

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

Analyse der Entwicklung adaptiver Immunantworten
ausgehend von einzelnen naiven CD8⁺ T-Zellen

Veit Richard Wolfgang Buchholz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dirk H. Busch
2. Univ.-Prof. Dr. Jürgen Ruland
3. Univ.-Prof. Dr. Percy Knolle

Die Dissertation wurde am 02.06.2014 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2015 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert in:

Buchholz, V.R., Flossdorf, M., Hensel, I., Kretschmer, L., Weissbrich, B., Gräf, P., Verschoor, A., Schiemann, M., Höfer, T., and Busch, D.H. (2013). Disparate individual fates compose robust CD8+ T cell immunity. *Science* *340*, 630–635.

Buchholz, V.R., Gräf, P., and Busch, D.H. (2013). The smallest unit: effector and memory CD8(+) T cell differentiation on the single cell level. *Front Immunol* *4*, 31.

Buchholz, V.R., Gräf, P., and Busch, D.H. (2012). The origin of diversity: studying the evolution of multi-faceted CD8+ T cell responses. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1585–1595.

Buchholz, V.R., Neuenhahn, M., and Busch, D.H. (2011). CD8+ T cell differentiation in the aging immune system: until the last clone standing. *Curr Opin Immunol* *23*, 549–554.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Immunologisches Gedächtnis	1
1.2. T-Zell-Rezeptorrepertoire und klonale Selektion	1
1.3. Diversifikation der T-Zell-Immunantwort	2
1.4. Einzelzellschicksale	5
1.5. Redundanz und Robustheit	7
2. Problemstellung	9
3. Material und Methodik	10
3.1. Material	10
3.1.1. Geräte	10
3.1.2. Chemikalien und Reagenzien	10
3.1.3. Puffer und Kulturmedien	12
3.1.4. Antikörper	12
3.1.5. Mäuse	14
3.1.6. Software	14
3.2. Methoden	14
3.2.1. Zucht der kongenen OTI-Matrix-Donoren	14
3.2.2. Kultivierung von <i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.2.3. Tätigkeiten am Versuchstier	16
3.2.4. Leukozyten-Präparation aus Blut	17
3.2.5. Leukozyten-Präparation aus Milz und Lymphknoten	17
3.2.6. Leukozyten-Präparation aus der Lunge	18
3.2.7. Peptid-Restimulation	18
3.2.8. Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen	19
3.2.9. Multimerfärbung spezifischer T-Zell-Rezeptoren	19
3.2.10. Antikörperfärbung intrazellulärer Antigene	20
3.2.11. Durchflusszytometrische Analyse	20
3.2.12. Durchflusszytometrische Sortierung von T-Zellen	20
3.2.13. Fluoreszenzmikroskopie	21

3.2.14. Mathematische Populationssimulation	21
3.2.15. Allgemeine statistische Auswertung	22
4. Ergebnisse	24
4.1. Kongene OTI-Matrix und repetitive Sortierung	24
4.2. Variable Expansion von CD8 ⁺ T-Zell-Familien <i>in vivo</i>	25
4.3. Variable Expansion unter verschiedensten Experimentalbedingungen	28
4.4. Inverse Korrelation von Gedächtnisphänotyp und Expansion	29
4.5. Fehlende Korrelation von Primär- und Sekundärexpansion	31
5. Diskussion	61
5.1. Protektion und Gedächtnis: eine doppelte Herausforderung	61
5.2. Klassischer Einzelzelltransfer und kongene Matrix	62
5.3. Robustheit wird auf Populationsebene realisiert	63
5.4. Einzelzelldaten unterstützen progressives Differenzierungsmodell	64
5.5. Ursprung variabler Einzelzellschicksale	66
5.6. Klinische Implikationen	69
6. Zusammenfassung	71
7. Literaturverzeichnis	72
Danksagung	83

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Oberflächenphänotyps sowie der Zytokin- und Transkriptionsfaktorexpression von T_N , T_M und T_{EF}	33
Abbildung 2: Schematische Darstellung von einzelzell- und populationsbasierter Robustheit	34
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Genotyps von OTI-Matrix-Donoren und C57BL/6 Rezipienten	35
Abbildung 4: Darstellung des kongenen Phänotyps der acht OTI-Matrix-Donorlinien A-H und des C57BL/6 Rezipienten	36
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sortierungsstrategie für den achtfachen adoptiven Einzelzelltransfer	37
Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie bestätigt die erfolgreiche Zusammenstellung von acht Zellen der kongenen Phänotypen A-H mittels repetitiver Einzelzellsortierung.	38
Abbildung 7: $CD8^+ CD44^{low}$ Zellen aus OTI-Matrix-Donoren zeigen eine homogene TCR-Expression und einen naiven Oberflächenphänotypen.	39
Abbildung 8: Kleine Zahlen adoptiv transferierter OTI-Zellen interferieren nicht mit der Expansion der endogenen SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Population und zeigen ein mit diesen vergleichbares Differenzierungsmuster.	40
Abbildung 9: Populationen von je 100 OTI-Matrix-Zellen, gewonnen aus den acht verschiedenen Donorlinien, zeigen vergleichbare Expansion und Diversifikation in Effektor- und Gedächtnissubgruppen.	41
Abbildung 10: Nachkommen die von einer oder 100 OTI-Matrix-Zellen abstammen können an Tag zwölf nach Infektion durchflusszytometrisch detektiert werden.	43
Abbildung 11: T-Zell-Familien der verschiedenen kongenen Phänotypen werden an Tag zwölf nach Infektion mit vergleichbarer Wahrscheinlichkeit detektiert.	44
Abbildung 12: T-Zell-Familien der verschiedenen kongenen Phänotypen werden an Tag acht nach Infektion mit vergleichbarer Wahrscheinlichkeit	45

detektiert.

- Abbildung 13:** Die antigenabhängige Expansion von CD8⁺ T-Zell-Familien *in vivo* zeigt hohe Variabilität. 46
- Abbildung 14:** Die in der Milz detektierte Größe einer T-Zell-Familie korreliert eng mit ihrer aus Milz, Lymphknoten und Lunge bestimmten Gesamtgröße. 47
- Abbildung 15:** Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien ist bereits an Tag acht nach Infektion nachweisbar. 48
- Abbildung 16:** Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien bleibt auch in Abwesenheit der sonst mitgeführten 100er-Population erhalten. 49
- Abbildung 17:** Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien tritt auch nach systemischer viraler Infektion auf. 50
- Abbildung 18:** Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien ist nicht durch die Expression zusätzlicher TCRs bedingt. 51
- Abbildung 19:** In T-Zellfamilien ist der relative Anteil von Nachkommen mit gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp an Tag zwölf nach Infektion im Mittel höher als in 100er-Populationen. 52
- Abbildung 20:** In T-Zellfamilien ist der relative Anteil von Nachkommen mit gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp an Tag acht nach Infektion im Mittel höher als in 100er-Populationen. 53
- Abbildung 21:** Der relative Anteil an T-Zellen mit gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp nimmt in expandierenden T-Zell-Familien ab. 54
- Abbildung 22:** Die inverse Korrelation von Größe und gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp einer T-Zell-Familie ist bereits an Tag acht nach Infektion nachweisbar. 55
- Abbildung 23:** In T-Zellfamilien ist der relative Anteil von Nachkommen mit gedächtnistypischer Zytokinexpression im Mittel höher als in 100er-Populationen. 56
- Abbildung 24:** Der relative Anteil an T-Zellen mit gedächtnistypischer Zytokinexpression nimmt in expandierenden T-Zell-Familien ab. 57
- Abbildung 25:** Der relative Anteil an T-Zellen mit gedächtnistypischer Transkriptionsfaktorexpression nimmt in expandierenden T-Zell-Familien ab. 58
- Abbildung 26:** Während der Primär- und Sekundärexpansion korreliert die im 59

peripheren Blut detektierte Größe einer T-Zell-Familie eng mit ihrer aus Milz, Lymphknoten und Lunge bestimmten Gesamtgröße.

Abbildung 27: Die Primärexpansion einer T-Zell-Familie ist ein schlechter Prädiktor für ihre Fähigkeit zur Sekundärexpansion.

60

Verzeichnis der Abkürzungen

ACT	Ammoniumchlorid-Tris-Puffer
APC	Allophycocyanin
APC	antigenpräsentierende Zelle
APCeF780	Allophycocyanin-eFluor780
BHI	Brain-heart-infusion
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eF450	eFluor450
EMA	Ethidium-monoazid-bromid
Eomes	Eomesodermin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
F _c	Fragment crystallizable
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN- γ	Interferon- γ
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
kbE	koloniebildende Einheit
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1
L.m.	Listeria monocytogenes
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHCI	Haupthistokompatibilitätskomplex I
MVA	Modifiziertes Vaccinia-Virus-Ankara

OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PECy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCPCy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cy5.5 ()
PFA	Paraformaldehyd
pfE	plaqueformende Einheit
PI	Propidiumiodid
R	Rezeptor
RAG1	Recombinase activating gene 1
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	RPMI-1640-Zellkulturmedium
SC ⁺	SC ⁺ -Medienzusatz
SEM	Standardfehler
SPF	spezifisch-pathogen-frei
T-bet	T-box transcription factor expressed in T cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{CM}	zentrale T-Gedächtniszelle
T _{CMp}	T _{CM} -Vorläuferzelle
T _{EM}	Effektor-T-Gedächtniszelle
T _{EMp}	T _{EM} -Vorläuferzelle
T _{EF}	T-Effektorzelle
Tg	Transgen
T _M	T-Gedächtniszelle
T _N	naive T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vbeta-5	Variable Region-5 der TCR-beta-Kette
VACV	Vaccinia-Virus

1. Einleitung

1.1. Immunologisches Gedächtnis

Das Immunsystem des Menschen dient unter anderem der Abwehr von Infektionen. Ausgelöst werden diese durch in den Körper eindringende Mikroorganismen. Deren Vervielfältigung sowie die von ihnen produzierten Substanzen, aber auch die gegen sie gerichteten Reaktionen des Immunsystems führen zu den charakteristischen Symptomen einer Infektionskrankheit. Während bei der ersten Konfrontation des Wirtsorganismus mit einem Pathogen, d. h. einem bestimmten potentiell krankmachenden Mikroorganismus, häufig klinisch fassbare Symptome einer Infektionskrankheit auftreten, so verlaufen weitere Infektionen mit dem gleichen Pathogen meist inapparent. Diesen optimierten Schutz gegen Sekundärinfektionen vermittelt das adaptive Immunsystem, zu dessen zellulären Bestandteilen antikörperproduzierende B-Zellen und im Thymus ausreifende T-Zellen gehören. T-Zellen sind der Lage, virus- oder bakterieninfizierte Körperzellen zu töten (zytotoxische T-Zellen bzw. $CD8^+$ T-Zellen) oder aber die Antikörperproduktion der B-Zellen sowie die Aktivitäten anderer Immunzellen substantiell zu unterstützen (T-Helferzellen bzw. $CD4^+$ T-Zellen). Die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems, aus der erstmaligen Begegnung mit einem Pathogen zu „lernen“ und diese Information bei erneuter Infektion für eine optimierte Verteidigung zu nutzen, wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet (Murphy, 2011).

1.2. T-Zell-Rezeptorrepertoire und klonale Selektion

Das immunologische Gedächtnis basiert auf der Fähigkeit des adaptiven Immunsystems, sich an einmal identifizierte Pathogene anzupassen. Grundlage hierfür ist ein annähernd zufällig generiertes Repertoire von Antigenrezeptoren unterschiedlichster Spezifität, welches durch somatische Rekombination während der B- und T-Zell-Entwicklung entsteht (Brack et al., 1978; Schatz et al., 1989). Wie ursprünglich von Macfarlane Burnet vorgeschlagen (Burnet, 1959), erfolgt die

Anpassung dieses Repertoires durch Selektion und langfristige Vervielfältigung jener B- bzw. T-Zellen, welche mit ihren Antigenrezeptoren spezifische Antigene des Pathogens – bzw. als Epitope bezeichnete Anteile dieser Antigene – erkennen. Im Falle der CD8⁺ T-Zellen selektiert ein an den Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC-I) antigenpräsentierender Zellen (APCs) gebundenes Peptid jene CD8⁺ T-Zellen, die einen zu diesem Peptid passenden T-Zell-Rezeptor (TCR) besitzen (Bjorkman et al., 1987; Doherty und Zinkernagel, 1975; Townsend et al., 1986; Zinkernagel und Doherty, 1974). Da eine bestimmte T-Zelle in der Regel nur funktionelle TCRs einer Spezifität exprimiert, führt die folgende T-Zell-Proliferation zur selektiven Vervielfältigung nur dieser ausgewählten Spezifität. Auf diese Weise entsteht eine Population von antigenerfahrenen T-Zellen mit identischen TCRs – ein sogenannter T-Zell-Klon. Das Ergebnis klonaler Selektion und Expansion ist eine veränderte Zusammensetzung des adaptiven Immunsystems zugunsten der epitopspezifischen T-Zellen. Auch wenn ein Großteil der durch klonale Expansion entstandenen T-Zellen nach akuter Elimination des Pathogens wieder durch Zelltod verloren geht, bleiben doch etwa 100- bis 1000-fach mehr antigenerfahrene CD8⁺ T-Zellen einer Epitopspezifität erhalten, als ursprünglich im naiven Repertoire vorhanden waren (Williams und Bevan, 2007). Diese langlebigen Zellen bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses.

