (B) in unterschiedlichen Maße zu TCRαβ+ T-Zellen transdifferenzierte Vδ1+ T-Zellklone (n=2).

Tabelle 22: FACS-Analyse und Spectratype-Ergebnis der Vδ1+ CD4+ T-Zellklone von Proband V, getestet wurden die Expression von CD4, TCRαβ und die Expression der Vδ1-Kette

Klon	CD4	TCRαβ	Single Peak [Bp]	Klon	CD4	TCRαβ	Single Peak [Bp]
V1	+	-	-	V31	+	-	353
V2	-	-	367	V32	+	+ (75%)	-
V3	+	-	-	V33	-	-	-
V4	+	+ (100%)	-	V34	+	-	-
V5	+	-	367	V35	+	-	370
V6	-	-	-	V36	+	-	-
V7	tot			V37	+	-	370
V8	+	+ (100%)	-	V38	+	-	370
V9	+	-	-	V39	+	-	370
V10	+	-	370	V40	tot		
V11	+	-	-	V41	+	-	-
V12	+	-	-	V42	+	-	370
V13	+	-	370	V43	+	-	-
V14	+	-	370	V44	+	-	370
V15	+	+ (50%)	370	V45	-	-	-
V16	+	-	370	V46	+	-	-
V17	+	-	-	V47	+	-	370
V18	+	-	353	V48	-	-	-
V19	+	-	-	V49	+	+	353
V20	+	-	370	V50	+	-	-
V21	(+) 33%	-	-	V51	+	-	370
V22	+	-	-	V52	+	-	-
V23	+	-	-	V53	+	-	-
V24	+	-	-	V54	+	-	-
V25	+	-	-	V55	-	-	-
V26	+	+	370	V56	+	+ (10%)	-
V27	-	-	-	V57	-	-	-
V28	(+) 22%	+ (40%)	-	V58	+	-	-
V29	+	-	-				
V30	+	-	-				

Ergebnisse

Bis auf V15 wiesen die bereits zu TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen transdifferenzierten V δ 1+ CD4+ T-Zellklone entweder mehrere Peaks oder kein Signal mehr im Spectratype für die V δ 1-Kette auf. Somit war es nicht möglich, eine Sequenz der CDR3-Region der zur Transdifferenzierung fähigen Klone zu erhalten. Der V δ 1 CD4 T-Zellklon V15 ist zu 50% in TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen transdifferenziert und zeigt einen charakteristischen Single Peak für die V δ 1-Kette im Spectratype bei einer Länge von 370 Nukleotiden.

3.6.3. Sequenzierung der CDR3-Region

Im Gegensatz zu α - und β -Ketten des TCR ist die Anzahl der V-, D- und J-Segmente der γ - und δ -Ketten sehr klein. Dennoch kann eine hohe Diversität durch den Einbau beliebiger und beliebig vieler N-Nukleotide, graduell variables „Nibbling“, die variable Verknüpfung der jeweiligen Segmente und Tandem-Joining der D-Segmente gewährleistet werden ^{116,117}.

Zuerst wurde per $\gamma\delta$ -Spectratype PCR mit einem spezifischen V δ 1-Primer überprüft ob der jeweilige Klon einen Single Peak aufweist, er damit nur eine spezifische CDR3-Region bzw. eine spezifische V δ 1-Kette in seinem TCR-Heterodimer trägt. Mehrere V δ 1+ CD4+ T-Zellklone dreier Probanden unterschiedlichen Alters und Geschlecht wiesen spezifische Single Peaks von 355, 367, 370 oder 373 Nukleotiden Länge auf (Abbildung 29 & Tabelle 23).

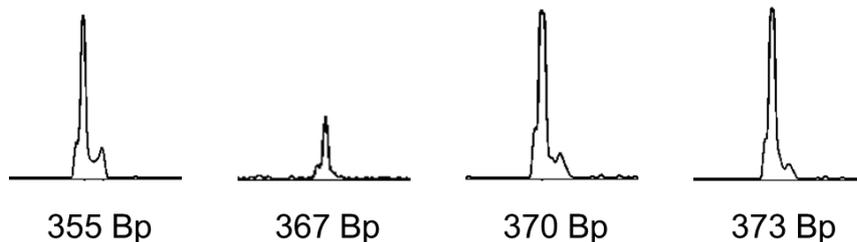


Abbildung 29: Charakteristische Größen der Single Peaks von V δ 1 CD4 T-Zellklonen bei Proband V

Die Sequenzierung der V δ 1-PCR Produkte lieferte teilweise übereinstimmende CDR3-Sequenzen zwischen den verschiedenen Probanden C, V und K (Tabelle 24).

Ergebnisse

Tabelle 23: Aminosäuresequenzen der CDR3-Region von V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen von drei unterschiedlichen Probanden (C, V und K)

Klon	TRDV	TRDD	TRDJ	Variable	CDR3	Joining	Constant	Länge CDR3	Korezeptor
C2	1	3	1	CALGEL	VDP AVDSGGYDQ	YTDKLIFGKGT...	...NVA	376 Bp	CD4
C3	1	3	1	CALGEL	VDP AVDSGGYDQ	YTDKLIFGKGT...	...NVA	376 Bp	CD4
C4	1	3	1	CALGEL	VDP AVDSGGYDQ	YTDKLIFGKGT...	...NVA	376 Bp	CD4
C5	1	3	1	CALGEL	VDP AVDSGGYDQ	YTDKLIFGKGT...	...NVA	376 Bp	CD4
C6	1	2 + 3	1	CALGD	PLPTGG AGR	ADKLIFGKGT...	...NVA	361 Bp	DN
C7	1	3	1	CALGEL	VDP AVDSGGYDQ	YTDKLIFGKGT...	...NVA	376 Bp	CD4
C8	1	3	1	CALGER	GGGYG	NTDKLIFGKGT...	...NVA	356 Bp	CD4
C9	1	2 + 3	1	CALGE	TAFARW GIRG	YTDKLIFGKGT...	...NVA	366 Bp	DN
V2	1	2+3	1	CALGK	GQLPRG AGDTG	TDKLIFGKGT...	...NVA	370 Bp	DN/CD8
V5	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	373 Bp	CD4
V14	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	373 Bp	CD4
V16	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	373 Bp	CD4
V18	1	2	1	CALGE	TALKAS	TDKLIFGKGT...	...NVA	355 Bp	CD4
V20	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	373 Bp	CD4
V22	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	373 Bp	CD4
V28	nicht auswertbare CDR3-Region								DN
V30	1	2	1	CALGE	TALKAS	TDKLIFGKGT...	...NVA	355 Bp	CD4
V33	1	3	1	CALGER	GRFQTG GP	DTDKLIFGKGT...	...NVA	367 Bp	DN
V38	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	373 Bp	CD4
V49	1	2	1	CALGE	TALKAS	TDKLIFGKGT...	...NVA	355 Bp	CD4
V51	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	373 Bp	CD4
V53	1	3	1	CALGEL	VDP AGGYPST	YTDKLIFGKGT...	...NVA	370 Bp	CD4
K4	1	2 + 3	1	CALGE	ITSL LI	KLIFGKGT...	...NVA	352 Bp	CD4
K7	1	2 + 3	1	CALGE	PTSFTPTGG PGG	HTDKLIFGKGT...	...NVA	376 Bp	CD4

So ist die CDR3-Sequenz -VDPAVDSGGYDQ- bei den Klonen C2, C3, C4, C5 und C7 der CDR3-Sequenz -VDPAGGYPST- der Klone V5, V14, V16, V20, V22, V38, V51 und V53 sehr ähnlich. Sämtliche dieser V δ 1+ CD4+ T-Zellklone benutzen auch eine Kombination aus den Segmenten TRDV1/TRDJ1/TRDD3. Es handelt sich möglicherweise um einen Spezialfall eines public TCR, was für V δ 1+ T-Zellen bisher nicht beschrieben wurde.

Das TCR-Repertoire der V δ 1+ CD4+ T-Zellklone wird von bestimmten Sequenzen dominiert. Durch Direktsequenzierung der V δ 1 PCR-Produkte von Bulk V δ 1+ CD4+ T-Zellen erhält man eine charakteristische Sequenz für jeden Spender (Tabelle 24). Interessanterweise sind sämtliche dieser CDR3-Sequenzen auch in den V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen von Proband C zu finden, aber nicht in den V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen des jeweiligen Probanden.

Tabelle 24: CDR3-Sequenzen der V δ 1-PCR Produkte von Bulk V δ 1 CD4 Kulturen der Probanden C, V und K

Proband	TRDV	TRDD	TRDJ	Variable	CDR3	Joining	Constant	Länge CDR3	Korezeptor
C	1	3	1	CALGEL	VDP AVDSGGYDQ	YTDKLIFGKGT...	...NVA	376 Bp	CD4
V	1	2 + 3	1	CALGE	TAFARW GIRG	YTDKLIFGKGT...	...NVA	366 Bp	CD4
K	1	3	1	CALGER	GGGYG	NTDKLIFGKGT...	...NVA	356 Bp	CD4

Ergebnisse

3.6.4. Analyse der γ -Ketten von $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklonen

Der TCR von $\gamma\delta$ T-Zellen besteht aus einer γ - und einer δ -Kette, die sich zu einem Heterodimer über Disulfidbrücken verbinden. Im Gegensatz zu der im Peripherblut dominierenden Kombination aus $V\gamma 9$ und $V\delta 2$ hat $V\delta 1$ keine Präferenz für eine bestimmte γ -Kette. Die Ergebnisse des γ -Ketten Spectratypes offenbaren, dass $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklone zumindest auf RNA-Ebene mehrere γ -Ketten exprimieren (Abbildung 30).

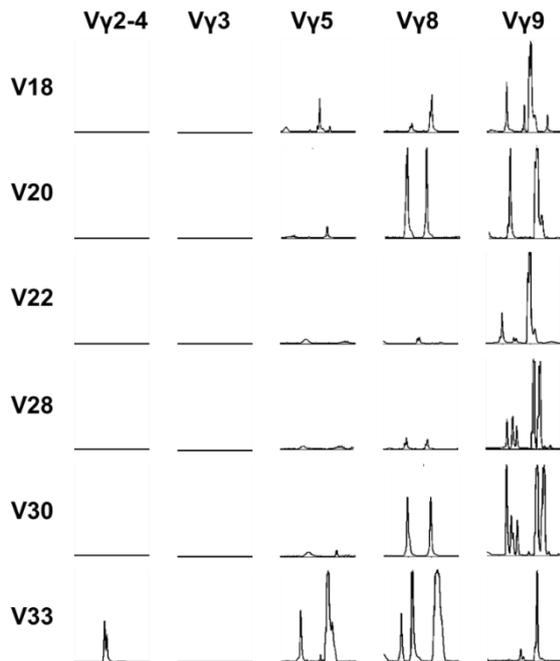


Abbildung 30: $V\gamma$ -Spectratype sechs unterschiedlicher $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklone von Proband V

Es konnten keine 100%igen Übereinstimmungen der $V\gamma$ -Kettenexpression bei $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklonen mit identischer $V\delta 1$ CDR3-Sequenz festgestellt werden (Tabelle 25). Einzig die Expression von $V\gamma 9$ konnte bei allen untersuchten $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklonen im Spectratype nachgewiesen werden.

Tabelle 25: $V\gamma$ -Kettenexpression unterschiedlicher $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklone eines Probanden in Zusammenhang mit ihrer spezifischen $V\delta 1$ -CDR3 Sequenz.

	V γ -Kette					V $\delta 1$ CDR3
	2-4	3	5	8	9	
V18						TALKAS
V20						VDPAGGYPST
V22						VDPAGGYPST
V28						nicht erkennbar
V30						TALKAS
V33						GRFQTGGP

Alle Klone weisen eine hohe Expression und mehrere Peaks für $V\gamma 9$ auf und exprimieren mindestens eine weitere $V\gamma$ -Kette. Lediglich die $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklone V22 und V28 scheinen nur $V\gamma 9$ zu exprimieren. Das Signal von $V\gamma 8$ war im Spectratype zwar vorhanden, aber nur sehr schwach und kaum zu erkennen. Der Klon V28 hat außerdem seinen Phänotyp bereits teilweise von $V\delta 1$ zu $TCR\alpha\beta$ gewechselt (Tabelle 23).

Ergebnisse

Der Nachweis der $V\gamma$ -Segmente im Spectratype muss nicht bedeuten, dass die $V\gamma$ -Ketten auch auf der Zelloberfläche als Protein auftreten, sondern lediglich auf RNA-Ebene vorhanden sind. Theoretisch kann auch nur eine γ - mit einer δ -Kette gepaart werden. Die Ausnahme von dieser Regel bilden duale T-Zellrezeptoren^{118–121}, allerdings wurden diese bei $\gamma\delta$ T-Zellen bislang nicht beschrieben. Aufgrund fehlender $V\gamma$ -Ketten Antikörper konnte die Präsenz auf der Zelloberfläche nicht im FACS nachgewiesen werden. Für die Detektion der Proteine im Western Blot war die Menge an Material zu gering.

3.6.5. Analyse der C-Region von $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklonen

Wie die δ -Ketten bestehen die γ -Ketten aus mehreren Segmenten, die sich aus einem V- (variabel), J- (joining) und C-Segment (constant) zusammensetzen. D-Segmente (diversity) sind bei γ -Ketten im Gegensatz zu δ -Ketten nicht vorhanden.

Beim $C\gamma$ -Segment gibt es zwei verschiedene Formen: $C\gamma 1$ und $C\gamma 2$, die sich in ihrer Aminosäuresequenz auffällig unterscheiden. So ist nur $C\gamma 1$ in der Lage sich mit $C\delta$ per Disulfidbrücken zu verbinden. Durch die Sequenzierung der $C\gamma$ -Produkte dreier unterschiedlicher $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklone von Proband C, stellte sich heraus, dass diese Klone ausschließlich das $C\gamma 1$ -Segment tragen (Abbildung 31), sie folglich Disulfidbrücken ausbilden können.

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
C2	LQKAGTYLCLLEKFFPD V IKIHWQEKKSNTILGSOEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPE	K SLDKEHRCIVRHENNKNG	V DQEIIFPPIKTDV	I T	M DPKD	NC SKDAND	- TLLLQLT
C5	LQKAGTYLCLLEKFFPD V IKIHWQEKKSNTILGSOEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPE	K SLDKEHRCIVRHENNKNG	V DQEIIFPPIKTDV	I T	M DPKD	NC SKDAND	- TLL...KSVV
C7	LQKAGTYLCLLEKFFPD V IKIHWQEKKSNTILGSOEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPE	K SLDKEHRCIVRHENNKNG	V DQEIIFPPIKTDV	I T	M DPKD	NC SKDAND	- TLL...KSVV
C$\gamma 1$	LQKAGTYLCLLEKFFPD V IKIHWQEKKSNTILGSOEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPE	K SLDKEHRCIVRHENNKNG	V DQEIIFPPIKTDV	I T	M DPKD	NC SKDAND	- TLL...KSVV
C$\gamma 2$	LQKAGTYLCLLEKFFPD I IKIHWQEKKSNTILGSOEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPE	E SLDKEHRCIVRHENNKNG	I DQEIIFPPIKTDV	T T	V DPKD	SY SKDAND	VTT... TLLL...KSVV

Abbildung 31: Alignment der $C\gamma$ -Produkte von drei $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklonen von Proband C mit den Sequenzen des $C\gamma 1$ - und $C\gamma 2$ -Segments.

3.6.6. Analyse der TRAV- und TRBV-Segmente von $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklonen

Die drei $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Klone VK8, VK15 und VK32, die in unterschiedlichem Ausmaße zu $\alpha\beta$ T-Zellen transdifferenziert waren, wurden auf die Expression von TRAV- und TRBV-Segmenten per Spectratype untersucht.

Der Grad der Transdifferenzierung reichte von 50% $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen bei V15 bis 100% $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen bei V32. V8 lag dazwischen mit 75% $TCR\alpha\beta+$ T-Zellen, deutlich erkennbar bei der FACS-Analyse. Die $V\alpha$ - und $V\beta$ -Spectratypes der drei T-Zellklone offenbaren, dass alle Klone, bis auf V15, jeweils nur ein TRAV-Segment, jedoch mehrere TRBV-Segmente exprimieren. Die Anzahl der TRBV-Segmente nimmt dabei mit fortschreitendem Transdifferenzierungsgrad zu (Tabelle 26).

Ergebnisse

Tabelle 26: TRAV- und TRBV-Segmente der transdifferenzierten V δ 1+ CD4+ T-Zellklone V15, V8 und V32.

	TRAV	TRBV	Transdifferenzierung
V15	12-1	30	50%
V8	17	11-2, 30	75%
V32	23DV6	7-2, 11-2, 21-1	100%

Mit steigendem Prozentsatz an transdifferenzierten TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen steigt auch die Anzahl der exprimierten TRBV-Segmente, das Repertoire wird breiter. Die Beschränkung auf ein TRAV-Segment jedoch, kann ausschlaggebend für die Spezifität und Funktion der entstandenen TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen sein. Entweder entstehen aus dem ursprünglichen V δ 1+ CD4+ T-Zellklon mehrere unterschiedliche $\alpha\beta$ T-Zellklassen oder es handelt sich um T-Zellen mit dualen T-Zellrezeptoren, die sich aus einer α - und zwei β -Ketten zusammensetzen

119

3.6.7. Sequenzierung der TRAV- und TRBV-Produkte der transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen

Obwohl alle drei V δ 1 CD4 T-Zellklone denselben Single Peak für das TRDV1-Segment bei 370 Nukleotiden zeigen und die V δ 1 CDR3-Sequenz -VDPAVDSGGYDQ- besitzen, sind sie in der Lage ein diverses V α - und V β -Repertoire zu generieren.

Um mehr über die Spezifität der aus den V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen V8, V15 und V32 entstandenen TCR $\alpha\beta$ T-Zellen zu erfahren, wurden die jeweiligen TRAV- und TRBV-Segmente sequenziert. Trotz mehrmaligem Versuch gelang es nur für TRBV7-2 und TRBV21-1 eine vollständige CDR3-Sequenz zu erhalten (Tabelle 27).

Tabelle 27: CDR3-Sequenzen von TRBV7-2 und 21-1 der aus dem V δ 1+ CD4+ T-Zellklon V32 entstandenen TCR $\alpha\beta$ T-Zellen

Klon	TRBV	TRBD	TRBJ	Variabel	CDR3	Joining	Constant
V32	7-2	2	1-2	CASS	HPGS	YGYTFGSGT...	...FEPSEA
	21-1	1	1-1	CASS	KAGQGFKV	NTEAFFGQGT...	...FEPSEA

Allerdings konnte keine Übereinstimmung mit bereits beschriebenen CDR3-Sequenzen oder Segmentzusammensetzungen in der Literatur gefunden werden.

3.6.8. Expression T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren

Mittels quantitativer Realtime-PCR wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3, FoxP3 und RORC ermittelt, um die V δ 1+ CD4+ T-Zellklone dem Phänotyp einer T-Helfer Zellpopulation zuordnen zu können. Es stellte sich heraus, dass die V δ 1+ CD4+ T-Zellklone eine signifikant erhöhte Expression des T_H2-zugeordneten Transkriptionsfaktors GATA-3 besitzen. Die Expression von T-bet, FoxP3 und RORC war um mehr als zwei Log-Phasen deutlich geringer (Abbildung 32A). Aufgrund ihres Stammzell-ähnlichen Charakters wurden die maßgeblich an der T-Zellentwicklung beteiligten Gene RAG-1, TdT und

Ergebnisse

preTalpha ebenfalls quantitativ untersucht. Es zeigte sich, dass V δ 1+ CD4+ T-Zellklone verstärkt RAG-1 exprimieren, die Expression von TdT im Vergleich dazu viel niedriger und preTalpha überhaupt nicht vorhanden ist (Abbildung 32B).

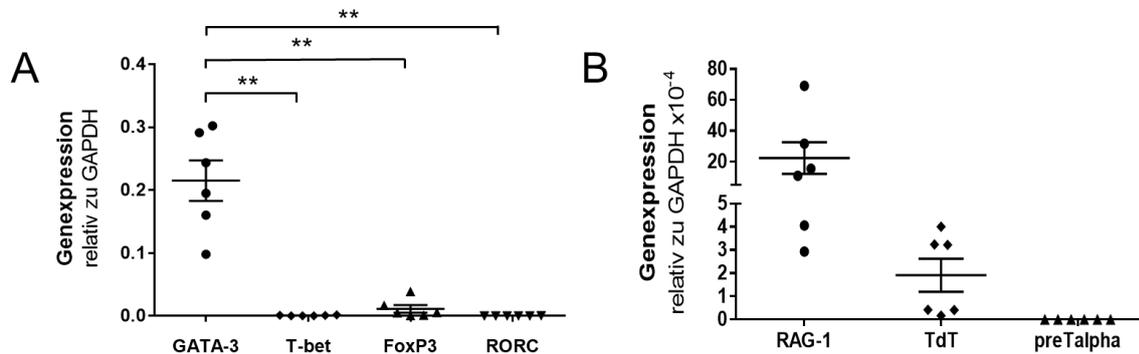


Abbildung 32: Quantitative Realtime PCR Messungen von sechs unterschiedlichen V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen (n=6) (A) Expression von T-Zellpopulation-spezifischen Transkriptionsfaktoren GATA-3, T-bet, FoxP3 und RORC; (B) Expression der T-Zellentwicklungsmarker RAG-1, TdT und preTalpha (n=6).

3.7. CD28- T-Zellen im Peripherblut der Probanden

In vorhergehenden Experimenten stellte sich heraus, dass die aus den V δ 1+ CD4+ T-Zellklonen transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen CD28- waren. Möglicherweise entstammen folglich die im Peripherblut vorhandenen CD28- $\alpha\beta$ T-Zellen dieser Progenitorpopulation. Rückschlüsse darauf sollen sich vor allem über den Vergleich der CDR3-Region und der exprimierten TRAV- und TRBV-Segmente ergeben. Vor Isolation der verschiedenen T-Zellpopulationen wurde im FACS getestet, welchen Prozentsatz die CD28- T-Zellen im Peripherblut der vier Probanden einnehmen (Abbildung 33A) und welchen Korezeptor die CD28- T-Zellen tragen (Abbildung 33B).

Wie bereits in der Literatur beschrieben¹²², war die überwiegende Mehrheit der TCR $\alpha\beta$ T-Zellen CD28+ (Abbildung 33C). Mit zunehmendem Alter akkumulieren CD28- T-Zellen¹²³⁻¹²⁶, bei diesen vier Probanden waren jedoch keine signifikanten Unterschiede in der CD28- Population bei < 30 Jahre und > 30 Jahre zu erkennen. CD28+ T-Zellen sind in erster Linie CD4+ und weniger CD8+. Das Verhältnis bei CD28- T-Zellen ist genau umgekehrt. So sind diese vor allem CD8+ und zu einem geringen Prozentsatz CD4+ (Abbildung 33D). Auch dieses Phänomen wurde bereits beschrieben¹²⁷.

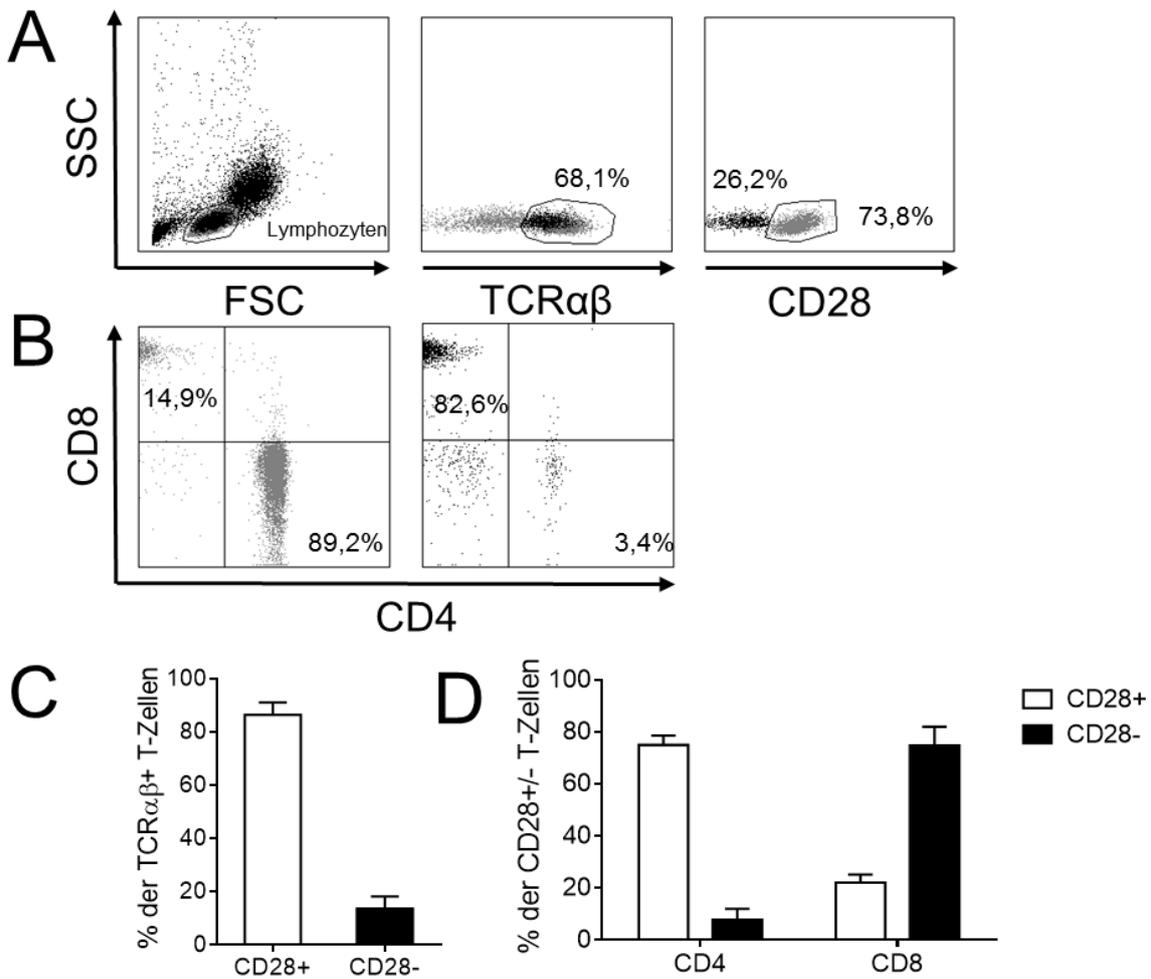


Abbildung 33: (A) Gatingstrategie für CD28+ und CD28- T-Zellen innerhalb der TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen, exemplarisch gezeigt für einen Probanden; (B) CD4- / CD8-Expression bei CD28+ (grau) und CD28- (schwarz) T-Zellen, deutlich erkennbar ist die umgekehrte Expression der Korezeptormoleküle der Populationen; (C) Prozentsatz der CD28+ (86,4% \pm) und CD28- (13,6% \pm) TCR $\alpha\beta$ + T-Zellen der Probanden (n=4); (D) Erhöhte CD4-Expression bei CD28+ gegenüber einer erhöhten CD8-Expression bei den CD28- (n=4).

3.7.1. Isolation von TCR $\alpha\beta$ + CD28- CD4+ und CD28- CD8+ T-Zellen

Nach Isolation der CD28+ CD4+ / CD8+ und CD28- CD4+ / CD8+ und deren Reinheitsüberprüfung im FACS wurde entschieden Proband 3 nicht in die Analyse einzubeziehen, da zu viele CD28+ Zellen noch in der CD28- Fraktion enthalten waren. Die CD28- Fraktion der drei übrigen Probanden P1, P2 und P4 wiesen eine Reinheit $\geq 98\%$ auf. Exemplarisch für einen Probanden ist die Reinheit nach Isolation in Abbildung 34 zu sehen.

Ergebnisse

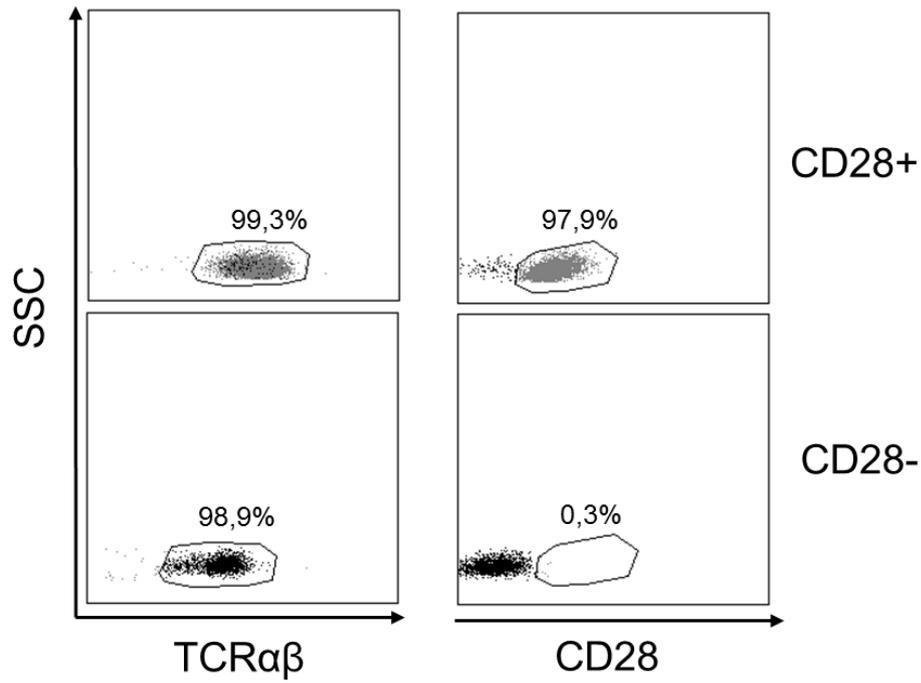


Abbildung 34: Isolierte Fraktionen aus den Lymphozyten eines Probanden (P2), zu sehen ist oben die CD28+ Fraktion und unten die CD28- Fraktionen innerhalb der TCRαβ+ T-Zellen.

Nach Isolation der hochreinen, verschiedenen Subfraktionen wurden diese in β-RLT+ Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C eingefroren.

3.7.2. Analyse des TRAV- und TRBV-Repertoires der CD28+ Fraktion

Die CD28+ Fraktionen wiesen, wie zu erwarten, polyklonale Verteilungsmuster der TRAV- und TRBV-Segmente bei allen drei untersuchten Spendern auf (Abbildung 35).

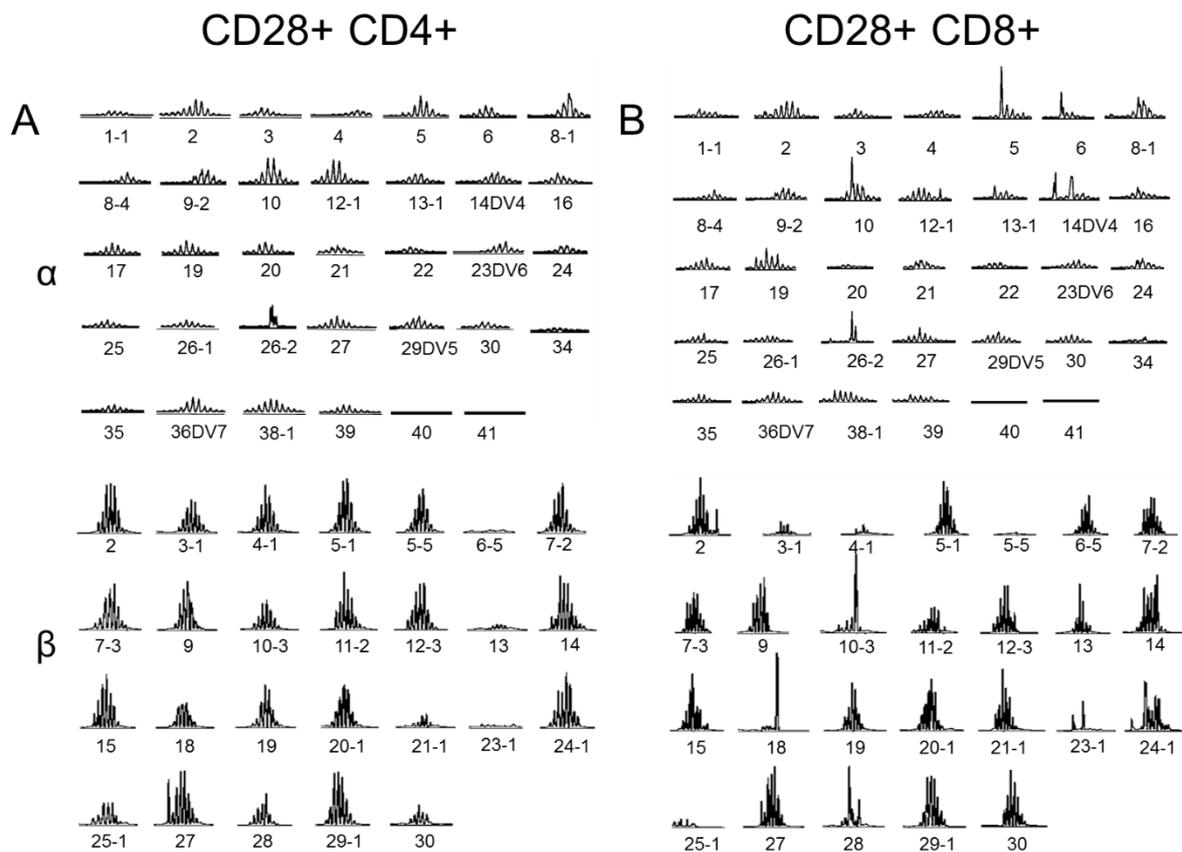


Abbildung 35: TRAV- und TRBV-Expression gezeigt durch Spectratype-PCR und Fragmentlängenanalyse in A) CD28+ CD4+ und B) CD28+ CD8+ T-Zellen, exemplarisch gezeigt für einen Probanden.

Die Anzahl der exprimierten variablen Segmente war bei CD28+ CD4+ und CD8+ T-Zellen annähernd gleich und unterschied sich minimal von Proband zu Proband (Tabelle 28A & B). P1 exprimiert 32 von 34 untersuchten TRAV-Segmenten in der CD4+ sowie der CD8+ Fraktion und 23 in der CD4+ bzw. 22 in der CD8+ Fraktion von 26 analysierten TRBV-Segmenten. P2 hingegen besitzt 32 in der CD4+ bzw. 31 TRAV-Segmente in der CD8+ Fraktion und 25 TRBV-Segmente sowohl in der CD4+ als auch der CD8+ Fraktion. P3 wies 28 TRAV-Segmente in der CD4+ Fraktion bzw. 20 in der CD8+ Fraktion sowie 23 bzw. 22 TRBV-Segmente auf. Die Komplexität, gemessen anhand des Complexity Score, der Anzahl der detektierbaren Peaks, war in der CD28+ Fraktion jedes Probanden in TRBV- deutlich höher als in TRAV-Segmenten (Tabelle 28C).