1.3. Diversifikation der T-Zell-Immunantwort

Nach Aktivierung durch Kontakt ihres TCRs mit dem dazu passenden Peptid-MHC-I-Komplex auf der Oberfläche einer APC und Erhalt weiterer kostimulatorischer und zytokinvermittelter Signale durchlaufen CD8⁺ T-Zellen eine Phase rascher Zellteilungen (Expansionsphase). Ein bis zwei Wochen nach Beginn dieser Proliferation hat sich die epitopspezifische T-Zell-Population etwa 10000-fach vergrößert (Expansionsmaximum) und sogenannte Effektorfunktionen akquiriert. Diese erlauben es CD8⁺ T-Zellen, virus- oder bakterieninfizierte Zellen abzutöten oder deren zellintrinsische antivirale Mechanismen durch Sekretion von Zytokinen, wie z. B. Interferon- γ (IFN- γ), anzuregen. Nach Elimination des Pathogens bricht die epitopspezifische T-Zell-Population innerhalb weniger Tage bis Wochen durch

programmierten Zelltod auf etwa 5-10% des Expansionsmaximums ein (Kontraktionsphase), um sich dann auf diesem Niveau langfristig zu stabilisieren (Gedächtnisphase) (Williams und Bevan, 2007). Lange war unklar, ob spezielle zelluläre Eigenschaften einer kleinen Untergruppe der expandierten T-Zell-Population ein bevorzugtes Überleben dieser Untergruppe ermöglichen oder ob es sich beim Absterben während der Kontraktionsphase um einen rein zufälligen Prozess handelt, der alle Zellen gleichermaßen erfassen kann, in der Summe aber nur 90-95% tatsächlich betrifft (Dutton et al., 1998). In den darauf folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass, entgegen der Annahme reiner Zufälligkeit, eine ausgeprägte phänotypische und funktionelle Diversität innerhalb der expandierten epitopspezifischen T-Zell-Population die unterschiedlichen Schicksale klonaler T-Zellen während der Kontraktionsphase entscheidend beeinflusst (Buchholz et al., 2012).

CD8⁺ T-Gedächtniszellen (T_M), die man noch lange nach dem Zusammenbruch des Expansionsmaximums detektieren kann, sind gekennzeichnet durch die Expression der Rezeptoren für Interleukin-7 (IL-7) und IL-15. Beide Zytokine sind notwendig für das homöostatische Überleben von T_M (Schluns et al., 2000; Schluns und Lefrançois, 2003). Während ein Großteil der antigenerfahrenen T-Zellen zum Zeitpunkt des Expansionsmaximums die α- und β-Kette des IL-15 Rezeptors (IL-15Ra oder CD215, IL15Rβ oder CD122) exprimiert (Schluns et al., 2002), findet sich nur auf einer Untergruppe dieser Zellen die hochaffine α-Kette des IL-7 Rezeptors (IL-7Ra oder CD127). Im wesentlichen aus dieser CD127⁺ Untergruppe gehen dann die langlebigen T_M hervor (Huster et al., 2004; Kaech et al., 2003). Auch kostimulatorische Moleküle aus der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren, wie zum Beispiel CD27, sind für Erzeugung und Erhalt von CD8⁺ T_M von wesentlicher Bedeutung (Hendriks et al., 2000) und ermöglichen eine Unterteilung in langlebige CD27⁺ und kurzlebige CD27⁻ Subgruppen (Hendriks et al., 2005; Hikono et al., 2007). Ein Oberflächenmolekül, dessen Expression andererseits kurzlebige CD8⁺ T-Effektorzellen (T_{EF}) charakterisiert, ist „Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1“ (KLRG1) (Joshi et al., 2007; Sarkar et al., 2008; Voehringer et al., 2001). Zukünftige T_M sind demnach zum Zeitpunkt des Expansionsmaximums unter anderem gekennzeichnet durch die Expression von CD27, CD122, CD127, CD215 und die Abwesenheit von KLRG1.

Etablierte T_M , die man während der Gedächtnisphase der Immunantwort beobachtet, werden weiterhin anhand ihres Migrationsverhaltens sowie ihrer Fähigkeit zur Proliferation bei erneutem Antigenkontakt in zentrale und Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{CM} und T_{EM}) unterteilt (Sallusto et al., 1999). Während T_{CM} , ähnlich wie naive T-Zellen (T_N), die noch keinen Antigenkontakt hatten, durch die Expression des Adhäsionsmoleküls L-Selektin (CD62L) und des Chemokinrezeptors CCR7 zur effektiven Rezirkulation vom Blutstrom in die sekundär lymphatischen Organe befähigt sind und starke Proliferation bei erneutem Antigenkontakt zeigen, migrieren T_{EM} an die epithelialen Barrieren des Organismus in Haut, Darm und Lunge. Bei erneutem Eindringen des Pathogens üben sie dort rasch Effektorfunktionen aus, sind jedoch nur begrenzt zu erneuter Proliferation befähigt (Masopust et al., 2001). Die unterschiedliche Proliferationskapazität von T_{CM} und T_{EM} basiert unter anderem darauf, dass T_{CM} bei sekundärer Aktivierung größere Mengen des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 produzieren als T_{EM} (Sallusto et al., 1999). IL-2 scheint auch für die Entwicklung des $CD8^+$ T-Zell-Gedächtnisses eine wesentliche Rolle zu spielen (Williams et al., 2006). So konnte vor Kurzem gezeigt werden, dass die während der primären Immunantwort erworbene Fähigkeit zur IL-2-Sekretion essentiell für die sekundäre Expansionsfähigkeit der $CD8^+$ T_M -Zellen ist (Feau et al., 2011). Während zum Zeitpunkt des Expansionsmaximums der überwiegende Anteil der aktivierten $CD8^+$ T-Zellen IFN- γ produziert, ist nur ein kleiner Teil in der Lage, gleichzeitig IL-2 und einige weitere Zytokine zu produzieren (Seder et al., 2008). Das Auftreten solcher „multifunktionaler T-Zellen“ stellt jedoch einen wichtigen Prädiktor für den Erfolg von Impfungen (Darrah et al., 2007) sowie den Erhalt von Immunkompetenz und stabilem immunologischem Gedächtnis dar (Betts et al., 2006; Harari et al., 2004). Interessant ist, dass einige Aspekte des zuvor erwähnten Oberflächenphänotyps zukünftiger T_M mechanistische Verknüpfungen zur Produktion von IL-2 besitzen. So führen Signale, die aus der Interaktion von CD27 und seinem Liganden CD70 resultieren, zum Erhalt der IL-2-Produktion (Peperzak et al., 2010), während KLRG1 über die Bindung seines in den epithelialen Barrieren des Körpers exprimierten Liganden E-Cadherin Signale zur Blockade der IL-2-Produktion empfängt (Henson et al., 2009). Damit kennzeichnen diese Moleküle nicht nur phänotypisch ein lang- bzw. kurzlebigen Zellschicksal, sondern können es funktionell mitbestimmen. Determiniert werden bestimmte

Zellschicksale jedoch zunächst auf transkriptioneller Ebene. Für die Entwicklung von CD8⁺ T_M scheinen hier die beiden Transkriptionsfaktoren „T-box transcription factor expressed in T cells“ (T-bet) (Szabo et al., 2000) und „Eomesodermin“ (Eomes) (Pearce et al., 2003), die nach der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen verstärkt exprimiert werden, von wesentlicher Bedeutung zu sein (Cruz-Guilloty et al., 2009). Sie induzieren einerseits das Effektorzytokin IFN- γ und ermöglichen andererseits durch die Induktion von CD122 die Rezeption des homöostatischen Zytokins IL-15 (Intlekofer et al., 2005). Beide Transkriptionsfaktoren koppeln so die Akquise der Effektorfunktion mit der Ausbildung von Gedächtnisfähigkeit. Ab einem gewissen Expressionsniveau scheint sich T-bet jedoch negativ auf die Entwicklung von CD8⁺ T_M auszuwirken (Joshi et al., 2007), während Eomes deren Aufrechterhaltung weiterhin gewährleistet (Banerjee et al., 2010; Zhou et al., 2010).

Zusammenfassend entsteht während der Expansionsphase aus funktionell und phänotypisch weitgehend homogenen naiven T-Zellen eine Vielzahl unterschiedlicher Subgruppen. Durch die Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren, Zytokine und Transkriptionsfaktoren können einige dieser Subgruppen als lang-, andere als kurzlebig definiert werden (Abb. 1).

1.4. Einzelzellschicksale

Proliferations- und Differenzierungsvorgänge, welche die Expansion und Diversifikation epitopspezifischer T-Zellen bedingen, konnten lange Zeit nur auf Populationsebene beobachtet werden – d. h. durch Analyse von Immunreaktionen, die von vielen epitopspezifischen T_N gleichzeitig ausgingen. Diese multiplen Ausgangspunkte machten es jedoch unmöglich, zu beantworten, wie die zuvor angesprochene Diversität aus lang- und kurzlebigen T-Zell-Subgruppen entsteht. So lässt sich auf Populationsebene z. B. nicht klären, ob die Nachkommen einer T-Zelle immer ein gemeinsames lang- oder kurzlebiges Schicksal teilen oder sich in unterschiedliche Subgruppen entwickeln können (Buchholz et al., 2013b). Um die Entwicklungsmöglichkeiten und Entwicklungsregeln einzelner T-Zell-Stammbäume zweifelsfrei zu definieren, bedürfte es der vollständigen Aufzeichnung aller Proliferations-, Absterbe-, Differenzierungs- und Interaktionsereignisse, die eine

einzelne T-Zelle und all ihre Nachkommen im Rahmen einer Immunreaktion erfahren (Schroeder, 2008).

Während dieses Maximalziel außerhalb der momentanen technischen Möglichkeiten liegt, ermöglicht die *in vivo* Zwei-Photonenmikroskopie, einzelne T-Zellen bei der Durchwanderung eines lymphatischen Organs sowie der Interaktion mit APCs und manchmal sogar bei der ersten Zellteilung zu beobachten (Henrickson und Andrian, 2007). Das weitere Schicksal der über Tage ablaufenden und über verschiedene Organe verteilten Immunantwort und damit das Entwicklungspotential der Nachkommen der initial beobachteten T-Zelle ist jedoch mit dieser Technologie aktuell nicht abzubilden (Schumacher et al., 2010).

Das langfristige Schicksal einer T-Zell-Familie – d. h. aller aus einer einzelnen T-Zelle hervorgehenden Nachkommen – wurde erstmals durch die Entwicklung zweier innovativer Herangehensweisen beobachtbar, bei denen einzelne naive T-Zellen mit individuellen, erblichen Markierungen ausgestattet wurden. Die erste erfolgreiche Analyse der Entwicklung von T-Zell-Familien *in vivo* gelang durch den adoptiven Transfer einer einzelnen, kongen markierten Donor-T-Zelle in ein immunkompetentes Empfängertier. Kongene Markierungen basieren auf minimalen, genetisch determinierten Veränderungen einzelner Oberflächenproteine, welche zufällig bei der Propagierung muriner Inzuchtstämme entstehen. Sie erlauben die Unterscheidung von Donorzellen und Empfängerorganismus lösen jedoch bei adoptivem Transfer kongen markierter Zellen keine Abstoßungsreaktion des Empfängers aus. Die im Rahmen einer epitopspezifischen Immunreaktion entstandenen T-Zell-Familien konnten so mithilfe hochsensitiver Durchflusszytometrie anhand ihrer kongenen Markierung aufgespürt und funktionell sowie phänotypisch analysiert werden (Stemberger et al., 2007).