Ergebnisse

Tabelle 28: Gebrauch variabler Segmenten von (A) TCR α -, (B) TCR β -Ketten sowie (C) Complexity Scores bei CD 28+ CD4+ und CD8+ T-Zellen der drei Probanden, dargestellt für CD4+ (grau) und CD8+ (schwarz)

A	TRAV	P1		P2		P4	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
1-1							
2							
3							
4							
5							
6							
8-1							
8-4							
9-2							
10							
12-1							
13-1							
14DV4							
16							
17							
19							
20							
21							
22							
23DV6							
24							
25							
26-1							
26-2							
27							
29DV5							
30							
34							
35							
36DV7							
38-1							
39							
40							
41							

B	TRBV	P1		P2		P4	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
2							
3-1,2							
4-1,2,3							
5-1,3							
5-5,6,7,8							
6-5							
7-2,8							
7-3,5,6,9							
9							
10-3							
11-2							
12-3,4,5							
13							
14							
15							
18							
19							
20-1							
21-1							
23-1							
24-1							
25-1							
27							
28							
29-1							
30							

C	Complexity Score	P1		P2		P4	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
TRAV		128	133	102	108	107	58
TRBV		121	129	167	169	173	151

3.7.3. Analyse des TRAV- und TRBV-Repertoires im CD28- Kompartiment

Im CD28- Kompartiment gab es gegenüber dem CD28+ Kompartiment deutliche Unterschiede. Die TRAV- und TRBV-Segmente CD28- T-Zellen zeigen vor allem Single Peaks bis maximal oligoklonale Expressionsmuster, was ein deutlicher Hinweis für eine monoklonale Expansion CD28- T- Zellen ist. Es fallen drei Befunde auf:

1. Die Anzahl benutzter variabler Segmente bei CD28-T-Zellen im α -Locus ist 2x höher als im β -Locus und auch bei CD28+ T-Zellen ist das Verhältnis ähnlich (Abbildung 36A).
2. Obwohl bei CD28+ T-Zellen weniger TRBV-Segmente als TRAV-Segmente exprimiert werden, weisen diese einen höheren Complexity Score der TRBV-Segmente gegenüber den TRAV-Segmenten auf (Abbildung 36B).

Ergebnisse

- Bei CD28- T-Zellen ist der Complexity Score im α -Locus fast 2x so hoch wie im β -Locus, was das Verhältnis benutzter variabler Segmente widerspiegelt (Abbildung 36B).

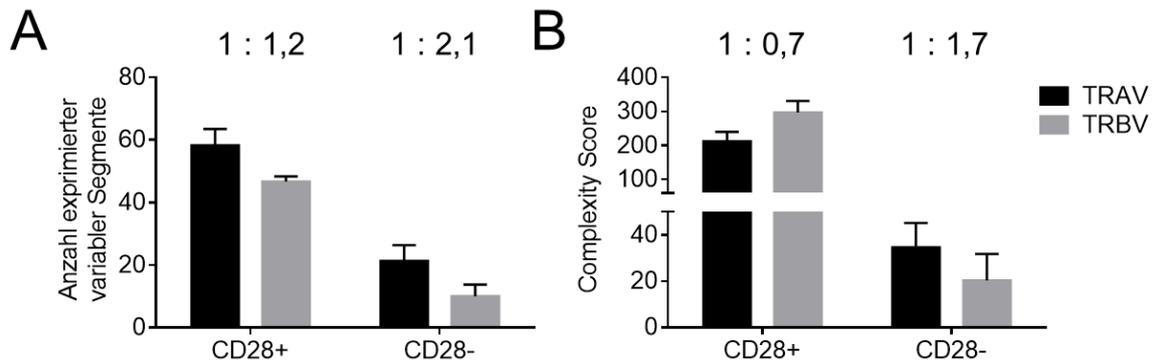


Abbildung 36: Gegenüberstellung der Anzahl und des Complexity Scores variabler Segmente bei CD28+ und CD28- T-Zellen (n=3), gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM sowie deren Verhältnisse. (A) variable Segmente: CD28+ Kompartiment TRAV = 58,3 \pm 5,2, TRBV = 46,7 \pm 1,7; CD28- Kompartiment TRAV = 34,7 \pm 6,5, TRBV = 20,3 \pm 11,5.

Somit kann im CD28- Kompartiment eine V β -Kette mit zwei V α -Ketten paaren, wie es bei bestimmten dualen T-Zellrezeptoren der Fall ist^{120,121}.

Trennt man CD28- T-Zellen in CD4+ und CD8+ T-Zellen bezüglich der Expression variabler Segmente auf, zeigt sich, dass deutlich mehr TRAV- und TRBV-Segmente in der CD8+ als in der CD4+ Fraktion exprimiert werden, was sich direkt in der Komplexität des Repertoires widerspiegelt (Tabelle 29). Dies lässt sich zum Teil damit erklären, dass CD8+ T-Zellen die vorherrschende Population im CD28- T-Zellkompartiment stellen. Zusätzlich fällt auf, dass die beiden Probanden P1 und P2 (>30 Jahre) beide mehr TRAV- und TRBV-Segmente im TCR-Repertoire der CD28- T-Zellen besitzen als der Proband P4 (<30 Jahre) (Tabelle 29A & B), was der Tatsache geschuldet ist, dass CD28- T-Zellen im Alter akkumulieren¹²³⁻¹²⁶.

Ergebnisse

Tabelle 29: Gebrauch variabler Segmenten von TCR α - und TCR β -Ketten sowie Complexity Scores bei CD 28-CD4+ und CD8+ T-Zellen der drei Probanden, dargestellt für CD4+ (grau) und CD8+ (schwarz)

A	TRAV	P1		P2		P4	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
1-1							
2							
3							
4							
5							
6							
8-1							
8-4							
9-2							
10							
12-1							
13-1							
14DV4							
16							
17							
19							
20							
21							
22							
23DV6							
24							
25							
26-1							
26-2							
27							
29DV5							
30							
34							
35							
36DV7							
38-1							
39							
40							
41							

B	TRBV	P1		P2		P4	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
2							
3-1,2							
4-1,2,3							
5-1,3							
5-5,6,7,8							
6-5							
7-2,8							
7-3,5,6,9							
9							
10-3							
11-2							
12-3,4,5							
13							
14							
15							
18							
19							
20-1							
21-1							
23-1							
24-1							
25-1							
27							
28							
29-1							
30							

C	Complexity Score	P1		P2		P4	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
TRAV		14	24	8	43	4	11
TRBV		4	8	8	35	3	3

Das Spectratype zeigt deutlich, dass sehr viele der TRAV- und TRBV-Segmente als Single Peak vorliegen, was sehr wahrscheinlich einer monoklonalen Expansion spezifischer T-Zellen entspricht (Abbildung 37A & B). Die CDR3-Region monoklonaler TRAV- und TRBV-Segmente wurden zur genaueren Analyse sequenziert.

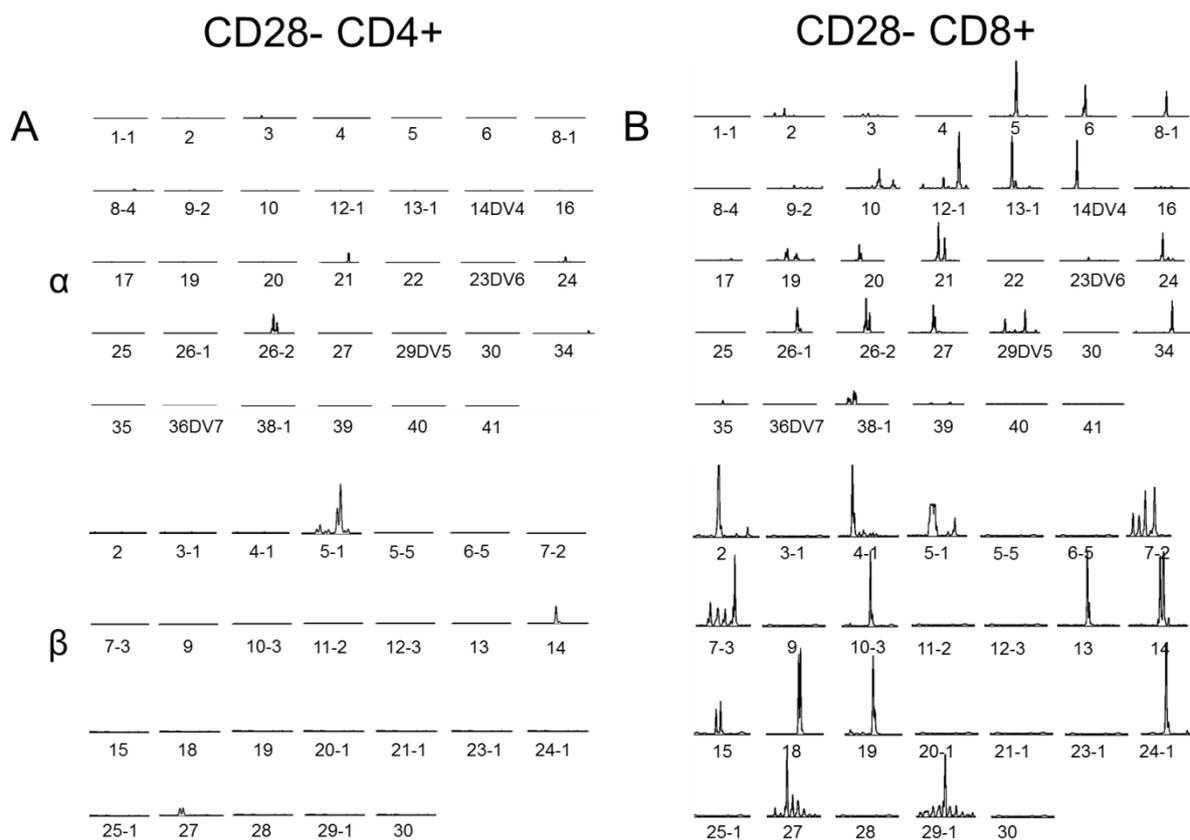


Abbildung 37: TRAV- und TRBV-Expression gezeigt durch Spectratype-PCR und Fragmentlängenanalyse in A) CD28- CD4+ und B) CD28- CD8+ T-Zellen, exemplarisch dargestellt für einen Probanden.

3.7.4. Sequenzen der CDR3-Region von CD28- T-Zellen

Monoklonal erscheinende Single Peaks im CD28- T-Zellkompartiment ergaben in der Direktsequenzierung 13 TRAV- und 4 TRBV-Sequenzen von CD8+ sowie 2 TRAV- und 3 TRBV-Sequenzen von CD4+ CD28- T-Zellen. Die Direktsequenzierung der TRBV-Segmente gestaltete sich dabei etwas schwieriger, denn auch eindeutig erkennbare Single Peaks lieferten kein Ergebnis. Daher wurde eine Reamplifizierung der PCR-Produkte mit 13 spezifischen J β -Primern durchgeführt, was zu einer Auflösung der Single Peaks in unterschiedliche Sequenzen gleicher Länge führte.

Bei Proband 2 (>30 Jahre) konnten die meisten Einzelsequenzen durch Direktsequenzierung identifiziert werden, darunter einige T-Zellrezeptoren, die als public TCRs bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um identische T-Zellrezeptoren bzw. CDR3-Regionen, die in unterschiedlichen Individuen innerhalb einer Spezies gefunden werden können⁴⁷⁻⁴⁹. Beschrieben wurden diese konservierten T-Zellrezeptoren bereits in Immunantworten gegenüber CMV⁵⁰⁻⁵⁵, EBV^{47,48,50,51}, HIV⁵⁶⁻⁵⁸, Hepatitis B⁵⁹ und C⁶⁰, Krebs⁶¹⁻⁶⁶, in Autoimmunerkrankungen⁶⁷⁻⁷³ und Alloreaktivität^{74,75}. Wie bereits von Turner et al⁷⁷ beschrieben und von Miles et al¹² ergänzt, gibt es Abstufungen bei der Klassifizierung von Public Motifs der T-Zellrezeptoren. Man unterscheidet zwischen Typ I, II, III und IV. Typ I ist gekennzeichnet durch eine Übereinstimmung des TRAV- oder TRBV-Segment, wenig

Ergebnisse

Ähnlichkeit in der CDR3-Region und unterschiedlichen TRAJ- oder TRBJ-Segmenten. Typ II hat wie Typ I übereinstimmende TRAV- oder TRBV-Segmente und unterschiedliche TRAJ- oder TRBJ-Segmente und dazu deutlich erkennbare Ähnlichkeiten in der CDR3-Region. Typ III steht für den höchsten Grad der Übereinstimmung, identische V- und J-Segmente sowie gleiche Aminosäuren in der CDR3-Region. Typ IV besteht ebenfalls aus gleichen V- und J-Segmenten, jedoch weisen die Aminosäuren in der CDR3-Region nur Ähnlichkeiten zu bereits bekannten public TCRs auf.

Die bei Proband 2 gefundene Kombination aus TRAV12-1/TRAJ9 und dessen CDR3-Sequenz CVVN-FGKG-NTGGFKTIFGAGT ist bereits in Zusammenhang mit einem Melanom-Peptid (MelanA/MART1) beschrieben ¹²⁸ und stellt ein Public Motif Typ III dar. Interessanterweise ist diese α -Kette im CD28- T-Zellrepertoire dieses Probanden mit der Diagnose eines Melanoms mit Rezidiven verbunden, der Patient jedoch seit acht Jahren Rezidiv frei erscheint. TRAV14DV4/TRAJ49 mit der Sequenz CAM-HN-GNQFYFGTGT ist hingegen ein Public Motif Typ VI und wurde in Zusammenhang mit Tax11-19, einem T-Zellleukämiepeptid, beschrieben ¹²⁹. Ein weiterer public TCR aus TRAV21/TRAJ38 und der Sequenz CA-AQG-NAGNNRKL steht für ein weiteres Public Motif Typ VI und ist spezifisch für ein Peptid des Epstein-Barr Virus ¹³⁰. Die Kombination aus TRAV27/TRAJ42 und der Sequenz CAG-GAIRG-NDMRFAGAGT ist ein Public Motif Typ III und wurde im Zusammenhang mit Influenza-Infektion/Vakzinierung beschrieben ¹³¹. Zwei weitere TRAV-Segmente, TRAV5 und TRAV13-2, weisen keinerlei eingefügte N-Nukleotide auf, ihre Sequenz ist keimbahn-kodiert. Alle ermittelten Sequenzen der TRAV-Segmente sind in Tabelle 30 zu sehen.

Tabelle 30: Tab. CDR3-Sequenzen der TRAV-Produkte der CD28- CD8+ und CD28- CD4+ T-Zellen von Proband 2

	TRAV	TRAJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
CD28- CD8+	5	43	CAES		NQGGKLIFGQGT...	
	6	7	CA	PL	YGNNRLAFGKGN...	
	8-3	30	CAVG	P	NRDDKIIFGKGT...	
	12-1	9	CVVN	FGKG	NTGGFKTIFGAGT...	Typ III
	13-2	19	CAEN		TGGFKTIFGAGT...	
	14DV4	49	CAM	HN	GNQFYFGTGT...	Typ IV
	24	9	CA	PY	TGGFKTMFGAGT...	
	27	43	CAG	GAIRG	NDMRFAGAGT...	Typ III
	34	15	WS	IYP	NFGNEKLTFGTGT...	
CD28- CD4+	TRAV	TRAJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
	21	38	CA	AQG	NAGNNRKLWGLGT...	Typ IV

Ergebnisse

Der public TCR von TRAV27 wurde ebenfalls bei Proband 1 gefunden, allerdings in der Kombination TRAV27/TRAJ43 und der Sequenz CAG-GDGG-SQGNLIFGKGT was einem Public Motif Typ IV entspricht (Tabelle 31).

Tabelle 31: CDR3-Sequenzen der TRAV-Produkte der CD28- CD8+ T-Zellen von Proband 1

CD28- CD8+	TRAV	TRAJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
	8-3	24	CA	SG	DSWGKLQFGAGT...	
	27	42	CAG	GDGG	GGSQGNLIFGKGT...	Typ IV

Proband 4 hat im CD28- CD8+ Kompartiment ein Public Motif Typ II bestehend aus TRAV34/TRAJ30 und der CDR3-Sequenz CGAD-IR-DKIIFGKGT, was ebenfalls im Zusammenhang mit Influenza beschrieben wurde ¹³¹. Für die CDR3-Sequenzen von TRAV22/TRAJ52 und TRAV38-2/TRAJ53 konnte leider keine bereits beschriebenen Public TCRs gefunden werden (Tabelle 32).

Tabelle 32: CDR3-Sequenzen der TRAV-Produkte der CD28-CD8+ und CD28- CD4+ T-Zellen von Proband 4

CD28- CD8+	TRAV	TRAJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
	22	52	CAV	P	GGTSYGKLTFGQGT...	
	34	30	CGAD	IR	DKIIFGKGT...	Typ II
CD28- CD4+	TRAV	TRAJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
	38-2/DV8	53	CA	S	SGGSNYKLTFGKGT...	

Bei Proband 2 wurden drei TRBV-Sequenzen per Direktsequenzierung ermittelt (Tabelle 33), die Kombination aus TRBV19/TRBJ2-2 mit der Sequenz CASS-GEGGP-NTGELFFGEGS stellt ein Public Motif Typ I der Sequenz CAST-PDLSSYNEQFF bei Hepatitis C ¹⁰⁸ dar. TRBV19 bildet außerdem mit TRAV5 bei HIV- ⁵⁶ sowie bei Influenza-Infektion ein Heterodimer mit TRAV5. Abgesehen davon sind die Ähnlichkeiten zu den dort beschriebenen VJ-Kombinationen und Sequenzen gering und stellen ein Public Motif Typ I dar. Jedoch konnten für TRBV10-3/TRBJ2-1 und TRBV18/TRBJ2-1, die verbleibenden TCR Sequenzen der β -Ketten, keine public TCRs in der Literatur gefunden werden.

Tabelle 33: CDR3-Sequenzen der TRBV-Produkte der CD28-CD8+ T-Zellen von Proband 2

CD28- CD8+	TRBV	TRBJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
	10-3	2-1	CVLLC	LPPWGA	SYNEQFFGPGT...	
	18	2-1	CASS	SRGSFV	SYNEQFFGPGT...	
	19	2-2	CASS	GEGGP	NTGELFFGEGS...	Typ I

Zudem fällt auf, dass sich in der CDR3-Region von TRBV10-3 –LPPWGA- drei relativ große, aromatische Aminosäuren hintereinander befinden. Dabei handelt es sich um zwei Proline (P), gefolgt von einem Tryptophan (W), diese werden flankiert von den kleinen Aminosäuren Leucin (L), Glycin (G) und Alanin (A). Diese Anordnung der Aminosäuren in der CDR3-

Ergebnisse

Region könnte ein Hinweis auf einen möglichen public TCR bei TRBV10-3 sein. Denn es wurde bereits beschrieben, dass public TCRs oft eigenartig geformte, wie z.B. beulenartige 132–134 oder sehr flache 135–137 Peptide, erkennen.

3.7.5. CDR3-Sequenzen der TRBV-Segmente nach V β J β -PCR

Trotz deutlich erkennbarer Single Peaks konnten manche TRBV-Segmente bei verschiedenen Probanden nicht sequenziert werden. Für TRBV12-3 konnten bei Proband 1 jedoch durch die J β -PCR drei unterschiedliche CDR3-Regionen der CD28-CD4+ T-Zellen ermittelt werden. Im Agarosegel wurden Banden bei den Produkten von TRBV12-3/TRBJ1-5, 1-6, 2-1 und 2-5 sichtbar (Abbildung 38).

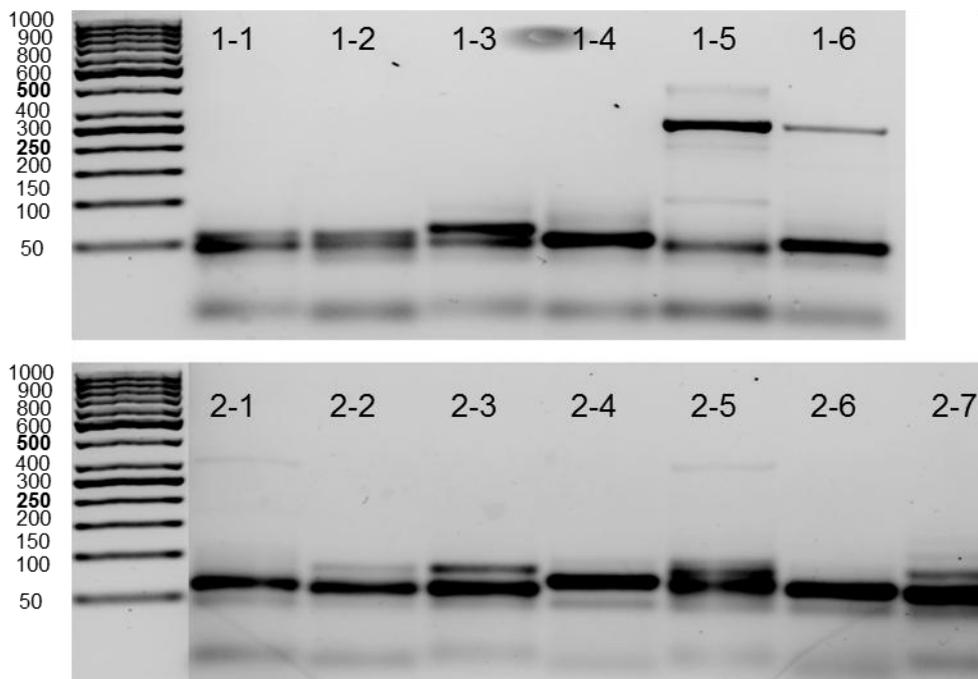


Abbildung 38: 2% Agarosegel mit den jeweiligen TRBV12-3/TRBJ1- (oben) und TRBV12-3/TRBJ2-Produkten der CD28- CD4+ T-Zellen von Proband 1. Deutlich zu sehen sind die Banden von TRBJ1-5 und TRBJ1-6 bei ca. 300 Bp, schwach erkennbar die Banden von TRBJ2-1 und TRBJ2-5 ebenfalls bei ca. 300Bp.

Die Sequenzierung dieser Produkte lieferte Sequenzen für TRBJ1-5, 1-6 und 2-5, nicht jedoch für 2-1 (Tabelle 34). Für TRBV12-4 wurden im Zusammenhang mit CMV und EBV bereits public TCRs beschrieben⁵¹. TRBV12-4 ist zu 97,7% homolog mit TRBV12-3, die ermittelten Sequenzen kennzeichnen in diesem Fall ein Public Motif Typ I.

Tabelle 34: CDR3-Sequenzen der TRBV12-3-Produkte der CD28-CD4+ T-Zellen von Proband 1 nach V β J β -PCR

	TRBV	TRBJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
CD28- CD4+	12-3	1-5	CASR	PNRDH	PQHFGDGT...	
	12-3	1-6	CASR	LSS	NSPLHFGNGT...	
	12-3	2-5	CASS	SHRCYE	QYFGPGT...	

Ergebnisse

Bei Proband 4 gab es ebenfalls mehrere single Peaks bei den TRBV-Segmenten, die nicht sequenzierbar waren. Nach erfolgter $V\beta J\beta$ -PCR wurden ebenso bei TRBV12-3, jedoch im CD28- CD8+ Kompartiment, Banden für TRBJ1-1, 1-5, 2-1, 2-5 und 2-7 sichtbar, wobei nur TRBJ1-5 stark exprimiert war (Abbildung 39).

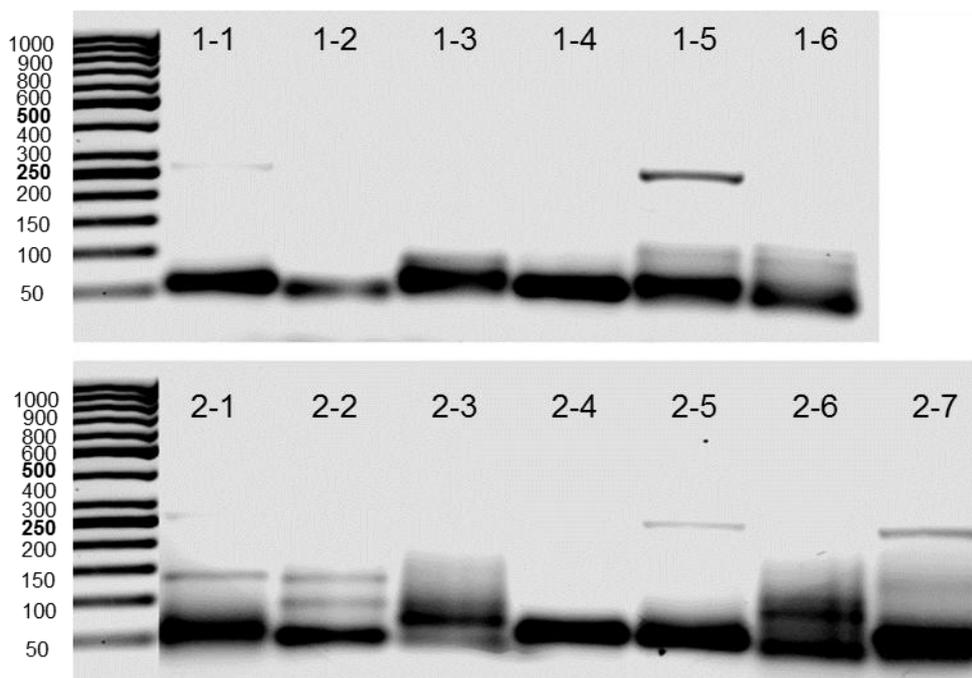


Abbildung 39: 2% Agarosegel mit den jeweiligen TRBV12-3/TRBJ1- (oben) und TRBV12-3/TRBJ2-Produkten der CD28-CD4+ T-Zellen von Proband 4. Deutlich zu sehen ist die Bande von TRBJ1-5 bei ca. 300 Bp, auch erkennbar die Banden von TRBJ1-1, 2-1, 2-5 und TRBJ2-7 ebenfalls bei ca. 300Bp.

Die Sequenzierung der $V\beta J\beta$ -Produkte ergab eine Sequenz für die Kombination TRBV12-3/TRBJ1-5 bei den CD28- CD8+ T-Zellen von Proband 4 (Tabelle 35).

Tabelle 35: CDR3-Sequenz der TRBV12-3-Produkte der CD28-CD4+ T-Zellen von Proband 4 nach $V\beta J\beta$ -PCR

CD28- CD8+	TRBV	TRBJ	Variabel	CDR3	Joining	Public Motif
	12-3	1-5	CASS	LGPI	NQPHFGDGT...	

Wie bereits gezeigt, ist das Repertoire der TRBV-Segmente bei CD28- T-Zellen eingeschränkter als das der TRAV-Segmente. Jedoch bestehen die Single Peaks der β -Ketten nicht wie bei den α -Ketten nur aus einer einzigen Sequenz. In den seltensten Fällen waren die die TRBV-Segmente direkt sequenzierbar waren und offenbaren erst durch die diskriminierende $J\beta$ -PCR bis zu drei Sequenzen eines Single Peaks.

3.7.6. Identische CDR3-Sequenzen der TRAV-Segmente in der CD28+ und CD28- Population

Um zu evaluieren, ob die im CD28- Kompartiment gefundenen CDR3-Sequenzen auch im CD28+ Kompartiment vorkommen, wurden 14 TRAV Sequenz-spezifische Primer für mehrere Single Peaks im CD28- Kompartiment bei allen Probanden erstellt. Mit diesen

Ergebnisse

Primern wurde das Vorhandensein dieser Sequenzen in der CD28+ Fraktion untersucht. Die Existenz identischer CDR3-Sequenzen von TRBV-Segmenten im CD28+ und CD28- Kompartiment wurde für CD4+ T-Zellen bei HIV¹³⁸ und für CD8+ T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation¹³⁹ gezeigt, für TRAV-Segmente bisher noch nicht. Proband 2 lieferte zwei CDR3-Sequenzen für Single Peaks von TRAV 8-1 und TRAV27 im CD28- CD8+ Kompartiment. Die PCR mit den Sequenz-spezifischen Primern und die anschließende Fragmentlängenanalyse im Sequenzierer zeigten, dass zumindest die Sequenz von TRAV8-1 auch im CD28+ Kompartiment existiert, nicht jedoch von TRAV27 (Abbildung 40).

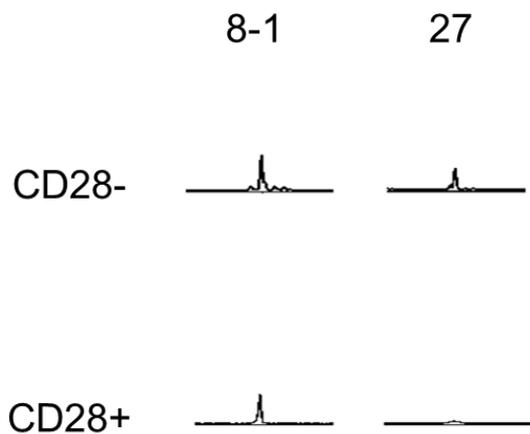


Abbildung 40: Identische Single Peaks im CD28- und CD28+ CD8+ Kompartiment bei Proband 1

Die Analyse der Single Peaks der TRAV-Segmente im CD28- CD8+ Kompartiment von Proband 2 ergab neun CDR3-Sequenzen und eine im CD28- CD4+ Kompartiment (Abbildung 41). Bis auf TRAV21 im CD28+ CD4+ Kompartiment ließen sich alle Sequenzen als Single Peaks im CD28+ Kompartiment nachweisen.

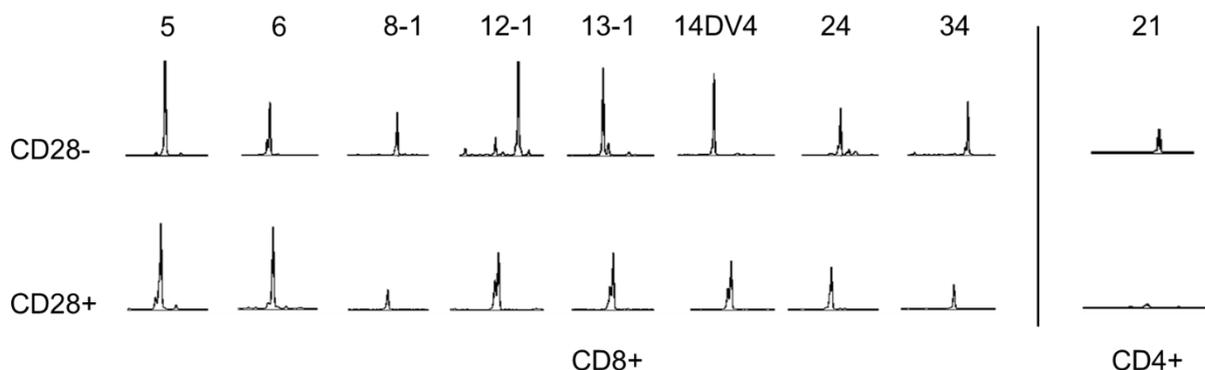


Abbildung 41: Identische Single Peaks von TRAV-Segmenten im CD28- und CD28+ CD8+ sowie CD4+ Kompartiment bei Proband 2.

Die Sequenzierung der als Single Peaks vorkommenden TRAV-Segmente im CD28- Kompartiment ergab bei Proband 1 zwei CDR3-Sequenzen in der CD8+ Fraktion und eine

Ergebnisse

CDR3-Sequenz in der CD4+ Fraktion. Diese waren durch die PCR mit den Sequenz-spezifischen Primern auch im CD28+ Kompartiment zu finden (Abbildung 42). Die deutlich stärkere Expression von TRAV38-2DV8 im CD28+ Kompartiment lässt sich damit erklären, dass die CD28+ CD4+ Fraktion um ein Vielfaches größer ist als ihr CD28- CD4+ Gegenpart und damit mehr RNA zur Verfügung stand.

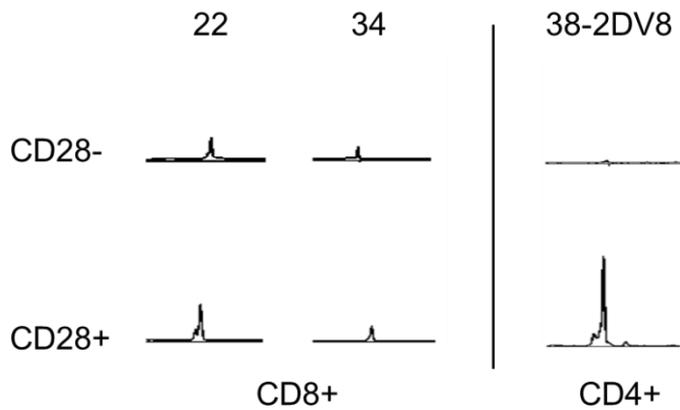


Abbildung 42: Identische Single Peaks im CD28- und CD28+ CD8+ sowie CD4+ Kompartiment bei Proband 1

Zusammengefasst bedeutet dies, dass 12 von 14 untersuchten CDR3-Sequenzen von CD28- T-Zellen sich auch in CD28+ T-Zellen finden lassen. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den Single Peaks im CD28- Kompartiment um klonal expandierte T-Zellen handelt, die aus dem CD28+ Kompartiment hervorgegangen sind.

4. Diskussion

Der Ansatz dieser Arbeit war es T-Zellen zu generieren, die spezifisch für SNPs in verschiedenen, Hämatopoese-restringierten Genen des Menschen sind. Durch die Restriktion auf das hämatopoetische System sollten Nebenwirkungen, wie die Schädigung anderer Organe und Gewebe, vermieden werden. Leukämie tritt in unterschiedlichen Formen auf und kann verschiedene Altersklassen betreffen. In Deutschland geht man von ca. 12000 Erkrankungen pro Jahr aus (www.kompetenznetzwerk-leukaemie.de), darunter befinden sich 600 Kinder.