Der zweite Ansatz, mit dem das Schicksal der Nachkommen einzelner T-Zellen *in vivo* sichtbar gemacht wurde, nutzte synthetisch hergestellte kurze DNS-Abschnitte, welche über retro- oder lentivirale Vektoren permanent in das Genom von T-Zellen integriert wurden. Diese sogenannten „Barcodes“ werden unverändert an die Nachkommen einzelner T-Zellen weitergegeben und erlauben, wenn ihre Integrationsfrequenz auf maximal einen Barcode pro Zelle beschränkt wird, die Zuordnung der Nachkommen zu ihrer jeweiligen Ursprungszelle (Gerlach et al., 2010;

Schepers et al., 2008). Zusammenfassend zeigten beide Ansätze, dass eine einzelne CD8⁺ T-Zelle kurz- und langlebige Tochterzellen hervorbringen kann (Gerlach et al., 2010; Stemberger et al., 2007) und so die Entstehung der Diversität einer adaptiven CD8⁺ T-Zell-Immunreaktion aus einer einzelnen Zelle möglich ist (Reiner et al., 2007).

1.5. Redundanz und Robustheit

Die in einem Individuum (ob Versuchstier oder Mensch) beobachtbaren T-Zell-Immunantworten gehen in aller Regel nicht nur von einer einzelnen T-Zelle aus. Im murinen Modellsystem konnte gezeigt werden, dass im Schnitt etwa 50-500 naive T-Zellen vorliegen, deren TCR spezifisch für ein bestimmtes Epitop ist (Moon et al., 2007; Obar et al., 2008). Diese Zahl liegt im Menschen vermutlich noch um ein Vielfaches höher (Arstila et al., 1999). Weitere Arbeiten zeigten, dass im Rahmen einer systemischen Infektion alle naiven T-Zellen, die für ein mit dem Infektionsagens assoziiertes Epitop spezifisch sind, in die Immunantwort einbezogen werden. Diese sogenannte Rekrutierung umfasst also wieder 50-500 T-Zellen (Van Heijst et al., 2009). Da in jedem Individuum die Anzahl naiver T-Zellen physiologischen Begrenzungen unterliegt, führt jede Redundanz im Repertoire unterschiedlicher TCR-Spezifitäten zwangsläufig zu einer Verringerung der Vielfalt desselben und damit zu einer Einschränkung der selektierbaren Spezifitäten. Im Extremfall ist so gegen bestimmte Epitope keine adaptive Immunreaktion möglich (Yager et al., 2008). Die evolutionär konservierte Zusammensetzung von T-Zell-Immunantworten aus den Nachkommen vieler naiver T-Zellen gleicher Epitopspezifität wirft also die Frage nach dem evolutionären Vorteil dieser Redundanz auf. Interessanterweise zeigen T-Zell-Immunantworten in genetisch ähnlichen murinen Inzuchtstämmen und unter definierten experimentellen Bedingungen (Infektionsdosis, Infektionsroute, Analysezeitpunkt usw.) eine sehr hohe interindividuelle Reproduzierbarkeit – sowohl in Bezug auf den Umfang der Immunantwort als auch bezogen auf die phänotypische Zusammensetzung der entstehenden T-Zell-Population (Zehn et al., 2009). Die zugrunde liegenden Proliferations- und Differenzierungsprozesse, die eine an das Infektionsgeschehen angepasste Entstehung kurzlebiger T_{EF} und langlebiger T_M bedingen, müssen also robust reguliert sein. Welche Rolle die Redundanz des TCR-

Repertoires für diese robuste Regulation von T-Zell-Immunantworten spielt, ist nicht bekannt.

2. Problemstellung

CD8⁺ T-Zell-Immunantworten zeigen sehr robust regulierte Expansions- und Diversifikationsmuster. Diese manifestieren sich unter anderem in der an das Infektionsgeschehen angepassten Entwicklung kurzlebiger Effektoren und langlebiger Gedächtniszellen. Auf welcher zellulären Ebene diese Robustheit realisiert wird, ist unbekannt.

Grundsätzlich erscheinen zwei Optionen denkbar:

1. Die Robustheit des Expansions- und Diversifikationsprozesses ist auf Ebene der einzelnen T-Zelle realisiert, d. h. jede von einer einzelnen T-Zelle ausgehende Immunantwort gegen ein definiertes Infektionsgeschehen zeigt das gleiche auch in der Gesamtantwort vorhandene Expansions- und Diversifikationsmuster („einzelzellbasierte Robustheit“)(Abb. 2 links).

2. Die Robustheit des Expansions- und Diversifikationsprozesses wird erst auf Ebene einer Population von naiven T-Zellen realisiert, die gemeinsam auf ein Infektionsgeschehen antworten. Hier würde Robustheit nicht bereits in einem Fraktal der Gesamtantwort etabliert, sondern entstünde erst als Populationsintegral variabler individueller Zellschicksale („populationsbasierte Robustheit“) (Abb. 2 rechts).

Das Ziel meiner Promotionsarbeit war es, diese grundlegenden Aspekte des strukturellen Aufbaus adaptiver Immunität zu klären. Hierzu wurde der adoptive Transfer einzelner kongen markierter CD8⁺ T-Zellen (Stemberger et al., 2007) so erweitert, dass er die gleichzeitige Beobachtung mehrerer T-Zell-Familien in einem Empfängertier und damit eine umfassende Analyse der von einzelnen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* generierten Immunantworten erlaubte.

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Durchflusszytometer	CyAn ADP	Beckman Coulter, Fullerton
	MoFlo Cell Sorter	Beckman Coulter, Fullerton
Mikroskope	Axiovert S100	Carl Zeiss, Jena
	Leica SP 5	Leica, Bensheim
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
	Sorvall® RC 26 Plus	Heraeus, Hanau
	Varifuge 3.0RS	Heraeus, Hanau
	Biofuge stratos	Heraeus, Hanau
Inkubatoren	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
	Minitron	Infors, Bottmingen
	BE 500	Memmert, Schwabach
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus, Hanau
Neubauer Zählkammer		Schubert, München
Photometer Bio	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Multitron® Version 2	INFORS AG, Bottmingen
Wasserbad	LAUDA ecoline 019	Lauda, Königshofen
pH-meter	MultiCal® pH 526	WTW, Weilheim
Feinwaage	CP 124 S	Sartorius, Göttingen

3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth®, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen

„Brain-heart-infusion“	TUM, München
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
DNase-I	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Klinikum rechts der Isar, München
Ethidium-monoazid-bromid (EMA)	Molecular probes, Leiden
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Fix/Perm	BD Bioscience, Heidelberg
Fixation/Permeabilization - Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Gentamicin	Gibco BRL, Karlsruhe
Golgi Plug	BD Bioscience, Heidelberg
Glyzerol	Sigma, Taufkirchen
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Sigma, Taufkirchen
H2-K ⁶ -SIINFEKL-(biotinyliert)	TUM, München
Hydrochlorid (HCl)	Carl Roth®, Karlsruhe
Heparin-Natrium (5000 I.E./ ml)	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Carl Roth®, Karlsruhe
Kollagenase VIII	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Permwash	BD Bioscience, Heidelberg
Propidiumiodid (PI)	Invitrogen, Carlsbad
RPMI-1640-Zellkulturmedium (RPMI-1640)	PAA, Pasching
SIINFEKL-Peptid (Ova ₂₅₇₋₂₆₄ 1 µg/µl in DMSO)	Biosynthan GmbH, Berlin
Streptavidin-PE	IBA live sciences, Göttingen
Streptomycin	Sigma, Taufkirchen
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth®, Karlsruhe
Trypanblaulösung	Sigma, Taufkirchen
Trypsin (1x) bestrahlt	SAFC Biosciences, Kansas
Triton-X	Sigma, Taufkirchen

3.1.3. Puffer und Kulturmedien

Puffer / Kulturmedium	Zusammensetzung
Ammoniumchlorid-Tris-Puffer (ACT)	0,17 M NH ₄ Cl 0,3 M Tris-HCl, pH 7,5
Kollagenase-VIII-Puffer	95 ml RPMI-1640 20,33 mg MgCl ₂ 14,7 mg CaCl ₂ 5 ml FCS
DNase-I-Puffer	75 mM NaCl in 50% (v/v) Glycerol
Durchflusszytometrie-Puffer	1x PBS 0.5% (w/v) BSA 1.65% (v/v) NaN ₃
HBSS-Puffer	1x HBSS 1,3 mM EDTA
RP10 ⁺ -Zellkulturmedium (RP10 ⁺)	1x RPMI-1640 10% (v/v) FCS 5% (v/v) SC ⁺
SC ⁺ -Medienzusatz (SC ⁺) in 1L RPMI-1640	1 ml β-Mercaptoethanol 20 ml Gentamicin 23.83 g HEPES 4 g L-Glutamin 200 ml Penicillin/Streptomycin

3.1.4. Antikörper

Falls nicht anders angegeben, sind die aufgeführten Antikörper gegen Mausantigene gerichtet. Die Gebrauchsverdünnungen der jeweiligen Antikörper wurden für optimale Fluoreszenzfärbungen titriert.

Antikörper	Klon	Hersteller
αCD3-PE	145-2C11	eBioscience, San Diego
αCD8a-PE	53-6.7	eBioscience, San Diego
αCD8a-PerCPCy5.5	53-6.7	eBioscience, San Diego
αCD8a-Pacific Orange	5H10	Invitrogen, Carlsbad
αCD8a-eF450	53-6.7	eBioscience, San Diego
αCD8a-APC	53-6.7	eBioscience, San Diego
αCD16/32 (Fcγ-RII/III, Fc-block)	2.4G2	BD Bioscience, Heidelberg
αCD27-PE	LG.7F9	eBioscience, San Diego
αCD27-PECy7	LG.7F9	eBioscience, San Diego
αCD27-APC	LG.7F9	eBioscience, San Diego
αCD44-FITC	IM7	BD Bioscience, Heidelberg
αCD45.1-FITC	A20	eBioscience, San Diego
αCD45.1-PerCPCy5.5	A20	eBioscience, San Diego
αCD45.1-eF450	A20	eBioscience, San Diego
αCD45.1-APC	A20	eBioscience, San Diego
αCD45.2-FITC	104	eBioscience, San Diego
αCD45.2-HorizonV450	104	BD Bioscience, Heidelberg
αCD62L-FITC	MEL-14	eBioscience, San Diego
αCD62L-PECy7	MEL-14	eBioscience, San Diego
αCD90.1-FITC	OX7	BD Bioscience, Heidelberg
αCD90.1-PE	HIS51	eBioscience, San Diego
αCD90.1-APC	HIS51	eBioscience, San Diego
αCD90.1-APCeF780	HIS51	eBioscience, San Diego
αCD90.2-APC	53.2.1	eBioscience, San Diego
αCD90.2-APCeF780	53.2.1	eBioscience, San Diego
αEomes-PE	Dan11mag	eBioscience, San Diego
αIFN-γ-PECy7	XMG1.2	eBioscience, San Diego
αIL-2-PE	JES6-5H4	eBioscience, San Diego
αKLRG1-PE	2F1	eBioscience, San Diego
αKLRG1-PECy7	2F1	eBioscience, San Diego
αT-bet-PE	4B10	eBioscience, San Diego
αVbeta5-FITC	MR9-4	BD Bioscience, Heidelberg

3.1.5. Mäuse

C57BL/6-Mäuse wurden käuflich erworben (Harlan-Winkelmann, Borcheln). „Recombinase activating gene 1“-defiziente (RAG1^{-/-})-Stämme, OTI^{tg/tg}-, CD45.1/1.1- und CD90.1/1.1-Stämme wurden im Zuchtbereich des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene propagiert. Im OTI^{tg/tg}-Stamm ist das Transgen, das den OTI-T-Zellrezeptor (TCR) kodiert, sowohl im mütterlichen wie väterlichen Chromosomensatz integriert. Die OTI-Matrix-Stämme und RAG1^{-/-}-OTI-Matrix-Stämme wurden durch multiple Kreuzungen generiert und ebenfalls im Zuchtbereich des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene propagiert. Alle Stämme hatten den gleichen genetischen Hintergrund (C57BL/6) und wurden unter spezifisch-pathogen-freien (SPF) Bedingungen gezüchtet. Die verwendeten Mäuse waren alle weiblich und zu Beginn des jeweiligen Experiments im Alter von 8-16 Wochen.

3.1.6. Software

Programm	Hersteller
FlowJo	Treestar, Ashland, USA
Summit V 4.5	Beckman Coulter, Fullerton
FACS Diva	BD Bioscience, Heidelberg
Prism V 5.0b	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Office 2011	Microsoft, Redmond, USA
Adobe Illustrator 3	San Jose, Kalifornien

3.2. Methoden

3.2.1. Zucht der kongenen OTI-Matrix-Donoren

Zur Erzeugung der OTI-Matrix-Donoren wurden zunächst CD45.1/1.1-Mäuse mit CD90.1/1.1-Mäusen verpaart und die Nachkommen der F1-Generation untereinander

gekreuzt. In der F2-Generation wurden dann Mäuse des Phänotyps CD45.1/1-CD90.1/1 identifiziert. Diese wurden zur Erzeugung eines stabilen CD45.1/1-CD90.1/1-Stammes untereinander verpaart. Im nächsten Schritt wurden CD45.1/1-CD90.1/1-Mäuse mit OTI^{tg/tg}-Mäusen verpaart und die Nachkommen der F1-Generation untereinander gekreuzt. Aus der F2-Generation wurden dann die acht Donoren der OTI-Matrix gewonnen. Hierbei wurde von einer transgenen Expression des OTI-TCRs ausgegangen, wenn mindestens 95% der CD8⁺ Zellen auch eine Expression der variablen Region-5 der TCR-beta-Kette (Vbeta-5) zeigten.

Zur Erzeugung der RAG1^{-/-}-OTI-Matrix-Donoren wurden Mäuse des OTI-Matrix-Phänotyps OTI-CD45.1/1-CD90.1/1 mit RAG1^{-/-}-Mäusen verpaart. Die Mäuse der F1-Generation, welche eine transgene Expression des OTI-TCRs zeigten, wurden erneut gekreuzt. In der resultierenden F2-Generation wurden RAG1^{-/-}-Mäuse durch Fehlen von CD19⁺ B-Zellen identifiziert. RAG1^{-/-}-OTI-Mäuse, mit variablen kongenen Phänotypen wurden untereinander so verpaart, dass in den jeweiligen Nachkommen mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit der Phänotyp RAG1^{-/-}-OTI-CD45.1/2-CD90.1/2 auftrat. Schließlich wurden Mäuse des Phänotyps RAG1^{-/-}-OTI-CD45.1/2-CD90.1/2 untereinander verpaart und aus ihrer F1-Generation die acht Donoren der RAG1^{-/-}-OTI-Matrix gewonnen.

Die Analyse des Vbeta-5-, CD19-, CD45.1-, CD45.2-, CD90.1- und CD90.2-Phänotyps erfolgte mittels Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Analyse von Blutproben gezüchteter Tiere. Die Verpaarung erfolgte im Alter von 6-10 Wochen für Weibchen bzw. 8-20 Wochen für Männchen.

3.2.2. Kultivierung von *Listeria monocytogenes*

OVA-exprimierende Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes* (L.m.-OVA) wurden in Glycerin-Kulturen auf -80°C gelagert. Diese Glycerin-Kulturen wurden bei Raumtemperatur angetaut, 10µl des verflüssigten Überstandes aufgenommen und in ein Röhrchen überführt, das 10ml „Brain-heart-infusion“ (BHI)-Medium enthält. Dieses wurde bei 37°C und 90 Umdrehungen pro Minute (rpm) in einem Schüttelinkubator bebrütet. Nach ca. 5,5h wurde die optische Dichte der Bakteriensuspension bei 600 nm (OD-600) in einem Photometer bestimmt. Von einer linearen Beziehung der OD-

600 zur Anzahl koloniebildender Einheiten (kbEs) wurde bei einer Extinktion zwischen 0,05 und 0,1 ausgegangen. In diesem Bereich wurde die Anzahl der kbEs bestimmt als:

$$\text{x kbEs / ml} = \text{OD600} \times 11 \times 10^8$$

Mittels Serienverdünnung in 0,9% NaCl-Lösung wurde die Infektionsdosis auf 5000 kbEs / 200µl für Primärinfektionen und 10^5 kbE / 200 µl für Sekundärinfektionen eingestellt. Zur Kontrolle der methodischen Qualität wurde eine weitere Verdünnung mit 1000 kbEs / 200 µl hergestellt und je 20 µl dieser Verdünnung auf drei BHI-Agarplatten ausgebracht. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien gezählt.

Um konstante Eigenschaften des L.m.-OVA-Bakterienstammes über den gesamten Studienzeitraum hinweg zu gewährleisten, wurde zunächst eine C57BL/6-Maus mit einer Dosis von 5×10^4 L.m.-OVA intravenös (i.v.) infiziert. Am Tag drei nach Infektion wurde das Tier getötet, die Milz entnommen, mittels Spritzenstempel und Nylonzellsieb (70-100 µm Maschenbreite) homogenisiert und in 5 ml PBS aufgenommen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden dann in 900 µl 0,1% Triton-X verdünnt und je 100 µl der Verdünnung auf drei BHI-Agarplatten ausgebracht. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurde eine makroskopisch sichtbare Kolonie mit einer sterilen Öse aufgenommen und in ein 30 ml BHI-Medium enthaltendes Röhrchen überführt. Dieses wurde bei 37°C und 90 rpm in einem Schüttelinkubator bebrütet bis eine OD-600 von 0,2 erreicht war. Je 250 µl der Bakteriensuspension wurden dann in 1 ml-Cryo-Röhrchen vorgelegt und mit 250 µl 20% Glycerol in BHI vermischt. Die Cryo-Röhrchen wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Aus der so hergestellten Charge von Glycerin-Kulturen wurden sämtliche Infektionsexperimente bestritten.

3.2.3. Tätigkeiten am Versuchstier

Um eine ausreichende Venenfüllung zu gewährleisten, wurden die Mäuse vor der i.v. Injektion in die Schwanzvene einige Minuten mit einer Wärmelampe beleuchtet. Die Mäuse wurden in eine Immobilisierungsröhre verbracht, die Injektionsstelle wurde desinfiziert und gereinigt und die Injektion mit einer 28-gauge Nadel durchgeführt. Zur

intraperitonealen (i.p.) Injektion wurde die jeweilige Maus in den Zwanggriff genommen und an der Bauchseite im linken unteren Quadranten mit einer 28-gauge Nadel injiziert. Zur Blutentnahme aus der Wange wurde die jeweilige Maus in den Zwanggriff genommen und mit einer Lanzette ihre rechtsseitige Vena facialis punktiert. Um eine ausreichende Venenfüllung zu gewährleisten, wurden die Mäuse, vor Blutentnahme aus der Schwanzvene, einige Minuten mit einer Wärmelampe beleuchtet. Unter Fixation der Tiere in einer Immobilisationsröhre wurde Blut aus der Schwanzvene mit einer 28-gauge Nadel entnommen. Alle Injektionen und Blutentnahmen wurden ohne vorherige Betäubung durchgeführt, da es sich um sehr kurzzeitige (< 2 Minuten) Beeinträchtigungen der Tiere durch Immobilisierung und Nadelstich handelte. Mäuse wurden durch zervikale Dislokation oder durch CO₂ schmerzlos getötet. Alle Verfahren wurden im Einklang mit dem Tierschutzgesetz und unter Vorlage einer entsprechenden Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

3.2.4. Leukozyten-Präparation aus Blut

Blutproben wurden direkt bei Abnahme mit Heparin-Lösung vermischt (ca. 100 I.E. Heparin / 1 ml Blut). Zur Lyse der enthaltenen Erythrozyten wurden 100-200 µl Blut in 10ml ACT-Lösung aufgenommen, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 1500 rpm für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 5 ml ACT-Lösung suspendiert. Der zweite Lyse-Schritt wurde nach 5 min durch Zugabe von 5 ml RP10⁺ beendet, die Probe erneut bei 1500 rpm für 7 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und sedimentierte Zellen in 10 ml PBS suspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte überführt.

3.2.5. Leukozyten-Präparation aus Milz und Lymphknoten

Milz sowie zervikale, axilläre, kubitale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten wurden dem getöteten Versuchstier entnommen, mit Hilfe eines Spritzenstempels und

eines Nylon-Siebs homogenisiert und in 5 ml RP10⁺ aufgenommen. Zur Lyse verbliebener Erythrozyten wurden die Milzzellen in 3 ml ACT-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der Lyse-Schritt wurde nach 3 min durch Zugabe von RP10⁺ beendet, die Probe bei 1500 rpm für 7 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Milz- und Lymphknotenzellen wurden dann in jeweils 10 ml RP10⁺ suspendiert und ein Aliquot von 20 µl zur Zellzählung abgenommen. Dieses Aliquot wurde zur Identifikation toter Zellen mit Trypan-Blau gefärbt und die enthaltenen lebenden Leukozyten in einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop gezählt.

3.2.6. Leukozyten-Präparation aus der Lunge

Um die nachfolgende Analyse auf die im Lungengewebe befindlichen Leukozyten einzugrenzen, wurden die Lungengefäße nach Tötung des Versuchstiers und Eröffnung des Brustkorbes über eine in den rechten Herzvorhof eingebrachte Kanüle mit heparinhaltiger Lösung (75 I.E. / ml PBS) gespült. Die Lunge wurde dann in Stücke von ca. 3 mm Kantenlänge geschnitten und für 30 min bei 4°C in HBSS-Puffer inkubiert. Die Proben wurden dann mit RP10⁺ gewaschen und für weitere 30 min bei 37°C in Kollagenase-VIII-Puffer verdaut. Nach erneuter Waschung mit RP10⁺ wurden sie analog zu Milzproben weiterverarbeitet.

3.2.7. Peptid-Restimulation

Zur peptidspezifischen Restimulation epitopspezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden zwischen 1×10^7 und 5×10^7 Leukozyten in RP10⁺ aufgenommen und in Gegenwart oder Abwesenheit von 10^{-6} M SIINFEKL für insgesamt 5 h inkubiert. Nach 2 h Inkubation wurden 2 µg / ml Brefeldin-A zugegeben (Golgi-Plug). Brefeldin-A verhindert den Export von Proteinen aus dem Golgi-Apparat und führt damit zur intrazellulären Akkumulation von normalerweise sezernierten Zytokinen.

3.2.8. Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen

Bei der Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen wurde mit einer maximalen Zellkonzentration von 1×10^7 Leukozyten in 100 μ l gearbeitet. Insgesamt wurden bis zu 6×10^7 Leukozyten gefärbt und die Mengen der verwendeten Antikörper, Farbstoffe und Puffer entsprechend angepasst. Sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten bei 4°C. Die Inkubationsschritte wurden, wenn nicht anderes vermerkt, im Dunkeln durchgeführt. Zur Blockade unspezifisch bindender F_C -Rezeptoren wurden die Proben zunächst 15min mit α CD16/32 (Fc γ -RII/III) inkubiert. Wenn eine Fixierung und/oder Permeabilisierung der Proben geplant war, wurde in dieser Inkubationsphase auch der interkalierende Farbstoff EMA unter Lichteinwirkung zugesetzt. EMA kann nur die Membran toter Zellen effizient passieren und färbt deshalb tote Zellen selektiv an. Bei Lichteinwirkung geht EMA außerdem eine kovalente Bindung zur DNS einer Zelle ein. Damit bleibt die selektive Färbung toter Zellen auch nach Fixierung und/oder Permeabilisierung erhalten. Nach einmaliger Waschung mittels FACS-Puffer wurden die gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene gerichteten Antikörper zugegeben und unter Lichtabschluss für 20min inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal in FACS-Puffer gewaschen und, um verklumpte Zellen zu entfernen, durch ein Nylonsieb mit 100 μ m Maschenweite gefiltert. Bei nicht fixierten und/oder permeabilisierten Zellen wurde dann der interkalierende Farbstoff PI zugesetzt, der nur die Membran toter Zellen effizient passieren kann und diese dadurch selektiv anfärbt. Daraufhin erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Proben.

3.2.9. Multimerfärbung spezifischer T-Zell-Rezeptoren

Zur Färbung SIINFEKL-spezifischer TCRs in einer Probe von 10^7 Leukozyten wurden 0,8 μ g biotinyliertes H2-K^b-SIINFEKL und 1 μ g Streptactin-PE zusammen mit FACS-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 μ l bei 4°C im Dunkeln für 45 min inkubiert. Dieser Multimer-Ansatz wurde dann im Verhältnis 1:10 der entsprechenden Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen zugesetzt. Alternativ wurde die Multimerfärbung vor der Antikörperfärbung durchgeführt.