Die höchste Inzidenz bei Kindern zeigt die akute lymphoblastische Leukämie (ALL). Sie ist durch den Einsatz moderner Chemotherapeutika meist gut zu behandeln. Jedoch sind diese Medikamente äußerst toxisch und schädigen den sich in der Entwicklung befindlichen Körper des Kindes enorm. Häufige Folgen der Behandlung sind Infertilität verbunden mit einem hohen Rezidiv-Risiko. Zurzeit bietet die Medizin keine ausreichende Alternative zur Chemotherapie, die dieselben Chancen auf eine Heilung, bei weniger Nebenwirkungen und Komplikationen, verspricht.

Die Transplantation von allogenen Stammzellen nach erfolgter Chemotherapie ist der Versuch das Immunsystem des Patienten „neu zu starten“. Ein gesundes und erfolgreich funktionierendes Immunsystem soll durch die transplantierten Zellen wieder etabliert werden. Mit der Transplantation von allogenen Zellen ist jedoch das Risiko einer Graft-versus-Host-Reaktion (GvH) verbunden, die je nach Schwere auch zum Tod des Patienten führen kann.

Um das Risiko einer GvH-Reaktion zu minimieren und den Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL) zu verstärken, sind die ausgewählten Minorantigene ausschließlich auf hämatopoetische Zellen restringiert, wodurch Reaktionen in anderen Geweben vermieden werden sollen. In diesem Zusammenhang konnten bei Experimenten mit dem Minorantigen HA-1 bereits sehr gute Ergebnisse verzeichnet werden ^{140,141}. Die Minorantigene codierenden Gensequenzen zeichnen sich durch einen hohen Polymorphismus aus, das heißt SNPs treten gehäuft auf. Durch moderne Gensequenzierungsmethoden ist es möglich, die Häufigkeit eines SNPs innerhalb der Bevölkerung vorherzusagen. Allerdings kann nicht im Vorhinein beurteilt werden, ob ein SNP immunogenes Potential besitzt oder nicht. Die Immunogenität der mutierten Minorantigene sollte durch die T-Zellantwort der expandierten spezifischen T-Zellen validiert werden.

Allerdings zeigte keiner der untersuchten SNPs immunogenes Potential, denn in keinem Ansatz konnten SNP-spezifische T-Zellen im FACS detektiert oder klonal expandiert werden. Die isolierten naiven CD8+ CD45 RO- T-Zellen überdauerten zwar in den Kulturen, zeigten aber keine Reaktion auf die Stimulation mit den synthetisierten Peptiden, weder der natürlich vorkommenden (Kontrollen) noch der SNP-Variante.

Diskussion

Konzeptionelle und methodische Fehler im Versuchsansatz können weitgehend ausgeschlossen werden, da sich strikt an die entsprechenden Vorgaben gehalten wurde. Es wurde darauf geachtet, dass a) das Gen ausschließlich in Zellen der Hämatopoese exprimiert wird, b) die Spender HLA-typisiert und in der Lage sind das Peptid zu präsentieren und c) durch Epitopvorhersage sichergestellt war, dass eine Präsentation wahrscheinlich ist. Auch wenn es in diesen Ansätzen nicht gelang neue, durch SNPs hervorgerufene Minorantigene zu entdecken und deren immunogenen Charakter zu validieren, sollten weitere Experimente durchgeführt werden, da Minorantigene großen therapeutischen Nutzen als T-Zelltargets haben ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Alternative Ansätze sind z.B. ein vorangehendes Screening von Patient und Empfänger auf einige ausgewählte SNPs und der Versuch, durch die Verwendung eines Peptidcocktails unterschiedliche SNP-spezifische T-Zellklone zu identifizieren. Dies würde die notwendige Menge an T-Zellen zum Primen geringstmöglich halten.

Virus-spezifische T-Zellen

In der Transplantationsmedizin bei hämatologischen Erkrankungen spielt jedoch nicht nur die Immunität gegen den Tumor und ein drohendes Rezidiv eine Rolle, sondern auch die Immunität gegenüber Viren und Bakterien. Vor allem während der Phase, in der nach Stammzelltransplantation ein neues Immunsystem generiert wird, also noch keine Immunkompetenz des Patienten gegenüber Infektionen besteht. Abhilfe kann geschaffen werden durch den adoptiven Transfer von Virus-spezifischen T-Zellen. Diese können genau wie Minorantigen-spezifische T-Zellen ex vivo von einem geeigneten Spender, in diesem Fall dem Stammzellspender, generiert werden. So werden beispielsweise Virus-spezifische Zellen generiert, die Epstein-Barr Virus (EBV) spezifisch sind. EBV ist ein Virus, das zur Familie der Herpesviren gehört. Es wird angenommen, dass ca. 90% der Menschen über 40 Jahren sich mit diesem Virus infiziert haben ¹⁴⁵. EBV infiziert v.a. B-Zellen und wird mit unterschiedlichen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht, z.B. dem Burkitt Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom oder dem Hodgkin und non-Hodgkin Lymphom ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Durch die Transformation von Lymphoblasten mit EBV entstehen Zelllinien ¹⁵⁰, die in experimentellen Ansätzen mit zytotoxischen T-Zellen genutzt werden, um die zytotoxische Effizienz dieser T-Zellen zu bestimmen. Es ist möglich T-Zellen zu generieren, die entweder für Peptide der lytischen/produktiven Phase oder der latenten/nicht produktiven Phase des viralen Zyklus spezifisch sind ^{151,152}. Die Expression des hoch immunogenen „immediate early“ Proteins BZLF-1 des EBV initiiert die lytische Phase in den von EBV befallenen Zellen ^{153,154} sowie die damit verbundene virale Replikation und ist dadurch ein prominentes Ziel für Peptid-spezifische T-Zellen. In den meisten wissenschaftlichen Publikationen dominierten CD8+ T-Zellen die Immunantwort, aber auch BZLF-spezifische CD4+ T-Zellen wurden bereits beschrieben. Da unsere Arbeitsgruppe einen T-Zellprogenitor identifiziert hat, der aus der

Diskussion

angeborenen Immunität stammt und in $\alpha\beta$ T-Zellen differenziert, wollten wir eruieren, ob dieser Progenitor möglicherweise als Ausgangspopulation für die Generierung von Epitop-spezifischen T-Zellen verwendet werden könnte.

Für diesen Ansatz entschieden wir uns für das Peptid der vorliegenden Arbeit – EPLPQGQLTAY – das HLA-B*3501 restringiert und in der Lage ist spezifische CD8+ T-Zellen zu induzieren. In einem klassischen Ansatz können durch die Präsentation dieses Peptids auf autologen HLA-geeigneten Feederzellen aus naiven $\alpha\beta$ T-Zellen BZLF-1 spezifische T-Zellen generiert werden. In früheren vorhergehenden Experimenten¹⁵⁵ sowie in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellklone als auch die Gesamtheit an $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellen in $V\delta 1+$ Bulk T-Zellkulturen in $\alpha\beta$ T-Zellen transdifferenzieren können. Nun stellt sich neben der Frage nach der Spezifität der generierten T-Zellen die nach dem phänotypischen Charakter dieser transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen. Besitzen die in einem klassischen Prime- und Induktionsansatz entstandenen $\alpha\beta$ T-Zellen das Potential, eine Peptid-spezifische Immunantwort zu vermitteln? Gelingt es also auf diese Weise EBV-spezifische T-Zellen herzustellen und wenn ja, was für einen TCR haben diese Zellen? Die hier gewonnenen Ergebnisse sind vielschichtig. Eine Transdifferenzierung von $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellen in $V\delta 1+$ Bulk T-Zellkulturen zu $\alpha\beta$ T-Zellen war sowohl in dem Ansatz mit Peptid-beladenen Feederzellen als auch in der Kontrollgruppe erfolgreich, jedoch konnten bei keinem der drei Probanden BZLF-1-spezifische T-Zellen per FACS-Analyse nachgewiesen werden. Zudem waren die transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen zu nahezu gleichen Anteilen CD4+ und CD8+, was auch gegen eine gezielte Reaktion/Selektion auf das zur Induktion verwendete MHC I restringierte BZLF-1 Peptid spricht.

Um Rückschlüsse auf eine eventuelle Entstehung von $\alpha\beta$ T-Zellen generell und die Breite des entstehenden $\alpha\beta$ T-Zellrepertoires im Speziellen ziehen zu können, wurde die Expression von TRAV- und TRBV-Segmenten der entstandenen $\alpha\beta$ T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultur gemonitort. Außerdem wurde eine komparative Analyse der ermittelten CDR3-Sequenzen von TRAV- und TRBV-Segmenten mit bereits publizierten Sequenzen vorgenommen. Somit sollten in erster Linie EBV-spezifische Sequenzen bestätigt werden als auch mögliche public TCRs innerhalb der transdifferenzierten Population detektiert werden. Public TCRs sind TCRs, die bei mehreren, nicht-verwandten Individuen einer Spezies und gleicher HLA-Loci auftreten können^{76,156}. Gleichzeitig wurden die TRBV-Segmente mittels spezifischer Antikörper auch per FACS-Analyse nachgewiesen. Antikörper, die humane TRAV-Segmente erkennen, stehen leider nicht zur Verfügung.

Die mit BZLF-1 gepulsten Feederzellen inkubierte Kultur zeigte ebenso wie die Kontrollgruppe sowohl auf RNA- als auch Proteinebene eine Vielzahl von TRAV- und TRBV-Segmenten. Die T-Zellpopulation der Kontrollgruppe wurde im FACS von TRBV28 dominiert,

Diskussion

was für eine klonale Expansion gerichtet gegen ein bestimmtes Epitop spricht. Für TRBV28 gibt es bereits mehrere beschriebene public TCRs, unter anderem bei HLA-B*3501+ Individuen in Zusammenhang mit CMV sowie dem EBV-Peptid BZLF-1 und bei HLA-A*0201+ Probanden in Reaktion auf das Melanompeptid Melan-A/MART1. Die Kombination aus TRBV28/TRBJ2-5 mit der Sequenz CASS – LWTSGGAR zeigt jedoch lediglich in der Verwendung von TRBV28 Übereinstimmung mit den in den Publikationen beschriebenen public TCRs, weswegen davon auszugehen ist, dass es sich um ein Public Motif Typ I handelt.

Um Aufschluss über die Spezifität der zu über 80% TRBV28+ transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen zu erhalten, wurden diese mit pp65-stimulierten Feederzellen weiter kultiviert. Die in der Kultur mit unstimulierten Feederzellen in Woche 8 erhaltene TRBV28+ T-Zellpopulation verschwand innerhalb drei weiterer Wochen in Kultur mit pp65-stimulierten Feederzellen völlig. Zusätzlich kamen neue TRAV- und TRBV-Segmente hinzu, die bisher noch nicht exprimiert waren. Dessen ungeachtet gab es trotz mehrwöchiger Kultivierung mit pp65-gepulsten Feederzellen keine Hinweise auf CMV-spezifische T-Zellen, weder im Spectratype noch im FACS. Es bleibt somit offen, welcher Spezifität die TRBV28+ Zellen zugeordnet werden können. Wobei ist aber ziemlich unwahrscheinlich ist, dass es sich um BZLF-1-spezifische Zellen handelt, da im FACS keine Tetramer-positiven Zellen zu detektieren waren.

Eindeutige Single Peaks, die auch eine verwertbare CDR3-Sequenz lieferten, waren bei TRAV10, TRAV28-2 und TRBV10-3 im Spectratype zu erkennen. Die Sequenz von TRAV10/TRAJ24 CVVS-ATDSWGKFGAGT ist keimbahn-kodiert und enthält keine durch TdT-Aktivität eingefügten N-Nukleotide. Jedoch konnten weder für diese α -Kette noch für die komplette TRAV10/TRAJ24 CDR3-Sequenz CVVS-ATDSWGKFGAGT public TCRs gefunden werden. Vielmehr gibt es einen Zusammenhang mit iNKT-Zellen. So ist die Expression von TRAV10 und eine Keimbahn-kodierte CDR3-Sequenz bei fast allen humanen iNKT-Zellen zu finden ¹¹⁰⁻¹¹², allerdings (nur) in Kombination mit TRAJ18. Bevorzugt setzt sich der TCR bei iNKT-Zellen aus TRAV10 und TRBV25-1 zusammen. Das Segment TRBV25-1 konnte im Spectratype nachgewiesen, aber nicht sequenziert, werden. Die Verwendung eines iNKT-spezifischen Antikörpers für TRAV10/TRBV25-1 im FACS ergab jedoch keine Bestätigung für iNKT-Zellen mit dieser TCR-Kombination.

Die bei TRAV26-1/TRAJ23 identifizierte CDR3-Sequenz CIVR-LQGGKLIFGQGT wird im Kontext mit Zöliakie (Glutenintoleranz) in zwei verschiedenen Publikationen als public TCR beschrieben. Dabei stellt die ermittelte CDR3-Sequenz sowohl ein public Motif Typ IV gegenüber der publizierten Sequenz CIVR-AQGKLIFGQGT ¹¹⁴ dar als auch ein public Motif Typ I, da in diesem Fall lediglich das Segment TRAV26-1 übereinstimmt ¹¹⁵. Für die Sequenz

Diskussion

CASQ-DQLKTGF aus TRBV10-3/TRBJ1-6 konnte kein public TCR in der Literatur gefunden werden.

Die Kultivierung mit BZLF-1 gepulsten Feedern resultierte in einer sehr heterogenen Verteilung von TRAV- und TRBV-Segmenten der transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen, was zu erwarten war, da bereits die Pentamerfärbung keine Peptid-spezifischen T-Zellen nachwies. Betrachtet man die Ergebnisse der $V\alpha$ - und $V\beta$ -Spectratypes im zeitlichen Verlauf wird ersichtlich, dass die mit BZLF-1-gepulsten-Feederzellen-kultivierten Bulk $V\delta 1+$ T-Zellen früher in die Transdifferenzierung übergingen als die ohne Peptid kultivierten. Außerdem waren TRAV- und TRBV-Segmente rascher nachweisbar und auch der Complexity Score war deutlich höher. Um die durch Transdifferenzierung gewonnenen $\alpha\beta$ T-Zellen zu charakterisieren und Aufschluss über ihre mögliche Spezifität zu erhalten, wurden die erkennbaren Single Peaks im $V\alpha$ - oder $V\beta$ -Spectratype sequenziert.

So gibt es bei dem in dieser Arbeit getesteten Probanden die CDR3-Sequenz CAV-SPDTGRRALTFGFGT bei TRAV3/TRAJ5, die ein public Motif Typ II gegenüber der bereits beschriebenen Sequenz CAVRDLLRSGGYNKLIF bei TRAV3/TRAJ4¹⁰⁶, darstellt. Zufälligerweise ging es in der Arbeit von Miles *et al* ebenfalls um die Reaktion von T-Zellen auf das EBV-Peptid EPLPQGQLTAY.

Die in Woche 8 ermittelte CDR3-Sequenz von TRBV7-2/TRBJ2-2 bzw. TRBV7-6/TRBJ2-2 CAST-PGTSVGYTGELFFG ist ein public Motif Typ III gegenüber CASS-PGQGVGGELFFG. Diese Sequenz wurde in der CD8+ CD45RO-CD45RA+ T-Zellpopulation eines EBV-seropositiven, HLA-B*08+ Spenders gefunden¹⁰⁷. Des Weiteren sind die Sequenzen CASS-HADRVKTQYFGPGT von TRBV4-1/TRBJ2-5 sowie CAIR-AGTSGDKTQYFGPGT von TRBV10-3/TRBJ2-5 im Kontext mit Hepatitis C beschrieben worden¹⁰⁸ und sind ein public Motif Typ IV.

Darüber hinaus ließen sich CDR3 Sequenzen von zehn weiteren TRAV- und einer TRBV-Kette ermitteln, die sich aber nicht mit bereits publizierten Ergebnissen in Bezug auf ihre Sequenz decken und damit als private TCRs angesehen werden können. Die Kultivierung der pan $V\delta 1$ T-Zellpools mit BZLF-1 stimulierten Feederzellen führte somit zur Generierung sowohl EBV-spezifischer T-Zellen als auch zu T-Zellen anderer Spezifität, nicht aber gezielt BZLF-1 spezifischer T-Zellen. Genauer gesagt muss die Zugabe des Peptids akzessorische Zellen der Kultur in bestimmter Weise verändert haben, was die Progenitorfraktion der $V\delta 1+$ T-Zellen zur Transdifferenzierung veranlasste, nicht aber eine mögliche Selektion derselben durch Präsentation des Peptids. Damit konnten wir zeigen, dass es so möglich ist $\alpha\beta$ T-Zellen zu generieren und zu expandieren, jedoch erhielten wir hier nicht, wie beabsichtigt, $\alpha\beta$ T-Zellen einer definierten Spezifität wie es die Ansätze mit BZLF-1 und pp65 belegen. Dass keine Generierung von BZLF-1 spezifischen T-Zellen gelang, muss jedoch differenziert

Diskussion

betrachtet werden. Denn es könnte möglich sein, dass die Anzahl des eingesetzten Progenitors nicht hoch genug war um statistisch die Wahrscheinlichkeit zu erreichen, dass ein $\alpha\beta$ TCR generiert wird, der ein Epitop erkennen kann. Dies relativiert dieses Negativergebnis. Die Frequenz eines TCR, der ein definiertes Epitop erkennt, liegt bei ca. 0.08%. Die Gesamtheit an V δ 1+ CD4+ Progenitoren pro Kulturansatz/Peptid war jedoch geringer als 1 Million Zellen.