3.2.10. Antikörperfärbung intrazellulärer Antigene

Die Antikörperfärbung intrazellulärer Antigene wurde nach Inkubation der Proben mit α CD16/32 und EMA und nach der Färbung extrazellulärer Antigene durchgeführt. Zur Färbung intrazellulärer Zytokine wurden maximal 10^7 Zellen einer Probe in 100 μ l Cytotfix/Cytoperm suspendiert und für 20 min inkubiert. Dadurch wurde die Antikörperfärbung der Oberflächenantigene fixiert sowie die Zellmembran permeabilisiert. Zur Färbung von Transkriptionsfaktoren wurde ein aggressiveres Detergenz (Fixation/Permeabilization - Transcription Factor Staining Buffer Set) verwendet, das Zell- und Kernmembran für Antikörper durchlässig macht. Unabhängig vom verwendeten Detergenz wurden die Proben dann zweimal mit Perm/Wash-Puffer gewaschen und schließlich, ebenfalls in Perm/Wash-Puffer, mit den gegen die jeweiligen intrazellulären Antigene gerichteten Antikörpern für 30min inkubiert. Danach wurde die Probe zweimal mit Perm/Wash-Puffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich mit 0,5% PFA versetzt.

3.2.11. Durchflusszytometrische Analyse

Durchflusszytometrische Analysen wurden an einem Gerät des Typs „CyAn ADP“ – ausgestattet mit drei Lasern der Exzitationswellenlängen 405nm, 488nm, und 633nm – durchgeführt. Insgesamt konnten an diesem Gerät neun Fluoreszenzparameter gemessen werden. Für Analysen aus peripherem Blut wurden zwischen 5×10^5 und 10^6 Ereignisse, für Analysen aus Lunge, Milz und Lymphknoten zwischen 10^7 und 4×10^7 Ereignisse akquiriert. Zur Aufzeichnung dieser umfangreichen Datensätze wurde eine modifizierte Version der Summit-4.5-Software verwendet. Die weitere Analyse der Datensätze erfolgte mit der Software FlowJo-9.3.

3.2.12. Durchflusszytometrische Sortierung von T-Zellen

Zur durchflusszytometrischen Sortierung wurden Leukozyten aus peripherem Blut der OTI-Matrix-Donoren, wie unter 3.2.4. beschrieben, isoliert. Diese wurden dann, wie

unter 3.2.8. dargestellt, mit PI sowie α CD8-eF450 und α CD44-FITC gefärbt und zur nachfolgenden Sortierung in mindestens 100 μ l FACS-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen. Die Sortierung erfolgte in die V-förmigen Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte. In die Vertiefungen wurden je 200 μ l reines FCS sowie 400000 Leukozyten aus dem peripheren Blut von C57BL/6-Mäusen vorgelegt. Die vorgelegten Leukozyten wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Der so entstandene Zellrasen sollte die Adhärenz und/oder Aktivierung der sortierten T-Zellen an der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte verhindern. Sortiert wurden naive T-Zellen des Phänotyps $CD8^+ CD44^{low}$. Nach Tropfenabriss wurden nur Tropfen sortiert, die genau ein positives Ereignis ($CD8^+ CD44^{low}$) enthielten und in denen – sowie im vorhergehenden und nachfolgenden Tropfen – kein negatives Ereignis nachweisbar war (Maschineneinstellung: „single cell purity“). Zusätzlich musste sich das positive Ereignis im Zentrum des Zieltropfens befinden (Maschineneinstellung: „droplet envelope = 0,5“). Pro Sortierungsrunde wurden jeweils einzelne oder 100 Zellen aus einem OTI-Matrix-Donor in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte sortiert. Acht aufeinanderfolgende Sortierungsrunden erlaubten so z. B. die Zusammenstellung von acht einzelnen OTI-Matrix-Zellen pro Vertiefung. Die Sortierungen wurden an einem Gerät des Typs „MoFlo Cell Sorter“ durchgeführt.

3.2.13. Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Evaluation der achtfachen Sortierung einzelner $CD8^+ CD44^{low}$ T-Zellen erfolgte an einem konfokalen Mikroskop des Typs „Leica SP5“. Dieses war ausgestattet mit Lasern der Exzitationswellenlängen 405nm, 488nm und 633nm.

3.2.14. Mathematische Populationssimulation

Um in Abbildung 13A die Größe (absolute Zellzahl) der aus 100 transferierten Zellen hervorgegangenen Populationen zu simulieren, wurden die Größen von zufällig gezogenen T-Zell-Familien summiert („100 simuliert“). Hierzu wurden T-Zell-Familien durch „Ziehen mit Zurücklegen“ ausgewählt und ihre Größen kumuliert. Die Anzahl der

zu ziehenden T-Zell-Familien ergab sich hierbei – unter Annahme einer Binomialverteilung – aus der zuvor bestimmten Detektionswahrscheinlichkeit $p = 28,3\%$ (für Tag zwölf nach Infektion) und der Ursprungsgröße der zu rekonstruierenden 100er-Population $n = 100$.

Um den Mittelwert der absoluten Zellzahl einer simulierten 100er-Population und dessen Unsicherheit möglichst präzise zu bestimmen, wurde zunächst ein sogenanntes „Resampling“ der gemessenen T-Zellfamilien mittels eines nicht-parametrischen Bootstrap-Ansatzes ($n = 1000$) durchgeführt. Die so vergrößerte Stichprobe wurde dann genutzt, um eine große Zahl von 100er-Populationen (10000) durch „Ziehen mit Zurücklegen“ und Kumulation zu simulieren.

In Abbildung 13B wurde der gleiche Bootstrap-Ansatz genutzt, um die Kumulationskurve der simulierten 100er-Populationen zu erstellen „100 simuliert“. Die in Abbildung 13B, 15B, 16B, 17B und 18B angegebenen Signifikanzen wurden mit einem Bootstrap-Ansatz zum Vergleich zweier Populationsmittel berechnet (Efron und Tibshirani, 1994). Zur Simulation weiterer Populationsattribute in Abbildung 19B-C und 23B-C wurde die in den gezogenen T-Zellfamilien gefundene Anzahl von $CD62L^+$, $CD27^+$, $IL-2^+$ oder $IFN\gamma^+$ Nachkommen summiert und durch die Summe aller in den entsprechenden T-Zellfamilien gefundenen Nachkommen geteilt. Die weißen Dreiecke in Abbildung 13A, 19B-C und 23B-C stellen eine zufällig ausgewählte Reihe aufeinander folgender Simulationen von 100er-Populationen dar. Die Anzahl dargestellter Simulationen entspricht der Anzahl der im jeweiligen Experiment gemessenen 100er-Populationen.

Die beschriebene Simulation der Größen und phänotypischen Attribute der 100er-Populationen wurde von Dr. Michael Floßdorf durchgeführt.

3.2.15. Allgemeine statistische Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, stellen Säulen bzw. Linien den Mittelwert und Fehlerbalken den Standardfehler dar. Korrelationen und ihre Signifikanz wurden mittels des nicht-parametrischen Spearman-Tests bestimmt. Sonstige Signifikanzen wurden an rangtransformierten Daten mittels Welch-Test bestimmt (um sowohl die fehlende Normalverteilung sowie die ungleiche Varianz der Daten zu berücksichtigen).

In Abbildung 8A und D wurde Students-t-Test verwendet. In Abbildung 11A und 12A wurde die Signifikanz mittels Kurskal-Wallis- und Dunn-Test bestimmt. In Abbildung 11B und 12B wurden vorhergesagte und gemessene Verteilung mittels Chi-Quadrat-Test (modifiziert nach (Lucy, 2000)) verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Kongene OTI-Matrix und repetitive Sortierung

Zur umfassenden Analyse der Entwicklung von T-Zell-Familien *in vivo* wurde der von Stemberger et al. (Stemberger et al., 2007) etablierte adoptive Transfer einzelner kongen markierter T-Zellen erweitert, um den gleichzeitigen Transfer mehrerer individuell verfolgbarer Einzelzellen zu ermöglichen. Hierzu wurden wie zuvor OTI-TCR-transgene Tiere verwendet, deren CD8⁺ T-Zellen fast ausschließlich einen definierten TCR exprimieren (Hogquist et al., 1994). Dieser OTI-TCR ist spezifisch für das auf MHC-I präsentierte Peptid SIINFEKL des Modellantigens Ovalbumin (OVA). In Abwandlung zum ursprünglichen Ansatz wurden diese OTI-TCR-transgenen Tiere nicht nur mit CD45.1-, sondern auch mit CD90.1-kongen Tieren verpaart und in weiteren Kreuzungen verschiedene kongene Mischphänotypen erzeugt. Da die kongenen Phänotypen durch kodominante Expression der jeweiligen Genloci bestimmt werden, ergeben sich je drei mögliche Markerkombinationen: CD45.1/1, CD45.1/2, CD45.2/2 bzw. CD90.1/1, CD90.1/2, CD90.2/2. Bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Phänotypen für CD45 und CD90 erhöht sich die Anzahl der unterscheidbaren Phänotypen auf insgesamt 9 (3x3). „2“ steht hierbei für die Wildtyp-Version des jeweiligen Moleküls, wie sie im C57BL/6-Mausstamm vorliegt. C57BL/6-Tiere zeigen also den Phänotypen CD45.2/CD45.2 und CD90.2/CD90.2. Durch Kreuzung wurden insgesamt acht OTI-TCR-transgene Mauslinien erzeugt, welche sich voneinander sowie vom C57BL/6-Stamm durch ihre kongenen Phänotypen unterscheiden (Abb. 3). Diese „kongene Matrix“, bestehend aus den „Matrix-Komponenten“ A-H, konnte experimentell durch vier mit verschiedenen Fluorochromen markierte, monoklonale Antikörper, welche selektiv die „1“ bzw. „2“ Version von CD45 bzw. CD90 binden, aufgeschlüsselt werden. Durch derartige Antikörperfärbungen wurden Kohorten von je acht geeigneten OTI-Matrix-Donoren identifiziert (Abb. 4). Aus peripherem Blut der OTI-Matrix-Donoren wurden dann mittels acht aufeinanderfolgender durchflusszytometrischer Sortierungen je acht einzelne CD44 schwach exprimierende (CD44^{low}) und deshalb als naiv anzusehende CD8⁺ T-Zellen in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zusammengestellt (Abb. 5).

Ihr distinkter kongener Phänotyp wurde nachfolgend fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (Abb. 6). Der naive Phänotyp der $CD44^{low} CD8^+$ Zellen sowie die Homogenität dieses T-Zell-Kompartiments konnten durch die einheitlichen Expressionsmuster von CD27, CD62L und des SIINFEKL-spezifischen OTI-TCRs bestätigt werden (Abb. 7). Um die Expansions- und Diversifikationsprozesse während einer OVA-spezifischen T-Zell-Immunantwort zu analysieren, wurden C57BL/6-Empfängertiere mit genetisch veränderten, OVA-exprimierenden Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes* (L.m.-OVA) infiziert (Foulds et al., 2002). L.m. ist ein grampositives, fakultativ intrazelluläres Stäbchenbakterium, das sich im Zytoplasma infizierter Wirtszellen vermehren kann. Nach intravenöser Gabe repliziert L.m. bevorzugt in den $CD8\alpha^+$ dendritischen Zellen (DC) der Milz (Edelson et al., 2011; Neuenhahn et al., 2006; Verschoor et al., 2011). Die Immunität gegen den Erreger ist von $CD8^+$ T-Zellen abhängig (Edelson und Unanue, 2000; Lane und Unanue, 1972; Pamer, 2004), die durch Präsentation des zu ihrem TCR passenden Epitops durch $CD8\alpha^+$ DC aktiviert werden (Dudziak et al., 2007; Hildner et al., 2008). Niedrige Zahlen adoptiv transferierter OTI-T-Zellen bilden in diesem Infektionsmodell eine der endogenen T-Zellantwort gegen das SIINFEKL-Epitop vergleichbare Immunantwort aus, ohne die endogene Antwort zu behindern (Badovinac et al., 2007). So führten 100 adoptiv transferierte OTI-T-Zellen zu keiner nennenswerten Unterdrückung der endogenen T-Zell-Proliferation. Auch zeigten sie mit endogenen SIINFEKL-spezifischen T-Zellen (Abb. 8 A-B) vergleichbare CD27- und CD62L-Expressionsraten (Abb. 8 C-D). Mit diesen Beobachtungen im L.m.-OVA-Infektionsmodell, der Zucht von OTI-Matrix-Donoren und der präzisen Sortierung multipler Einzelzellen aus deren Blut waren die Grundlagen für eine umfangreiche Analyse der Differenzierung einzelner $CD8^+$ T-Zellen *in vivo* geschaffen.

4.2. Variable Expansion von $CD8^+$ T-Zell-Familien *in vivo*

Um sicherzustellen, dass die aus unterschiedlichen OTI-Matrix-Donoren gewonnenen $CD8^+ T_N$ ein vergleichbares Entwicklungspotential besitzen, wurden zunächst je 100 $CD8^+ CD44^{low}$ Zellen der acht OTI-Matrix-Komponenten A-H gemeinsam in ein C57BL/6-Empfängertier transferiert („8x100 Transfer“) und dieses mit 5000

koloniebildenden Einheiten (kbEs) *L.m.*-OVA infiziert. Acht Tage nach der Infektion – zum Zeitpunkt des Expansionsmaximums – wurden dann die Nachkommen der transferierten Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert (Abb. 9 A-B). Die Expansion und phänotypische Diversifikation dieser acht T-Zell-Populationen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 9 C-D). Dies galt auch für Tag zwölf nach der Infektion (Abb. 10 oberste Reihe).

Um einen direkten Vergleich von Immunantworten zu ermöglichen, die aus einzelnen T-Zellen hervorgehen, und solchen, die aus T-Zell-Populationen entstehen, wurden im nächsten Schritt jeweils sieben Einzelzellen (gewonnen aus den OTI-Matrix-Donoren A-G) und eine Population von 100 Zellen (gewonnen aus dem OTI-Matrix-Donor H) gleichzeitig in ein Empfängertier transferiert („7×1 + 100 Transfer“). Das Empfängertier wurde kurz nach erfolgtem Zelltransfer mit *L.m.*-OVA infiziert. Mit Hilfe hochsensitiver Durchflusszytometrie konnten dann von einzelnen T-Zellen abstammende T-Zell-Familien detektiert werden (Abb. 10). Die Wahrscheinlichkeit zur Detektion einer T-Zell-Familie pro transferierter Einzelzelle lag bei 24,7% für Tag acht und 28,3% für Tag zwölf. Zwischen den von unterschiedlichen OTI-Matrix-Donoren abstammenden T-Zell-Familien fanden sich keine signifikanten Unterschiede dieser Detektionsrate (Abb. 11A und Abb. 12A). Dies bestätigte erneut das vergleichbare Entwicklungspotential der aus unterschiedlichen OTI-Matrix-Donoren gewonnenen T_N . Die Anzahl der in einem Empfängertier gleichzeitig nachweisbaren T-Zell-Familien verhielt sich nach einem „7×1 + 100 Transfer“ entsprechend der insgesamt beobachteten Detektionsrate für Tag acht bzw. zwölf nach der Infektion. So zeigte sich für beide Zeitpunkte keine signifikante Abweichung von der zu erwartenden Binomial-Verteilung (Abb. 11B und 12B). Bei einer Detektionsrate von ca. 28% für T-Zell-Familien an Tag zwölf nach der Infektion ist davon auszugehen, dass auch die transferierte 100er-Population nur etwa 28 Zellen erfolgreich in das Proliferationsgeschehen einbringt – die transferierte 100er-Population also nicht 100-fach, sondern nur ca. 28-fach mehr Nachkommen generiert als eine Einzelzelle. Die mittlere Zahl an Nachkommen pro Einzelzelle und pro transferierter 100er-Population skalierte in etwa entsprechend dieser Annahme (Abb. 13A). Die Größenverteilung der T-Zell-Familien war jedoch mit einer Streuung über drei Zehnerpotenzen hinweg unerwartet breit und zeigte weiterhin eine ausgeprägte Schiefe: So lag die Größe der

meisten T-Zell-Familien an Tag zwölf nach der Infektion deutlich unterhalb des Mittelwertes von ca. 4000 Nachkommen („Zwerge“); einige wenige Einzelzellen generierten jedoch bis zu 70000 Nachkommen („Riesen“) und reichten damit sogar in den Größenbereich der 100er-Populationen hinein (Abb. 10 unterste Reihe und Abb. 13A). Diese Zusammensetzung der Immunantwort wurde weitgehend unverändert auch in Lymphknoten, Blut und Lunge der Empfängertiere gefunden (Abb. 14). Damit konnte die Größenhierarchie in der Milz als stellvertretend für die Größenverteilung der T-Zell-Familien in den sekundär-lymphatischen sowie peripheren Organen insgesamt angenommen werden. Um Unterschiede in der Schiefe dieser Verteilung zu quantifizieren, wurde bestimmt, wie viele der beobachteten Einzelzell- bzw. 100er-Nachkommenschaften nötig wären, um einen bestimmten Anteil der kumulierten Gesamtgröße aller Einzelzell- bzw. 100er-Nachkommenschaften zu generieren. Es zeigte sich, dass die 10, 20 und 50% größten T-Zell-Familien einen signifikant höheren Anteil an der kumulativen Nachkommenschaft aller Einzelzellen hatten, als dies für die entsprechenden 100er-Nachkommenschaften und ihren Anteil an der kumulativen Nachkommenschaft aller 100er-Populationen der Fall war (Abb. 13B). Schon die größten 5% aller T-Zell-Familien reichten aus, um 50% der kumulierten Gesamtgröße aller Einzelzell-Nachkommenschaften zu generieren (Abb. 13B). Um weiter zu überprüfen, ob die Summe der gemessenen Einzelzellantworten tatsächlich mit dem aus 100 transferierten OTI-Zellen hervorgegangenen Populationsverhalten kongruent ist, wurde die Populationsexpansion nach Transfer von 100 OTI-Zellen aus den gemessenen Einzelzellexpansionen *in silico* rekonstruiert. Hierzu wurden T-Zell-Familien durch „Ziehen mit Zurücklegen“ zufällig ausgewählt und ihre Größen kumuliert. Die Anzahl der zu ziehenden T-Zell-Familien ergab sich hierbei – unter Annahme einer Binomialverteilung – aus der zuvor erwähnten Detektionswahrscheinlichkeit $p = 28,3\%$ und der Ursprungsgröße der zu rekonstruierenden 100er-Population $n = 100$. Der durch vielfache Wiederholung dieses Prozesses simulierte Mittelwert der Expansion von 100 transferierten T-Zellen unterschied sich nicht signifikant von dem tatsächlich gemessenen (Abb. 13A). Weiterhin ergab sich eine ähnliche Größenverteilung der simulierten 100er-Populationen (Abb. 13B).

4.3. Variable Expansion unter verschiedensten Experimentalbedingungen

Die beschriebene Größenvariabilität konnte auch für mehrere T-Zell-Familien innerhalb eines Empfängertieres nachgewiesen werden (Abb. 10 unterste Reihe). Dies schließt interindividuelle Schwankungen in der technischen Durchführung der Experimente als wesentliche Ursache der beobachteten Expansionsunterschiede weitgehend aus. Wichtig ist weiterhin, dass die beobachtete Variabilität bereits an Tag acht nach der Infektion voll ausgeprägt ist. Da zu diesem Zeitpunkt die Kontraktionsphase noch nicht erreicht ist, scheint ein unterschiedliches Absterben der T-Zell-Familien kein notwendiger Faktor bei der Variabilitätsentstehung zu sein (Abb. 15A-B). Auch verstärkter Wettbewerb durch Mitführen einer 100er-Population bei „7×1 + 100 Transfers“ in die Empfängertiere scheint nicht ausschlaggebend zu sein, da auch bei Transfer von achtmal einer Zelle aus den OTI-Matrix-Donoren („8×1 Transfer“) die Größenvariation der T-Zell-Familien unvermindert hoch blieb (Abb. 16A-B). Die charakteristische Variabilität der Einzelzellexpansion war auch bei Infektion der Empfängertiere mit OVA-exprimierendem Vaccinia-Virus (VACV-OVA) nachweisbar (Abb. 17A-B). Diese Beobachtung schließt eine ursächliche Abhängigkeit der Größenvariabilität von speziellen Bedingungen der L.m.-Infektion aus. Wichtig ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei den in all diesen Kontrollexperimenten verwendeten OTI-TCR-transgenen Mauslinien ein gewisser Prozentsatz der naiven T-Zellen zwei TCRs exprimiert: einen SIINFEKL-spezifischen TCR, der durch das OTI-Transgen kodiert wird, und einen zweiten TCR unbekannter Spezifität, der aus der Rekombination der endogenen TCR-Loci während der individuellen T-Zell-Entwicklung hervorgeht. Um zu überprüfen, ob das hochvariable Expansionsverhalten einzelner OTI-Zellen unabhängig von diesen zusätzlichen TCRs auftritt, musste die residuale Rekombination endogener TCR-Loci unterbunden werden. Um dies zu erreichen, wurden die acht etablierten Linien der kongenen OTI-Matrix auf „Recombinase activating gene 1“-defiziente ($RAG1^{-/-}$) Mäuse rückgekreuzt, in denen keine endogene Rekombination der TCR-Loci erfolgt. Adoptive Einzelzell-Transfers aus den so

generierten RAG1^{-/-} OTI-Matrix-Donoren zeigten zu den ursprünglichen Experimenten vollends vergleichbare Resultate (Abb. 18 A-B). Aus einzelnen T_N, die einen identischen TCR exprimieren, gehen also unter allen getesteten Bedingungen wenige T-Zell-Familien hervor, die als „Riesen“ den Hauptanteil der Immunantwort ausmachen, und viele „Zwerge“, die jeweils nur einen kleinen Beitrag zur Gesamtgröße der antigenspezifischen T-Zell-Population liefern.

4.4. Inverse Korrelation von Gedächtnisphänotyp und Expansion

Um ein besseres Verständnis für die physiologischen Konsequenzen der beobachteten Expansionsunterschiede zu entwickeln, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, Zytokine und Transkriptionsfaktoren, die entweder mit der Entwicklung langlebiger T_M- oder kurzlebiger T_{EF}-Zellen assoziiert sind, in den detektierten T-Zell-Familien überprüft. Interessanterweise zeigte sich, dass die meisten T-Zell-Familien deutlich höhere Anteile an CD62L⁺ und/oder CD27⁺ Zellen enthielten, als dies unter Berücksichtigung der Markerverteilung in den mitgeführten 100er-Populationen erwartet worden wäre (Abb. 19A-C und 20A-B). Sie zeigten also ein deutliches Übergewicht an T_M-Zellen. Im Gegensatz dazu fanden sich in den wenigen entstandenen „Riesen“ fast ausschließlich CD27⁻ CD62L⁻ T_{EF}-Zellen (Abb. 21A oben links). Während 100er-Populationen eine insgesamt geringe Variabilität von Größe und Phänotyp und keine signifikante Beziehung zwischen diesen beiden Aspekten zeigten, fand sich für T-Zell-Familien eine deutliche inverse Korrelation von Familiengröße und Prozentsatz an CD62L⁺ Nachkommen sowie eine schwächere inverse Korrelation von Familiengröße und Prozentsatz an CD27⁺ Nachkommen (Abb. 21A-C und 22A-B). Diese inverse Korrelation erklärt die Diskrepanzen der Mittelwerte für CD62L und CD27 zwischen T-Zell-Familien und 100er-Populationen. Tatsächlich gelang es, die niedrigeren Mittelwerte der 100er-Populationen für den Prozentsatz von CD62L sowie CD27 aus dem Datensatz der T-Zell-Familien adäquat zu rekonstruieren, sobald der überproportionale Einfluss der „Riesen“ auf den Mittelwert berücksichtigt wurde (Abb. 19B-C). Wenige aus einzelnen naiven T-Zellen hervorgehende „Riesen“ scheinen also die überwiegende Zahl aller

kurzlebigen Effektoren zu stellen, während ein Großteil der „Zwerge“ vor allem T_M-Zellen enthält.