Unabhängig vom V δ 1 T-Zell-Progenitor könnte man annehmen, dass public TCRs, die jedem Individuum zu eigen sind, durch bestimmte Stereotypen an epigenetischen Bedingungen für die Rekombination spezifischer TRAV- und TRBV-Segmente bedeutsam sind. Die Struktur eines TCR wird bestimmt durch die Aneinanderreihung von Aminosäuren. Diese wiederum werden durch die sie codierenden Basentriplets festgelegt. Ein TCR mit niedriger Bindungsaffinität und speziellen Aminosäuren an kritischen Punkten (Ankerpositionen) der Peptid-MHC-Bindungsstelle könnte ein breites Spektrum möglicher Bindungspartner abdecken¹⁵⁷. Spezialfälle sind z.B. große, beulenartige Strukturen durch die Präsenz von Aminosäuren wie Tryptophan oder flache Strukturen bedingt durch das Vorhandensein vieler Glycine und Alanine oder gar Keimbahn-codierte Sequenzen ohne eingefügte N-Nukleotide. Es wurden bereits public TCR-Sequenzen in den β -Ketten des TCR beschrieben, die sowohl für EBV als auch CMV spezifisch sind⁵¹.

In der Kontrollgruppe, die in dieser Arbeit ohne Peptid geführt wurden, gab es insgesamt mehr TRAV- aber weniger TRBV-Segmente und die Anzahl der Single Peaks (die klonalen Expansionen entsprechen) der TRBV-Segmente war geringer als die der TRAV-Segmente. Dies könnte auf die präferierte Bildung von dualen TCRs hindeuten (zwei α - & eine β -Kette), bzw. auf eine Längenrestriktion einer β -Kette, die mit multiplen α -Ketten paaren kann, oder multiplen, jedoch längenrestringierten β -Ketten. Da sich der Single Peak nicht in direktem Sequenzierungsansatz identifizieren ließ, ist letzteres wahrscheinlich. In einem klassischen Klonierungsansatz, der die TRBV Transkripte kloniert, ließe sich die Komplexität des TRBV-Repertoires belegen.

Die Expression von TRBV28, das auf Proteinebene die $\alpha\beta$ T-Zellpopulation dominierte, kodiert interessanterweise einen public TCR vom Typ IV, der bereits im Zusammenhang mit einem TCR spezifisch für das Melanompeptid Melan-A/MART1 beschrieben wurde. Für die CDR3-Sequenzen der TRAV-Segmente konnte keine Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Sequenzen gefunden werden.

Es fällt insgesamt auf, dass es keine Übereinstimmungen der CDR3-Sequenzen bei den transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen aus der BZLF-1 Kultur und der unstimulierten Kontrollgruppe gibt. In Woche 5 erreicht die Anzahl der exprimierten TRAV-, in Woche 2 die der TRBV-Segmente ihr zahlenmäßiges Maximum an Diversität, sowohl bei der mit BZLF-1 stimulierten Gruppe als auch der unstimulierten Kontrollgruppe. Auch wenn die Gesamtzahl der diversen

variablen Segmente fast gleich ist, so unterscheidet sich doch die Anzahl der identifizierten CDR3-Sequenzen. Die aus den mit BZLF-1 stimulierten Feederzellen transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen zeigen mehr Single Peaks, was indikativ für erfolgreiche Induktion und klonale Expansionen ist und liefern elf Sequenzen bei den TRAV- sowie vier bei den TRBV-Segmenten gegenüber sechs TRAV- und einer TRBV-Sequenz bei den nicht Peptid exponierten Kulturen. Lediglich für TRAV24 kann in beiden Gruppen eine Sequenz ermittelt werden, die jedoch keine Gemeinsamkeit aufweist.

Festzuhalten ist aus diesen Ergebnissen eindeutig, dass aus $V\delta 1+$ Bulk T-Zellkulturen $\alpha\beta$ T-Zellen gewonnen werden können. Die große Fülle an TRAV- und TRBV-Segmenten, die rasche Transdifferenzierung der kultivierten $V\delta 1+$ T-Zellen und die folgende Proliferation der $\alpha\beta$ T-Zellen sind ein Indiz für das ungeheure Potential von pan $V\delta 1$ T-Zellpools. Hier im Speziellen der $CD4+ V\delta 1+ \gamma\delta$ T-Zellen, die in der Lage sind, das $\alpha\beta$ T-Zellkompartiment Thymus-unabhängig zu unterfüttern. Einige der gewonnenen CDR3-Sequenzen stehen für verschiedene public TCRs, d.h. eine CDR3-Sequenz, die identisch oder zumindest ähnlich zu bereits publizierten CDR3-Regionen beschriebener Spezifität sind, und damit als public bewertet werden kann. Die hier transdifferenzierte $\alpha\beta$ T-Zellpopulation zeigt außerdem eine Fülle an privaten TCR-Rearrangements, wie der Verlauf der TRAV- und TRBV-Expression während der Kultivierung deutlich macht.

Ansätze mit $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zell Klonen

Da die Ergebnisse der Bulk $V\delta 1$ T-Zellkulturen große Schwankungen im Prozentsatz transdifferenzierter $\alpha\beta$ T-Zellen und damit der Effizienz der Transdifferenzierung zeigten, wurden Experimente auf Einzelzell-Ebene, d.h. klonaler Ebene vorgenommen. Die Transdifferenzierung von $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellkulturen zu $\alpha\beta$ T-Zellen zu untersuchen erwies sich als Herausforderung, denn entweder wechselte die $V\delta 1$ $CD4+$ -Ausgangspopulation schnell und nahezu komplett ihren Phänotyp oder gar nicht. Der Vorgang der Transdifferenzierung fand statt, unabhängig davon ob im allogenen oder autologen Setting gearbeitet wurde. Jedoch kam es nicht bei jedem $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklon zur Transdifferentiation in $\alpha\beta$ T-Zellen. Die von uns beschriebene Fähigkeit von $V\delta 1+$ $CD4+$ T-Zellklonen zur Transdifferenzierung¹⁵⁵ wurde mit den Experimenten dieser Arbeit bestätigt. Außerdem gelang es in dieser Arbeit erfolgreich $\alpha\beta$ T-Zellen aus $V\delta 1+$ Bulk T-Zellen, die darüber hinaus aus zuvor $\alpha\beta$ T-Zell-depletierten PBMNCs stammen, in unterschiedlichen Ansätzen zu generieren. Als nächstes sollten grundsätzliche Mechanismen, die diese Transdifferenzierung beeinflussen, untersucht werden.

Der Auslöser (Trigger) für die Transdifferenzierung scheint multifaktorieller Natur zu sein und stark mit dem Immunstatus des jeweiligen Individuums, aus dem der Progenitor entnommen wurde, zu korrelieren auch wenn dafür kein formaler Beweis gefunden werden konnte. Für die Transdifferenzierung nötig waren jedoch mehrere Faktoren: von essentieller Bedeutung

sind die eingesetzten Feederzellen und deren Aktivierungsstatus. Die Stimulation derselben mit α -CD3/CD28, um eine starke Aktivierung des Immunsystems zu simulieren, sowie die Zugabe verschiedener Zytokine, um eine inflammatorische Umgebung widerzuspiegeln, spielten eine untergeordnete Rolle.

Mögliche Auslöser der Transdifferenzierung

Die Blockierung verschiedener Oberflächenmoleküle hatte Einfluss in unterschiedlichem Ausmaße auf die Transdifferenzierung. So erbrachte der Einsatz von blockierenden Antikörpern für HLA-A/B/C und HLA-DR keine Veränderung des Prozentsatzes von transdifferenzierten $\alpha\beta$ T-Zellen, beeinflusste jedoch die Expression der Korezeptoren in umgekehrter Weise. Die Blockierung von MHC Klasse I Molekülen resultierte in einer vermehrten Bildung von CD4+ $\alpha\beta$ T-Zellen und umgekehrt. Die Blockierung des Notch-Liganden DLL4 und des TCR Liganden MICA/B resultierte in einer verstärkten Transdifferenzierung, was andeutet, dass für die Transdifferenzierung nicht ein einzelnes Molekül verantwortlich ist. Die Tatsache, dass mehrere Faktoren in diesen Prozess involviert sind und ihr Zusammenspiel komplexer Natur ist, deutet darauf hin, dass die Differenzierung des Progenitors möglicherweise abhängig vom Überschreiten eines Schwellenwertes ist. Welcher Parameter dabei aber von entscheidender Bedeutung ist bleibt zu klären.

Man kann jedoch davon ausgehen, dass es sich bei der Transdifferenzierung um einen Zellkontakt-abhängigen Mechanismus handelt, da sich die Transdifferenzierung nicht herbeiführen lässt, wenn man die V δ 1 CD4+ T-Zellklone ohne Feederzellen kultiviert. Da wir mit den Untersuchungen der Transdifferenzierung nicht weiterkamen, analysierten wir die Komplexität des TCR Repertoires der V δ 1 CD4+ T Zellklone, aus dem die breite $\alpha\beta$ T-Zellrezeptordiversität hervorging und haben dazu die δ -Kette der TCRs der V δ 1 CD4 Klone sequenziert.

Die Analyse der CDR3-Region des TCRs der V δ 1+ CD4+ T-Zellklone von drei Probanden zeigte zum einen, dass das Repertoire von wenigen bestimmten Sequenzen dominiert wird, zum anderen, dass diese Sequenzen auch bei anderen Individuen vorkommen können. Das spricht für einen semi-invarianten TCR, ähnlich dem von iNKT Zellen innerhalb der $\alpha\beta$ T-Zellen bekannten public TCRs. Der Grund für diese Übereinstimmungen könnte die Positiv-Selektion der Zelle durch ein in geringem Maße polymorphes Molekül sein, wie z.B. MICA. Möglicherweise gibt es einen Bezug zu TCRs von V δ 1 T-Zellen, die bekanntermaßen semi-invariant sind und Sulfatide, bzw. Lipide erkennen, die CD1a-d präsentiert sind. Somit könnten auch diese MHC Klasse Ib Moleküle in Frage kommen.

CD28- T-Zellen als Ausgangspopulation

Um Aufschluss über die generierten $\alpha\beta$ T-Zellen zu erhalten wurden diese in früheren Arbeiten eingehender untersucht. In den $\alpha\beta$ T-Zellfraktionen der transdifferenzierten Zellen

war ein großer Teil CD28 negativ, diese Subfraktion sollte näher untersucht werden. CD28 verstärkt als kostimulatorisches Molekül die T-Zellaktivierung bei spezifischem Antigenkontakt bzw. Priming generell. Dies führt zu einer nachfolgenden Konterregulation, entsprechend als verminderte Expression von CD28 zu detektieren¹⁵⁸, was bei wiederholter Antigenexposition zum kompletten Verlust von CD28 und damit zur Entstehung von CD28-T-Zellen führt^{159,160}. Man spricht in diesem Zusammenhang von replikativer Seneszens der T-Zellen^{126,160}, mit der eine zunehmende „Erschöpfung“ des Immunsystems einhergeht und damit eine Verringerung der Fähigkeit Pathogene erfolgreich abzuwehren. *In vitro* erhobene Daten¹⁶¹ werden durch die Akkumulation von CD28 negativen T-Zellen beim Menschen mit zunehmenden Alter *in vivo* bestätigt^{33,34}.

CD28- T-Zellen sind hochresistent gegenüber Apoptose und können somit mehrere Jahre lang im menschlichen Organismus überdauern und ihre Anzahl über die Zeit stetig erhöhen^{163,164}. Der Verlust von CD28 betrifft sowohl das CD4+ als auch das CD8+ T-Zellkompartiment, die dadurch ihre klassischen T-Helferzellfunktionen eingebüßt haben. So sind CD28- CD4+ T-Zellen nicht in der Lage die Proliferation von B-Zellen und die Produktion von Immunglobulinen zu fördern¹⁶³. CD28- CD8+ T-Zellen besitzen oftmals kein Perforin oder Granzyme mehr um effizient als zytotoxische T-Zellen zu fungieren¹⁶⁵. Stattdessen besitzen sowohl das CD4+ CD28-¹⁶⁶ als auch das CD8+ CD28-¹⁶⁷ T-Zellkompartiment KIR-Rezeptoren (Killer cell Ig-like receptors), wie z.B. NKG2D, dessen Ligand das durch Stress induzierte MHC-ähnliche Molekül MICA/B ist. CD4+ CD28- T-Zellen beherbergen große Mengen an Interferon- γ und wurden im Zusammenhang mit Rheumatoider Arthritis (RA)^{168,169} und koronaren Gefäßerkrankungen¹⁷⁰ als autoreaktiv beschrieben. In mehreren Publikationen bezüglich RA wurden klonale Expansionen mit eingeschränktem TRBV-Repertoire gefunden^{171,172}. Klonale CD8+ CD28- T-Zellexpansionen treten hingegen bei Virusinfektionen wie EBV, CMV, Hepatitis C oder HIV gehäuft auf^{165,173-176}. Durchgeführte FACS-Analysen von aus Transdifferenzierungsexperimenten gewonnenen $\alpha\beta$ T-Zellpools belegen, dass manche, jedoch nicht alle aus Bulk $V\delta 1$ T-Zellpools oder $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellklonen transdifferenzierte $\alpha\beta$ T-Zellen einen CD28- Phänotyp besitzen. Um zu klären, ob die Transdifferenzierung möglicherweise dieses Kompartiment des Immunsystems stellt, wurden die TCRs der CD28+ und CD28- T-Zellfraktionen untersucht. Deutliche Unterschiede zwischen CD28+ und CD28- T-Zellpopulation gibt es in der Expression von TRAV- und TRBV-Segmenten, sowohl was deren Anzahl als auch Diversität anbelangt. CD28+ T-Zellen repräsentieren die Mehrheit der humanen T-Zellpopulation und exprimieren nahezu alle untersuchten variablen Segmente, was sich in einem breit gefächerten Repertoire widerspiegelt. Dabei war es unerheblich ob die CD28+ T-Zellen CD4 oder CD8 als Korezeptor tragen. Aufgrund der polyklonalen Verteilung war es nicht möglich einzelne CDR3-Sequenzen zu erhalten. Mehrere TRAV- und TRBV-Segmente der CD28- T-

Diskussion

Zellpopulation hingegen sind als Single Peaks detektierbar, was ein Anzeichen für eine monoklonale Expansion ist, die Dominanz einer bestimmten CDR3-Sequenz daher wahrscheinlich ist. Durch Direktsequenzierung gelang es für nahezu alle Single Peaks eine spezifische CDR3-Sequenz zu erhalten. Unter diesen CDR3-Sequenzen gab es zahlreiche Public TCRs, d.h. T-Zellrezeptoren, die bei mehreren, nicht-verwandten Individuen einer Art auftreten können. Bei Proband 1 konnten lediglich im CD28- CD8+ Kompartiment die Sequenzen CA-SGDSWGKLQFGAGT von TRAV8-3/TRAJ24 und CAG-GDGGGGSQGNLIFGKGT von TRAV27/TRAJ42 gefunden werden. Die CDR3 Sequenz von TRAV27/TRAJ42 stellt ein Public Motif IV zu CAG-GAIRGNDRMFGAGT von TRAV27/TRAJ43 dar, die im CD28- CD8+ Kompartiment von Proband 2 gefunden wurde. Beschrieben wurden Sequenzen mit multiplen Glycinen zusätzlich im Zusammenhang mit Influenza ¹³¹ und sind deshalb ein Public Motif Typ III zu den bereits publizierten CDR3-Sequenzen.

Die meisten TRAV-Segmente konnten bei Proband 2 sequenziert werden. Insgesamt 9 CDR3-Sequenzen von CD28- CD8+ und eine Sequenz von CD28- CD4+ T-Zellen konnten ermittelt werden. Ein Public Motif Typ III konnte für TRAV12-1/TRAJ9 mit der Sequenz CVVN-FGKGNLGGFKT im Kontext mit der für das Melanom-Peptid MelanA/MART1 publizierten Sequenz CVV-KGPGGFKT gefunden werden ¹²⁸. Interessant ist dieser spezielle TCR auch aufgrund der Krankheitsvorgeschichte von Proband 2, da bei diesem bereits ein Melanom mit mehreren Rezidiven diagnostiziert wurde. Für die Sequenz CAM-HNGNQFYFGTGT von TRAV14DV4/TRAJ49 gibt es einen Public TCR mit dieser Segmentkombination und der Sequenz CA-YLNTGNQFYFGTGT bei dem mit Leukämie assoziierten Peptid Tax11-19 ¹²⁹. Somit handelt es sich um ein Public Motif Typ VI. Ein Public Motif Typ III der Sequenzen von TRAV27/TRAJ43 wurde, wie bereits beschrieben, sowohl bei Proband 1 als auch Proband 2 im CD28- CD8+ T-Zellkompartiment gefunden und steht in Zusammenhang mit dem Influenzavirus ¹³¹. Bei Proband 4 gibt es ebenfalls Übereinstimmungen mit den in dieser Publikation beschriebenen Influenzavirus-spezifischen Sequenzen. Allerdings handelt es sich bei TRAV34/TRAJ30 mit der Sequenz CGAD-IRDKIIFGKGT um ein Public Motif Typ II.

Die CD28- CD4+ T-Zellpopulation der Probanden zeigt generell weniger Single Peaks, zudem gelang es nur für zwei TRAV-Segmente eine verwertbare CDR3-Sequenz zu erhalten. Proband 2 hat mit der Sequenz CA-AQGNAGNNRKLWGLGT von TRAV21/TRAJ38 ein Public Motif Typ IV gegenüber der Sequenz CAA-STNAGNNRKLWGLGT, die bei dem EBV-Peptid EBNA4 gefunden wurde ¹³⁰. Die CDR3-Region von zwei weiteren α -Ketten von Proband 2 besaß außerdem keine zusätzlich eingefügten N-Nukleotide. Derartige Keimbahn-codierte Sequenzen findet man z.B. bei iNKT-Zellen ^{112,177}. Bei Proband 4 konnte noch eine weitere CDR3-Sequenz der CD28- CD4+

T-Zellpopulation für TRAV38-2/DV8/TRAJ53 gefunden werden, allerdings gab es keine Übereinstimmung mit bereits publizierten Public TCRs.

Daraus ergibt sich, dass sich vor allem im CD28- CD8+ aber auch im CD28- CD4+ Kompartiment multi-reaktive T-Zellen unterschiedlicher Spezifität befinden. Zudem handelt es sich bei 6 von 15 gefundenen Sequenzen um public TCRs. Vor allem Proband 2 sticht mit einer Vielzahl von Single Peaks und daraus resultierenden CDR3-Sequenzen der CD28- T-Zellen hervor. Das Segment TRAV12-1/TRAJ9 lässt sich wahrscheinlich auf ein früheres Melanom des Probanden zurückführen. Zudem wurde ein public TCR gefunden, der sowohl bei Proband 2 als auch bei Proband 1 vorkommt und im Zusammenhang mit Influenzainfektion/-vakzinierung steht. Die sequenzierten TRAV-Segmente CD28- T-Zellpopulation der drei untersuchten Probanden bestätigen somit die bereits beschriebenen Kenntnisse in Bezug auf Public TCRs und ein breit gefächertes Repertoire von CD28- T-Zellen. Betrachtet man das Verhältnis von exprimierten TRAV- zu TRBV-Segmenten innerhalb des CD28- Kompartiments, erweckt es den Anschein, dass doppelt so viele α -Ketten wie β -Ketten vorhanden sind. Die TRAV-Segmente der CD28- T-Zellen suggerieren aber lediglich eine höhere Diversität gegenüber den TRBV-Segmenten dadurch, dass ein Single Peak per Direktsequenzierung entschlüsselt werden konnte und die Menge an exprimierten Segmenten und auch der Complexity Score doppelt so hoch wie im TRBV-Repertoire waren. Dem gegenüberzustellen ist, dass die CDR3-Region der TRBV-Segmente durch das Auftreten eines Single Peaks ebenfalls klar Längen-restringiert ist, sich darunter aber mehrere diverse Sequenzen, bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher TRBJ-Segmente, befinden. Ein Beispiel dafür ist das Segment TRBV12-3 bei Proband 1 und 4, das sich trotz eines deutlichen Single Peaks nicht sequenzieren ließ. Dies liegt an der Paarung unterschiedlicher J β -Segmente mit TRBV12-3, was durch die Verwendung spezifischer J β -Primer und durch das Auftrennen der J β -PCR-Produkte per Gelelektrophorese belegt werden konnte. Die im Gel als Produkt nachgewiesenen J β -Ketten lieferten durch Direktsequenzierung verwertbare, deutlich unterschiedliche CDR3-Sequenzen. Bei Proband 1 zeigte sich, dass TRBV12-3 mit TRBJ1-5, 1-6 und 2-5 kombiniert war, was in den CDR3-Sequenzen CASR-PNRDH (1-5), CASR-LSS (1-6) und CASS-SHRCYE (2-5) resultierte. Allerdings konnte keine Übereinstimmung zu bereits publizierten Public TCRs nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnte auch die CDR3-Sequenz CASS-LGPI von TRBV12-3/TRBJ1-5 bei Proband 4 bestimmt werden. Zwar waren im Agarosegel auch Banden für TRBJ1-1/2-1/2-5 und 2-7 zu sehen, allerdings ergaben Sequenzierungsversuche kein verwertbares Ergebnis. Neben TRBV12-3 gab es bei beiden Probanden noch weitere Single Peaks unter den TRBV-Segmenten, die sich auch nicht durch diese weiter diskriminierende PCR nicht entschlüsseln ließen.

Diskussion

Die Bedeutung der Tatsache, dass bei den untersuchten CD28- T-Zellpopulationen scheinbar doppelt so viele TRAV- wie TRBV-Segmente vorhanden sind, und die dadurch suggerierte höhere Diversität muss deshalb relativiert werden. Theoretisch könnte dies auch ein Hinweis auf duale TCRs sein, eine Besonderheit, bei der T-Zellen zwei unterschiedliche TCRs simultan exprimieren. Aufgrund des Verhältnisses von TRAV- zu TRBV-Segmenten könnten CD28- T-Zellen in der Lage sein, zwei unterschiedliche TCR-Heterodimere auf der Zelloberfläche zu tragen, bestehend aus derselben β -Kette jedoch zwei verschiedenen α -Ketten. Man geht davon aus, dass ca. 30% der humanen $\alpha\beta$ T-Zellen zwei funktionelle α -Ketten tragen¹²⁰, wohingegen lediglich 1% zwei funktionelle β -Ketten aufweisen^{119,121}. Dabei stellt sich zuerst die Frage ob beide TCRs überhaupt in der Lage sind, Selbst-MHC Moleküle zu erkennen und wenn ja, ob sie restringiert auf Selbst- oder Fremdantigene sind. Ist einer der TCRs der Positiv-Selektion im Thymus entgangen und auf Selbst-Peptide restringiert, besteht die Möglichkeit, dass die T-Zellen autoreaktiv und an autoimmunen Prozessen beteiligt sind. Eine Erkennung von Fremd-Peptiden hingegen erweitert das immunogene Repertoire noch einmal enorm, die T-Zelle ist spezifisch für zwei unterschiedliche Fremd-Peptide.

Um den Ursprung der sequenzierten CDR3-Sequenzen der CD28- T-Zellen genauer zu bestimmen, wurden PCRs mit Sequenz-spezifischen Primern im CD28+ Kompartiment durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass 12 von 14 Sequenzen von TRAV-Segmenten der CD28- Population ebenfalls innerhalb der CD28+ T-Zellen zu finden sind. Ein Indiz dafür, dass diese CD28- T-Zellen sehr wahrscheinlich ursprünglich CD28+ T-Zellen waren. Bekannt war dies bisher nur für TRBV-Segmente bei HIV-Infektion¹³⁸ oder allogener Stammzelltransplantation¹³⁹, nicht bei TRAV-Segmenten. Übereinstimmungen bzw. Public Motifs mit CDR3-Sequenzen von $\alpha\beta$ T-Zellen, die im Zuge der Transdifferenzierungsexperimente mit $V\delta 1$ T-Zellpools oder $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellklonen ermittelt wurden, ergaben sich nicht.

In dieser Arbeit konnte mit den gewählten Ansätzen kein eindeutiger Beweis für den Trigger der Transdifferenzierung von Bulk $V\delta 1+$ T-Zellen oder $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellklonen zu $\alpha\beta$ T-Zellen gefunden werden. Unterschiedliche Ansätze bei mehreren Probanden zeigen jedoch, dass Transdifferenzierung stattfindet und dies nicht durch ein bestimmtes Zytokinmilieu allein oder ein spezifisches Molekül ausgelöst wird. Der Prozess ist weitaus komplexer und es bedarf noch einiger Forschungsarbeit, bevor eine endgültige Lösung präsentiert werden kann. Ein Protokoll zur Isolation und Expansion von $V\delta 1+$ CD4+ T-Zellklonen wurde mittlerweile von der AG Schilbach publiziert¹⁷⁸.

Literaturverzeichnis

1. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88–100 (2013).
2. Caccamo, N., Battistini, L., Bonneville, M. & Poccia, F. CXCR5 identifies a subset of V γ maoVdeka T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J Immunol* **15**, 5290–5 (2006).
3. Brandes, M., Willmann, K. & Moser, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* **309**, 264–8 (2005).
4. Bodmer, W. F. & Bodmer, J. G. Evolution and function of the HLA system. *Br. Med. Bull.* **34**, 309–16 (1978).
5. Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* **353**, 321–5 (1991).
6. Brown, J. H. *et al.* Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**, 33–9 (1993).
7. Rajnavölgyi, E. *et al.* Characterizing immunodominant and protective influenza hemagglutinin epitopes by functional activity and relative binding to major histocompatibility complex class II sites. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3105–14 (1997).
8. Rammensee, H. G. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 85–96 (1995).
9. Rammensee, H. G., Friede, T. & Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41**, 178–228 (1995).
10. Spits, H., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. Development of Human T and Natural Killer Cells.
11. Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K. & Messaoudi, I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 123–132 (2004).
12. Miles, J. J., Douek, D. C. & Price, D. A. Bias in the $\alpha\beta$ T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 375–87 (2011).
13. Wagner, D. H. Re-shaping the T cell repertoire: TCR editing and TCR revision for good and for bad. *Clin. Immunol.* **123**, 1–6 (2007).
14. Hale, J. S. & Fink, P. J. T-cell receptor revision: friend or foe? *Immunology* **129**, 467–73 (2010).
15. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 55–77 (2003).
16. Lefranc, M.-P. IMGT Unique Numbering for the Variable (V), Constant (C), and Groove (G) Domains of IG, TR, MH, IgSF, and MhSF. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, pdb.ip85-ip85 (2011).
17. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 55–77 (2003).
18. Kaas, Q., Ehrenmann, F. & Lefranc, M.-P. IG, TR and IgSF, MHC and MhcSF: what do we learn from the IMGT Colliers de Perles? *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **6**, 253–64 (2007).
19. Rock, E. P., Sibbald, P. R., Davis, M. M. & Chien, Y. H. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* **179**, 323–8 (1994).
20. Davis, M. M. & Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.

- Nature* **334**, 395–402 (1988).
21. Chothia, C., Boswell, D. R. & Lesk, A. M. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J.* **7**, 3745–55 (1988).
 22. Bonnefoy-Berard, N. *et al.* Second signal for T lymphocyte activation: multiple targets for pharmacological modulation. *Dev. Biol. Stand.* **77**, 41–8 (1992).
 23. Sharpe, A. H. & Abbas, A. K. T-Cell Costimulation — Biology, Therapeutic Potential, and Challenges. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp068087> (2009).
 24. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–12 (1999).
 25. Campbell, J. J. *et al.* CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J. Immunol.* **166**, 877–84 (2001).
 26. Romero, P. *et al.* Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8+ T Lymphocytes. *J. Immunol.* **178**, 4112–4119 (2007).
 27. Vinuesa, C. G. *et al.* A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* **435**, 452–458 (2005).
 28. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–63 (2011).
 29. King, C., Tangye, S. G. & Mackay, C. R. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 741–66 (2008).
 30. Oldenhove, G. *et al.* CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**, 259–66 (2003).
 31. Cohn, M. What roles do regulatory T cells play in the control of the adaptive immune response? *Int. Immunol.* **20**, 1107–18 (2008).
 32. Crispin, J. C. *et al.* Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *J. Immunol.* **181**, 8761–8766 (2008).
 33. Crispin, J. C. & Tsokos, G. C. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J. Immunol.* **183**, 4675–81 (2009).
 34. Voelkl, S., Gary, R. & Mackensen, A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- double-negative T cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 739–48 (2011).
 35. Hillhouse, E. E., Delisle, J.-S. & Lesage, S. Immunoregulatory CD4(-)CD8(-) T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity, and cancer. *Front. Immunol.* **4**, 6 (2013).
 36. Shivakumar, S., Tsokos, G. C. & Datta, S. K. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.* **143**, 103–12 (1989).
 37. Wirt, D. P. *et al.* Novel T-lymphocyte population in combined immunodeficiency with features of graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine* **321**, 370–374 (1989).
 38. Overgaard, N. H., Jung, J.-W., Steptoe, R. J. & Wells, J. W. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.* **97**, 31–38 (2015).
 39. Weiss, L. *et al.* Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected

- person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.* **178**, 1158–62 (1998).
40. Frahm, M. A. *et al.* CD4+CD8+ T Cells Represent a Significant Portion of the Anti-HIV T Cell Response to Acute HIV Infection. *J. Immunol.* **188**, 4289–4296 (2012).
 41. Suni, M. *et al.* CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur J Immunol* **31**, 2512–20 (2001).
 42. Rentenaar, R. *et al.* CD4dullCD8bright double-positive T-lymphocytes have a phenotype of granzyme Bpos CD8pos memory T-lymphocytes. *Nephro Dial Transpl.* **14**, 1430–4 (1999).
 43. Quandt, D. *et al.* Peripheral CD4CD8 Double Positive T Cells with a Distinct Helper Cytokine Profile Are Increased in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* **9**, e93293 (2014).
 44. Eljaafari, A. *et al.* Isolation of Human CD4/CD8 Double-Positive, Graft-Versus-Host Disease-Protective, Minor Histocompatibility Antigen-Specific Regulatory T Cells and of a Novel HLA-DR7-Restricted HY-Specific CD4 Clone. *J. Immunol.* **190**, 184–194 (2013).
 45. Scott G. Kitchen, N. R. J. S. L. J. K. W. B.-A. V. Z. G. D. G. B. S. J. B. C. M. R. K. J. A. Z. CD4 on CD8+ T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8727 (2004).
 46. Ziegler, H. *et al.* Human Peripheral CD4(+) V δ 1(+) $\gamma\delta$ T Cells Can Develop into $\alpha\beta$ T Cells. *Front. Immunol.* **5**, 645 (2014).
 47. Moss, P. A. *et al.* Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8987–90 (1991).
 48. Argaet, V. P. *et al.* Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* **180**, 2335–40 (1994).
 49. Cibotti, R. *et al.* Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice. *J. Exp. Med.* **180**, 861–72 (1994).
 50. Price, D. A. *et al.* Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J. Exp. Med.* **202**, 1349–61 (2005).
 51. Venturi, V. *et al.* TCR beta-chain sharing in human CD8+ T cell responses to cytomegalovirus and EBV. *J. Immunol.* **181**, 7853–62 (2008).
 52. Khan, N., Cobbold, M., Keenan, R. & Moss, P. A. H. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J. Infect. Dis.* **185**, 1025–34 (2002).
 53. Khan, N. *et al.* Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J. Immunol.* **169**, 1984–92 (2002).
 54. Weekes, M. P., Wills, M. R., Mynard, K., Carmichael, A. J. & Sissons, J. G. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J. Virol.* **73**, 2099–108 (1999).
 55. Day, E. K. *et al.* Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J. Immunol.* **179**, 3203–13 (2007).
 56. Gillespie, G. M. A. *et al.* Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity

- characterize a B*57-restricted immune response in HIV-1 infection. *J. Immunol.* **177**, 3893–902 (2006).
57. Yu, X. G. *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. *J. Virol.* **81**, 1619–31 (2007).
 58. Simons, B. C. *et al.* Despite biased TRBV gene usage against a dominant HLA B57-restricted epitope, TCR diversity can provide recognition of circulating epitope variants. *J. Immunol.* **181**, 5137–46 (2008).
 59. Sing, G. K. *et al.* A molecular comparison of T lymphocyte populations infiltrating the liver and circulating in the blood of patients with chronic hepatitis B: evidence for antigen-driven selection of a public complementarity-determining region 3 (CDR3) motif. *Hepatology* **33**, 1288–98 (2001).
 60. Umemura, T. *et al.* Analysis of T cell repertoire in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Clin. Exp. Immunol.* **121**, 120–6 (2000).
 61. Dietrich, P.-Y. *et al.* Prevalent Role of TCR α -Chain in the Selection of the Preimmune Repertoire Specific for a Human Tumor-Associated Self-Antigen. *J. Immunol.* **170**, 5103–5109 (2003).
 62. Wieckowski, S. *et al.* Fine structural variations of alphabetaTCRs selected by vaccination with natural versus altered self-antigen in melanoma patients. *J. Immunol.* **183**, 5397–406 (2009).
 63. Vignard, V. *et al.* Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J. Immunol.* **175**, 4797–805 (2005).
 64. Serana, F. *et al.* Identification of a public CDR3 motif and a biased utilization of T-cell receptor V beta and J beta chains in HLA-A2/Melan-A-specific T-cell clonotypes of melanoma patients. *J. Transl. Med.* **7**, 21 (2009).
 65. Cole, D. K. *et al.* Modification of MHC anchor residues generates heteroclitic peptides that alter TCR binding and T cell recognition. *J. Immunol.* **185**, 2600–10 (2010).
 66. Le Gal, F.-A. *et al.* Distinct structural TCR repertoires in naturally occurring versus vaccine-induced CD8⁺ T-cell responses to the tumor-specific antigen NY-ESO-1. *J. Immunother.* **28**, 252–7
 67. Wucherpfennig, K. W. *et al.* Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* **248**, 1016–9 (1990).
 68. Oksenberg, J. R. *et al.* Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* **362**, 68–70 (1993).
 69. Hong, J. *et al.* A common TCR V-D-J sequence in V beta 13.1 T cells recognizing an immunodominant peptide of myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **163**, 3530–8 (1999).
 70. May, E. *et al.* Conserved TCR beta chain usage in reactive arthritis; evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens* **60**, 299–308 (2002).
 71. Sun, W. *et al.* Skewed T-cell receptor BV14 and BV16 expression and shared CDR3 sequence and common sequence motifs in synovial T cells of rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* **6**, 248–61 (2005).
 72. Sasaki, M. *et al.* Accumulation of common T cell clonotypes in the salivary glands of patients with human T lymphotropic virus type I-associated and idiopathic Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* **164**, 2823–31 (2000).