Um diese Hypothese zu erhärten, wurde die Fähigkeit der T-Zell-Familien zur Sekretion der Zytokine IFN- γ und IL-2 überprüft. Während sowohl langlebige T_M- wie kurzlebige T_{EF}-Zellen in der Akutphase der Immunantwort IFN- γ sezernieren, ist die Fähigkeit zur IL-2-Produktion T_M-Zellen vorbehalten. Ähnlich wie für die Oberflächenmoleküle CD62L und CD27 zeigte sich, dass die meisten T-Zell-Familien zum Zeitpunkt des Expansionsmaximums einen höheren Anteil IL-2 und IFN- γ produzierender Nachkommen enthalten, als dies aus den Sekretionsprofilen der 100er-Populationen abgeleitet worden wäre (Abb. 23A-C). Auch fand sich eine deutliche inverse Korrelation der Familiengröße mit dem Prozentsatz IL-2-produzierender Zellen und eine schwächere inverse Korrelation mit dem Prozentsatz an IFN- γ -Produzenten (Abb. 24A-C). Auch auf Ebene der Zytokinsekretion fand sich also in einem Großteil der T-Zell-Familien ein Übergewicht an T_M. Durch den deutlich niedrigeren Prozentsatz dieser Zellen in den wenigen „Riesen“ (Abb. 24A oben links) verschob sich ihr Anteil bei *in silico* Rekonstruktion jedoch auf das in den 100er-Populationen beobachtete Niveau (Abb. 23B-C).

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden Größe, CD62L-, CD27- und KLRG1-Gehalt der detektierten T-Zell-Familien in Beziehung zu ihrem jeweiligen Expressionsniveau der Transkriptionsfaktoren Eomes und T-bet gesetzt. Auch diese Analysenebene lieferte zu den vorherigen Erkenntnissen kongruente Resultate. So zeigte sich, dass das Expressionsniveau des mit effektiver Gedächtnisentwicklung assoziierten Transkriptionsfaktors Eomes negativ mit der Größe der T-Zell-Familien (Abb. 25A) und ihrer KLRG1-Expression, jedoch positiv mit ihrer CD62L- und CD27-Expression korrelierte (Abb. 25B). T-bet, dessen Expression mit der Entwicklung kurzlebiger Effektoren assoziiert ist, zeigte ein umgekehrtes Korrelationsverhalten (Abb. 25A-B).

Die von einzelnen naiven T-Zellen ausgehende Expansion zeigte also eine deutliche Kovariation mit wesentlichen zellulären Charakteristika. Im Einzelnen ließ sich auf Ebene des Oberflächenphänotyps (Abb. 21-22), der Zytokinsekretion (Abb. 24) und der Expression von Transkriptionsfaktoren (Abb. 25A) eine inverse Korrelation der Familiengröße mit dem relativen Anteil an T_M-Zellen festmachen.

4.5. Fehlende Korrelation von Primär- und Sekundärexpansion

Durch die bisherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass an Tag acht und zwölf nach der Infektion eine inverse Korrelation zwischen der Größe einer T-Zell-Familie und ihrem relativen Gehalt an phänotypisch definierten T_M -Zellen besteht (Abb. 21-22 und Abb. 24-25). Die weitere Entwicklung dieser T_M -Zellen war jedoch nicht verfolgt worden. Um die tatsächliche Menge an gedächtnisfähigen Zellen in großen und kleinen T-Zell-Familien abschätzen zu können, musste zusätzlich zur Primärexpansion einer T-Zell-Familie nach erstmaligem Antigenkontakt auch deren Sekundärexpansion bei erneuter Antigenexposition untersucht werden. Die Sekundärantwort sollte von primär erzeugten T_M -Zellen generiert werden und damit ein von phänotypischen Indikatoren unabhängiges Maß für die Assoziation von akuter Expansion und langfristigem immunologischem Gedächtnis sein. Die Primärexpansion einzelner OTI-Matrix-Zellen wurde im peripheren Blut der Rezipienten acht Tage nach Infektion mit L.m.-OVA bestimmt. Eine erneute Infektion mit L.m.-OVA und die nachfolgende Bestimmung der Sekundärexpansion erfolgten mit mindestens 5-wöchigem Abstand zur Primärinfektion. Es zeigte sich, dass während der Primär- und Sekundärexpansion die im peripheren Blut detektierte Größe einer T-Zell-Familie eng mit ihrer aus Milz, Lymphknoten und Lunge bestimmten Gesamtgröße korrelierte (Abb. 26). Interessanterweise waren jedoch jene T-Zell-Familien, welche die Primärantwort dominiert hatten, nicht notwendigerweise auch im Rahmen der Sekundärantwort dominant. Andererseits wuchsen viele kleine (teilweise primär nicht nachweisbare) T-Zell-Familien zu beträchtlicher sekundärer Größe heran (Abb. 27A). Unter Berücksichtigung aller T-Zell-Familien, die bereits primär nachweisbar waren, konnte gezeigt werden, dass es keine signifikante Korrelation zwischen der Größe der Primär- und Sekundärexpansion einer T-Zell-Familie gab (Abb. 27B) – dass also das akute Wachstum einer T-Zell-Familie ein schlechter Prädiktor für ihre Fähigkeit zur Gedächtnisbildung war. Um abzusichern, dass die beobachtete Sekundärexpansion tatsächlich ein stabiler Parameter für die Größe der primär generierten Gedächtnispopulation war, wurden die Rezipienten einer dritten Infektion ausgesetzt. Für ein optimales Ansprechen der gebildeten Gedächtnispopulationen trotz bereits etablierter Abwehrmechanismen (z.B. neutralisierender Antikörper) wurde das

experimentelle Antigen durch heterologe Infektion mit OVA-exprimierendem, modifiziertem Vaccinia-Virus-Ankara (MVA-OVA) eingebracht. Im Gegensatz zur fehlenden Korrelation zwischen Primär- und Sekundärexpansion (Abb. 27B) zeigte sich nun, trotz unverändert bestehender Variabilität, eine enge positive Korrelation zwischen Sekundär- und Tertiärexpansion (Abb. 27C). Dies weist klar auf den stabilen Erhalt primär erzeugter Gedächtnisfähigkeit hin und legt nahe, dass die Menge der Zellen, welche immunologisches Gedächtnis gewährleisten, weitgehend unabhängig von der Primärexpansion einer T-Zell-Familie reguliert wird.

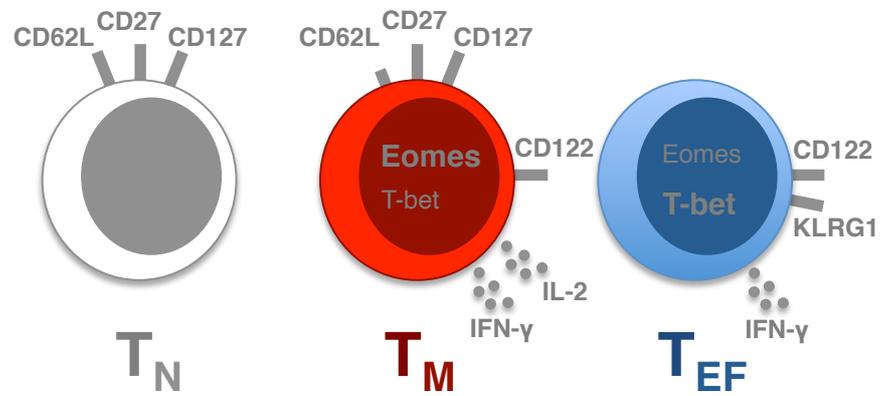


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Oberflächenphänotyps sowie der Zytokin- und Transkriptionsfaktorexpression von T_N , T_M und T_{EF}

T_M (rot) zeigen ein Expressionsprofil zwischen T_N (grau) und T_{EF} (blau). Die Expression von CD62L und IL-2 ist im T_M Kompartiment variabel. So sind T_{CM} nicht jedoch T_{EM} IL-2- und CD62L-positiv.

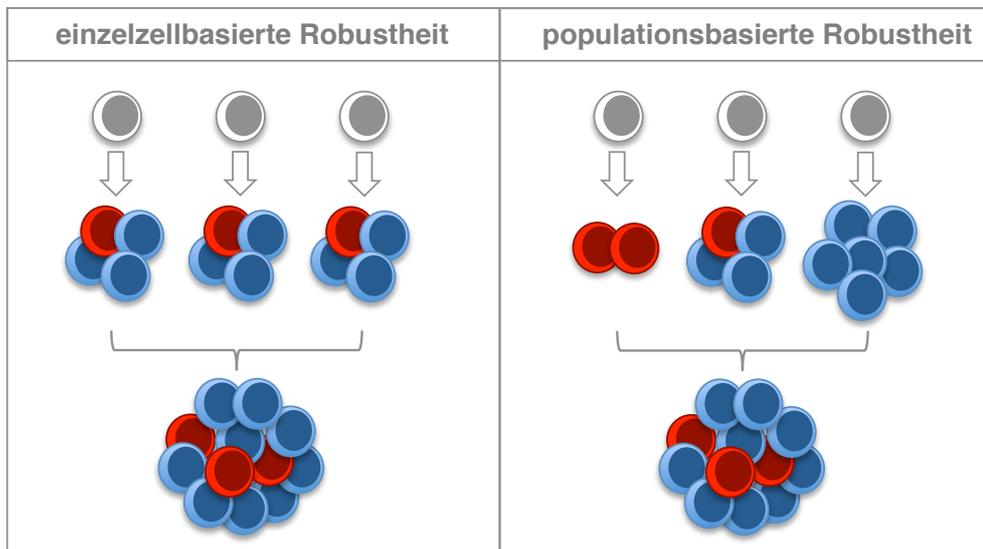


Abbildung 2: Schematische Darstellung von einzelzell- und populationsbasierter Robustheit

Dargestellt sind 3 einzelne T_N (grau), die gemeinsam insgesamt 12 Nachkommen generieren. Drei der Nachkommen haben einen T_M -Phänotypen (rot), 9 einen T_{EF} -Phänotypen (blau). Bei Vorliegen von einzelzellbasierter Robustheit erzeugt jede einzelne T_N eine vergleichbare Anzahl von Nachkommen und ein vergleichbares Verhältnis von T_M und T_{EF} (links). Bei populationsbasierter Robustheit kann sowohl die Anzahl der Nachkommen, wie das Verhältnis von T_M zu T_{EF} deutlich variieren (rechts).

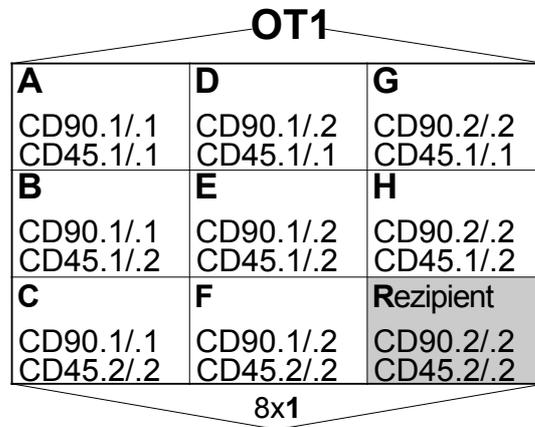


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Genotyps von OTI-Matrix-Donoren und C57BL/6 Rezipienten

(A) Schema, das die Genotypen der OTI-Matrix-Donoren (A-H) sowie den der C57BL/6-Rezipienten (R) wiedergibt.

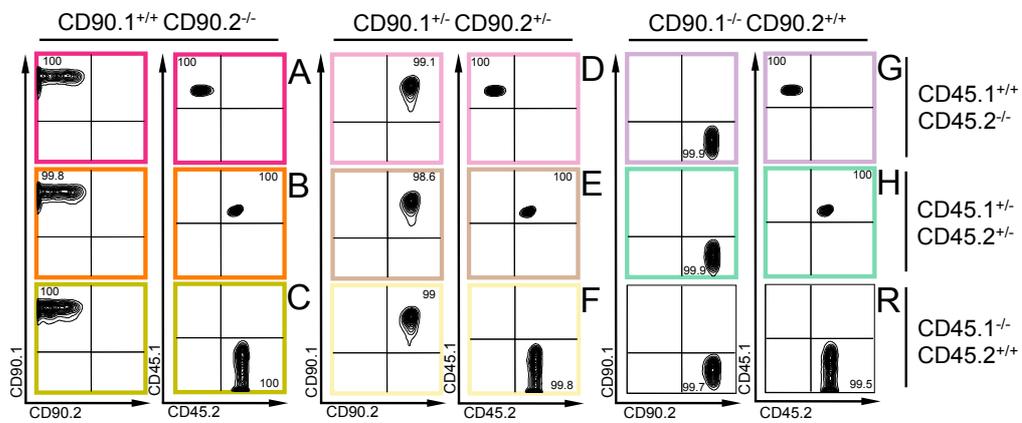


Abbildung 4: Darstellung des kongenen Phänotyps der acht OTI-Matrix-Donorlinien A-H und des C57BL/6 Rezipienten

Die ‚contour‘-Diagramme zeigen den kongenen Phänotypen der CD8⁺ Zellen im peripheren Blut von OTI-Matrix-Donoren (A-H) und C57BL/6-Rezipient (R). Peripheres Blut wurde mit Antikörpern gegen CD8, CD45.1, CD45.2, CD90.1 und CD90.2 gefärbt.