73. Grunewald, J., Hultman, T., Bucht, A., Eklund, A. & Wigzell, H. Restricted usage of T cell receptor V alpha/J alpha gene segments with different nucleotide but identical amino acid sequences in HLA-DR3+ sarcoidosis patients. *Mol. Med.* **1**, 287–96 (1995).
74. O'keefe, C. L. *et al.* Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* **32**, 1010–22 (2004).
75. Hirokawa, M. *et al.* Distinct TCRAV and TCRBV repertoire and CDR3 sequence of T lymphocytes clonally expanded in blood and GVHD lesions after human allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **30**, 915–23 (2002).
76. Miles, J. J., Douek, D. C. & Price, D. A. Bias in the $\alpha\beta$ T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 375–387 (2011).
77. Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J. & Rossjohn, J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 883–94 (2006).
78. Maraninchi, D. *et al.* Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet (London, England)* **2**, 175–8 (1987).
79. Horowitz, M. M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–62 (1990).
80. Goulmy, E. Human minor histocompatibility antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 75–81 (1996).
81. Goulmy, E. *et al.* Mismatches of Minor Histocompatibility Antigens between HLA-Identical Donors and Recipients and the Development of Graft-Versus-Host Disease after Bone Marrow Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **334**, 281–285 (1996).
82. Mathé, G., Pritchard, L. L. & Halle-Pannenko, O. Mismatching for minor histocompatibility antigens in bone marrow transplantation: consequences for the development and control of severe graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* **11**, 235–9 (1979).
83. Glucksberg, H. *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18**, 295–304 (1974).
84. Sondel, P. M., Hank, J. A., Wendel, T., Flynn, B. & Bozdech, M. J. HLA identical leukemia cells and T cell growth factor activate cytotoxic T cell recognition of minor locus histocompatibility antigens in vitro. *J. Clin. Invest.* **71**, 1779–86 (1983).
85. Tekolf, W. A. & Shaw, S. Primary in vitro generation of cytotoxic cells specific for human minor histocompatibility antigens between HLA-identical siblings. *J. Immunol.* **132**, 1756–60 (1984).
86. Han, M. *et al.* Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3+CD4-CD8-) and CD8+ T cells. *J. Immunol.* **163**, 301–11 (1999).
87. Olive, C., Gatenby, P. A. & Serjeantson, S. W. Variable gene usage of T cell receptor gamma- and delta-chain transcripts expressed in synovia and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **87**, 172–7 (1992).
88. Wolf, M. *et al.* Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* **110**, 201–10 (2007).
89. Wehler, T. C. *et al.* Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4(+) and CD8(+) T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *J. Immunol. Methods* **339**, 23–37 (2008).
90. Moisan, J. P. *et al.* Characterization of T-cell-receptor gamma (TRG) gene rearrangements in alloreactive T-cell clones. *Hum. Immunol.* **24**, 95–110 (1989).

91. Flament, C., Benmerah, A., Bonneville, M., Triebel, F. & Mami-Chouaib, F. Human TCR-gamma/delta alloreactive response to HLA-DR molecules. Comparison with response of TCR-alpha/beta. *J. Immunol.* **153**, 2890–904 (1994).
92. Colonna, M. NK cells: New issues and challenges. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2927–2929 (2008).
93. Burgess, S. J. *et al.* The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol. Res.* **40**, 18–34 (2008).
94. Wrobel, P. *et al.* Lysis of a Broad Range of Epithelial Tumour Cells by Human $\gamma\delta$ T Cells: Involvement of NKG2D ligands and T-cell Receptor- versus NKG2D-dependent Recognition. *Scand. J. Immunol.* **66**, 320–328 (2007).
95. Sáez-Borderías, A. *et al.* Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. *Eur. J. Immunol.* **36**, 3198–3206 (2006).
96. Jamieson, A. M. *et al.* The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* **17**, 19–29 (2002).
97. Rincon-Orozco, B. *et al.* Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J. Immunol.* **175**, 2144–51 (2005).
98. 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. *J. Immunol.* **169**, 1236–40 (2002).
99. Qi, J. *et al.* [Cytotoxicity of MICA-reactive V delta 1 gamma delta T cells towards epithelial tumor cells]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* **26**, 1–7 (2004).
100. Groh, V. *et al.* Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6879–84 (1999).
101. Van de Walle, I. *et al.* Specific Notch receptor–ligand interactions control human TCR- $\alpha\beta/\gamma\delta$ development by inducing differential Notch signal strength. *J. Exp. Med.* **210**, 683–697 (2013).
102. Wölfl, M. & Greenberg, P. D. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nat. Protoc.* **9**, 950–66 (2014).
103. Altwater, B. *et al.* Activated human gd T cells induce peptide-specific CD8+ T-cell responses to tumor-associated self-antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 385–396 (2012).
104. Khanna, R. *et al.* Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4+ EBV-specific CTLs. *J. Immunol.* **158**, 3619–25 (1997).
105. Brennan, R. M. *et al.* Predictable alphabeta T-cell receptor selection toward an HLA-B*3501-restricted human cytomegalovirus epitope. *J. Virol.* **81**, 7269–73 (2007).
106. Miles, J. J. *et al.* CTL recognition of a bulged viral peptide involves biased TCR selection. *J. Immunol.* **175**, 3826–34 (2005).
107. Silins, S. L. *et al.* A functional link for major TCR expansions in healthy adults caused by persistent Epstein-Barr virus infection. *J. Clin. Invest.* **102**, 1551–8 (1998).
108. Miles, J. J. *et al.* Antigen-driven patterns of TCR bias are shared across diverse outcomes of human hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* **186**, 901–12 (2011).
109. Wynn, K. K. *et al.* Impact of clonal competition for peptide-MHC complexes on the CD8+ T-cell repertoire selection in a persistent viral infection. *Blood* **111**, 4283–4292 (2008).
110. Xiao, Y.-S. *et al.* Combination of intratumoral invariant natural killer T cells and interferon-gamma is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PLoS One* **8**, e70345 (2013).

111. Karadimitris, a *et al.* Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3294–8 (2001).
112. Montoya, C. J. *et al.* Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* **122**, 1–14 (2007).
113. Porcelli, S., Yockey, C. E., Brenner, M. B. & Balk, S. P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* **178**, 1–16 (1993).
114. Qiao, S.-W., Christophersen, A., Lundin, K. E. a & Sollid, L. M. Biased usage and preferred pairing of α - and β -chains of TCRs specific for an immunodominant gluten epitope in coeliac disease. *Int. Immunol.* **26**, 13–9 (2014).
115. Petersen, J. *et al.* T-cell receptor recognition of HLA-DQ2-gliadin complexes associated with celiac disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 480–8 (2014).
116. Hata, S. *et al.* Extensive junctional diversity of rearranged human T cell receptor delta genes. *Science* **240**, 1541–4 (1988).
117. Krangel, M. S., Band, H., Hata, S., McLean, J. & Brenner, M. B. Structurally divergent human T cell receptor gamma proteins encoded by distinct C gamma genes. *Science* **237**, 64–7 (1987).
118. Davodeau, F. *et al.* Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 1391–8 (1995).
119. Davodeau, F. *et al.* Dual T Cell Receptor B Chain Expression on Human T Lymphocytes.
120. Padovan, E. *et al.* Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* **262**, 422–4 (1993).
121. Padovan, E. *et al.* Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J. Exp. Med.* **181**, 1587–91 (1995).
122. June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. & Thompson, C. B. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* **15**, 321–31 (1994).
123. Gammopathy, M., Posnett, B. D. N., Sinha, R., Kabak, S. & Russo, C. Clonal Populations of T Cells in Normal Elderly Humans: The T Cell Equivalent to 'Benign Monoclonal Gammopathy'. **57**, (1994).
124. Vallejo, a. N. Aging-related Deficiency of CD28 Expression in CD4+ T Cells Is Associated with the Loss of Gene-specific Nuclear Factor Binding Activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 8119–8129 (1998).
125. Azuma, M., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J. Immunol.* **150**, 1147–59 (1993).
126. Effros, R. B. *et al.* Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp. Gerontol.* **29**, 601–9
127. Goronzy, R. G. J. *et al.* Value of Immunological Markers in Predicting Responsiveness to Influenza Vaccination in Elderly Individuals. **153**, 12182–12187
128. Trautmann, L. *et al.* Dominant TCR V alpha usage by virus and tumor-reactive T cells with wide affinity ranges for their specific antigens. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3181–90 (2002).
129. Bourcier, K. D. *et al.* Conserved CDR3 regions in T-cell receptor (TCR) CD8(+) T cells that recognize the Tax11-19/HLA-A*0201 complex in a subject infected with human T-

- cell leukemia virus type 1: relationship of T-cell fine specificity and major histocompatibility complex/pepti. *J. Virol.* **75**, 9836–43 (2001).
130. Campos-Lima, P. O., Levitsky, V., Imreh, M. P., Gavioli, R. & Masucci, M. G. Epitope-dependent selection of highly restricted or diverse T cell receptor repertoires in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* **186**, 83–9 (1997).
 131. Naumov, Y. N. *et al.* Multiple glycines in TCR alpha-chains determine clonally diverse nature of human T cell memory to influenza A virus. *J. Immunol.* **181**, 7407–19 (2008).
 132. Tynan, F. E. *et al.* A T cell receptor flattens a bulged antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule. *Nat. Immunol.* **8**, 268–76 (2007).
 133. Tynan, F. E. *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. *J. Biol. Chem.* **280**, 23900–9 (2005).
 134. Kjer-Nielsen, L. *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. *J. Immunol.* **169**, 5153–5160 (2002).
 135. Stewart-Jones, G. B. E., McMichael, A. J., Bell, J. I., Stuart, D. I. & Jones, E. Y. A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nat. Immunol.* **4**, 657–63 (2003).
 136. Turner, S. J. *et al.* Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8+ T cell populations. *Nat. Immunol.* **6**, 382–9 (2005).
 137. Davis, M. M. The problem of plain vanilla peptides. *Nat. Immunol.* **4**, 649–50 (2003).
 138. Hirokawa, M. *et al.* Oligoclonal expansion of CD4(+)CD28(-) T lymphocytes in recipients of allogeneic hematopoietic cell grafts and identification of the same T cell clones within both CD4(+)CD28(+) and CD4(+)CD28(-) T cell subsets. *Bone Marrow Transplant.* **27**, 1095–100 (2001).
 139. Horiuchi, T. *et al.* Identification of the T cell clones expanding within both CD8(+)CD28(+) and CD8(+)CD28(-) T cell subsets in recipients of allogeneic hematopoietic cell grafts and its implication in post-transplant skewing of T cell receptor repertoire. *Bone Marrow Transplant.* **27**, 731–9 (2001).
 140. Hudecek, M., Bartsch, K., Tschiedel, S. & Niederwieser, D. [Minor antigens - major impact. The role of minor histocompatibility antigens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **133**, 1511–6 (2008).
 141. Mutis, T. *et al.* Generation of minor histocompatibility antigen HA-1-specific cytotoxic T cells restricted by nonself HLA molecules: a potential strategy to treat relapsed leukemia after HLA-mismatched stem cell transplantation. *Blood* **100**, 547–52 (2002).
 142. Weber, G. *et al.* Generation of tumor antigen-specific T cell lines from pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia--implications for immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5079–91 (2013).
 143. Weber, G. *et al.* Generation of multi-leukemia antigen-specific T cells to enhance the graft-versus-leukemia effect after allogeneic stem cell transplant. *Leukemia* **27**, 1538–47 (2013).
 144. Mutis, T. *et al.* Feasibility of Immunotherapy of Relapsed Leukemia With Ex Vivo-Generated Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Hematopoietic System-Restricted Minor Histocompatibility Antigens.
 145. Hjalgrim, H., Friborg, J. & Melbye, M. *The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (Cambridge University Press, 2007).
 146. Elgui de Oliveira, D. DNA viruses in human cancer: an integrated overview on

- fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett.* **247**, 182–96 (2007).
147. Delecluse, H.-J., Feederle, R., O'Sullivan, B. & Taniere, P. Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J. Clin. Pathol.* **60**, 1358–64 (2007).
 148. Du, M.-Q., Bacon, C. M. & Isaacson, P. G. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Pathol.* **60**, 1350–7 (2007).
 149. Chen, Y.-B., Rahemtullah, A. & Hochberg, E. Primary effusion lymphoma. *Oncologist* **12**, 569–76 (2007).
 150. Hui-Yuen, J., McAllister, S., Koganti, S., Hill, E. & Bhaduri-McIntosh, S. Establishment of Epstein-Barr virus growth-transformed lymphoblastoid cell lines. *J. Vis. Exp.* (2011). doi:10.3791/3321
 151. Ning, R. J., Xu, X. Q., Chan, K. H. & Chiang, A. K. S. Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins. *Immunology* **134**, 161–71 (2011).
 152. Redchenko, I. V & Rickinson, A. B. Accessing Epstein-Barr virus-specific T-cell memory with peptide-loaded dendritic cells. *J. Virol.* **73**, 334–42 (1999).
 153. Chevallier-Greco, A. *et al.* Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J.* **5**, 3243–9 (1986).
 154. Countryman, J. & Miller, G. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4085–9 (1985).
 155. Ziegler, H. *et al.* Human Peripheral CD4(+) V δ 1(+) $\gamma\delta$ T Cells Can Develop into $\alpha\beta$ T Cells. *Front. Immunol.* **5**, 645 (2014).
 156. Miles, J. J. *et al.* Genetic and structural basis for selection of a ubiquitous T cell receptor deployed in Epstein-Barr virus infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1001198 (2010).
 157. Gras, S. *et al.* Structural Bases for the Affinity-Driven Selection of a Public TCR against a Dominant Human Cytomegalovirus Epitope. *J. Immunol.* **183**, 430–437 (2009).
 158. Eck, S. C., Chang, D., Wells, A. D. & Turka, L. A. Differential down-regulation of CD28 by B7-1 and B7-2 engagement. *Transplantation* **64**, 1497–9 (1997).
 159. Vallejo, A. N., Brandes, J. C., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J. Immunol.* **162**, 6572–9 (1999).
 160. Effros, R. B. Loss of CD28 expression on T lymphocytes: a marker of replicative senescence. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 471–8
 161. Valenzuela, H. F. & Effros, R. B. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin. Immunol.* **105**, 117–25 (2002).
 162. Wedderburn, L. R., Patel, A., Varsani, H. & Woo, P. The developing human immune system: T-cell receptor repertoire of children and young adults shows a wide discrepancy in the frequency of persistent oligoclonal T-cell expansions. *Immunology* **102**, 301–9 (2001).
 163. Vallejo, A. N., Schirmer, M., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J. Immunol.* **165**, 6301–7 (2000).
 164. Spaulding, C., Guo, W. & Effros, R. B. Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells

- that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp. Gerontol.* **34**, 633–44 (1999).
165. Appay, V. *et al.* HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* **192**, 63–75 (2000).
166. Snyder, M. R. *et al.* Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells. *J. Immunol.* **168**, 3839–46 (2002).
167. Tarazona, R. *et al.* Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech. Ageing Dev.* **121**, 77–88 (2000).
168. SCARSI, M., ZIGLIOLI, T. & AIRO, P. Decreased Circulating CD28-negative T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Abatacept Are Correlated with Clinical Response. *J. Rheumatol.* **37**, 911–916 (2010).
169. Schmidt, D., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J. Clin. Invest.* **97**, 2027–37 (1996).
170. Dumitriu, I. E., Araguas, E. T., Baboonian, C. & Kaski, J. C. CD4+CD28null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. *Cardiovasc. Res.* **81**, 11–19 (2009).
171. Wagner, U. *et al.* Clonally expanded CD4+CD28null T cells in rheumatoid arthritis use distinct combinations of T cell receptor BV and BJ elements. *Eur. J. Immunol.* **33**, 79–84 (2003).
172. Schmidt, D., Martens, P. B., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. The repertoire of CD4+ CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *Mol. Med.* **2**, 608–18 (1996).
173. Khan, N. *et al.* Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J. Immunol.* **169**, 1984–92 (2002).
174. Scognamiglio, P. *et al.* Presence of effector CD8+ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors. *J. Immunol.* **162**, 6681–9 (1999).
175. Weekes, M. P., Carmichael, A. J., Wills, M. R., Mynard, K. & Sissons, J. G. Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J. Immunol.* **162**, 7569–77 (1999).
176. Lewis, D. E., Yang, L., Luo, W., Wang, X. & Rodgers, J. R. HIV-specific cytotoxic T lymphocyte precursors exist in a CD28-CD8+ T cell subset and increase with loss of CD4 T cells. *AIDS* **13**, 1029–1033 (1999).
177. Cameron, G. *et al.* Antigen Specificity of Type I NKT Cells Is Governed by TCR β -Chain Diversity. *J. Immunol.* **195**, (2015).
178. Welker, C., Handgretinger, R. & Schilbach, K. Isolation and Ex Vivo Culture of V δ 1+CD4+ $\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ T-cell Progenitor. *J. Vis. Exp.* (2015). doi:10.3791/53482