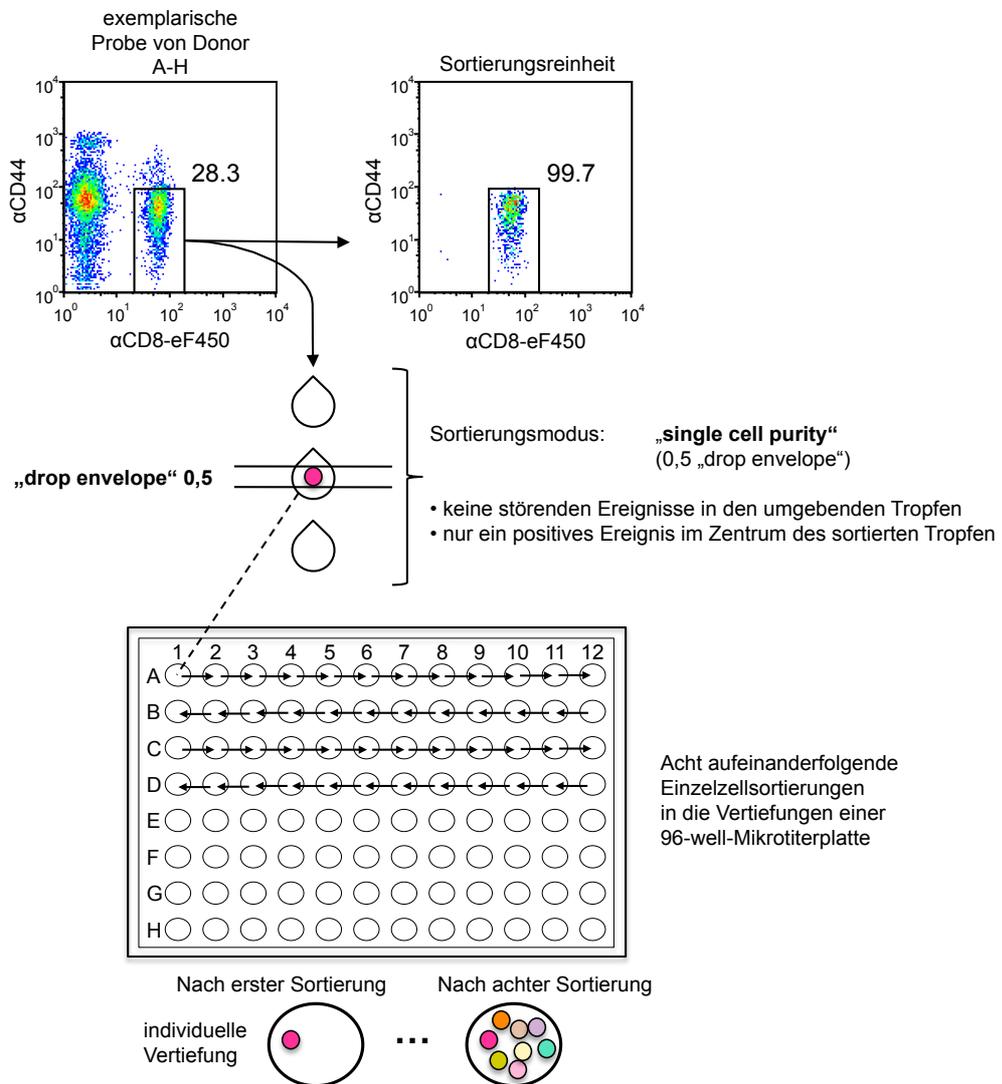


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sortierungsstrategie für den achtfachen adoptiven Einzelzelltransfer

Einzelne $CD8^+ CD44^{low}$ Zellen wurden aus peripherem Blut der OTI-Matrix-Donoren (A-H) per Durchflusszytometrie sortiert. Nach Tropfenabriss wurden nur Tropfen sortiert, die genau ein positives Ereignis ($CD8^+ CD44^{low}$) enthielten und in denen - sowie im vorhergehenden und nachfolgenden Tropfen - kein negatives Ereignis nachweisbar war (Maschineneinstellung: „single cell purity“). Zusätzlich musste sich das positive Ereignis im Zentrum des Zieltropfens befinden (Maschineneinstellung: „droplet envelope = 0,5“). Pro Sortierrunde wurden jeweils Einzelzellen aus einem OTI-Matrix-Donor in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte sortiert. Acht aufeinanderfolgende Sortierungen erlaubten so die Zusammenstellung von acht OTI-Matrix-Zellen pro Vertiefung (je eine mit Matrix-Phänotyp A-H).

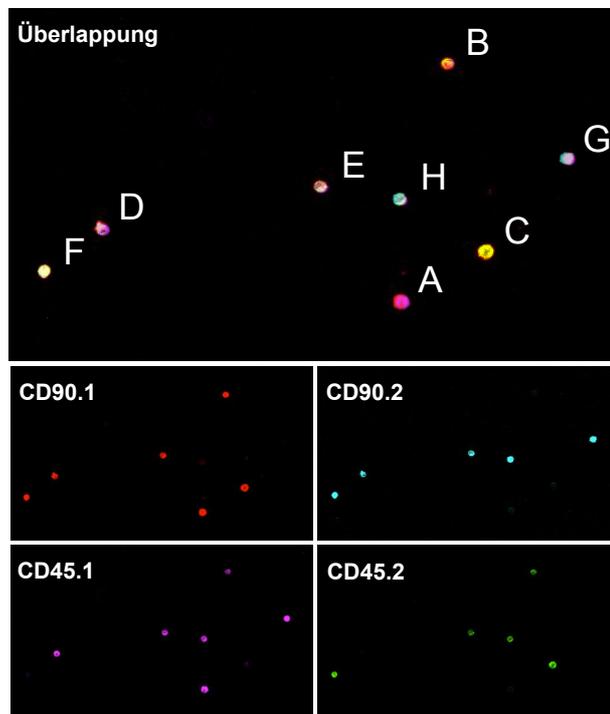


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie bestätigt die erfolgreiche Zusammenstellung von acht Zellen der kongenen Phänotypen A-H mittels repetitiver Einzelzellsortierung.

Immunfluoreszenzfärbung mit α CD45.1 (violett), α CD45.2 (grün), α CD90.1 (rot) und α CD90.2 (blau) von $CD8^+ CD44^{low}$ Zellen, die einzeln aus peripherem Blut von OTI-Matrix-Donoren (A-H) sortiert wurden. Die Zusammenstellung erfolgte auf einem Objektträger innerhalb eines Areal von etwa $400 \times 200\mu m$ Kantenlänge.

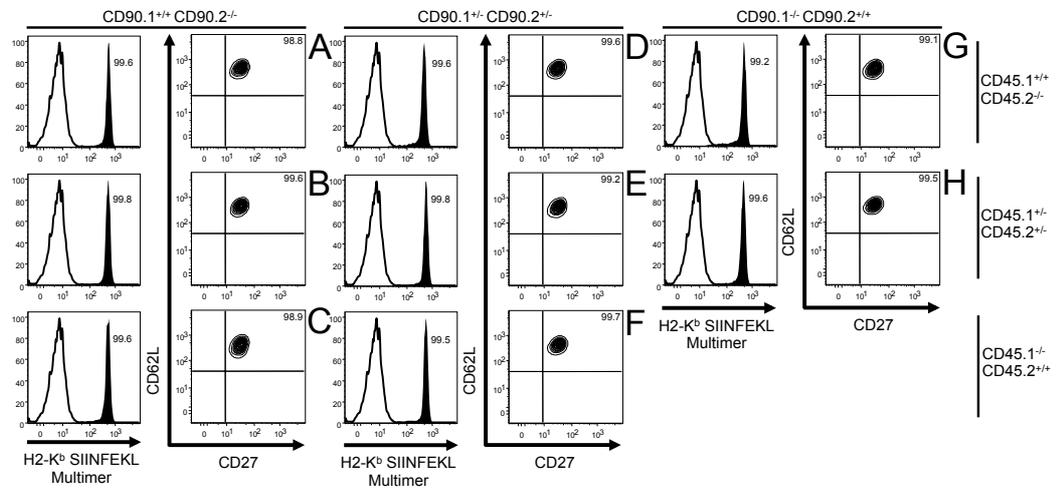


Abbildung 7: CD8⁺ CD44^{low} Zellen aus OTI-Matrix-Donoren zeigen eine homogene TCR-Expression und einen naiven Oberflächenphänotypen.

CD8⁺ CD44^{low} Zellen wurden gefärbt mit H2K^b-SIINFEKL-Multimeren sowie Antikörpern gegen CD27 und CD62L. Die weißen Histogramme zeigen die Färbung mit H2K^b-SIINFEKL-Multimer in C57BL/6-Mäusen. Die schwarzen Histogramme und ‚Contour‘-Diagramme zeigen Färbungen aus dem peripheren Blut der OTI-Matrix-Donoren (A-H). Die nebengestellten Zahlen geben den Prozentsatz H2K^b-SIINFEKL-Multimer bzw. CD27 und CD62L- positiver Zellen an.

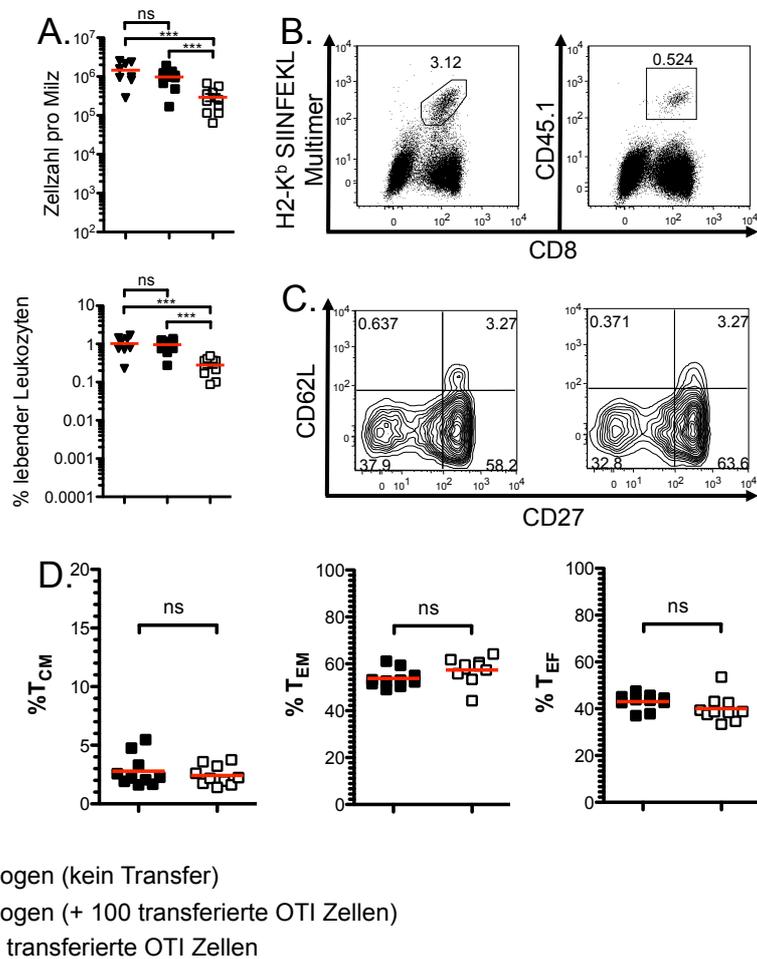


Abbildung 8: Kleine Zahlen adoptiv transferierter OTI-Zellen interferieren nicht mit der Expansion der endogenen SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Population und zeigen ein mit diesen vergleichbares Differenzierungsmuster.

(A-D) SIINFEKL-spezifische endogene CD8⁺ T-Zellen und exogene CD8⁺ T-Zellen, die von 100 transferierten OTI CD45.1^{+/+} Zellen abstammten, wurden an Tag acht nach Infektion mit 5×10^3 kbE L.m.-OVA in der Milz detektiert. (A) Absolute und relative Größe der OTI-Population (weiße Rechtecke) sowie der endogenen SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Population mit (schwarze Rechtecke) und ohne (schwarze Dreiecke) begleitenden Transfer von 100 OTI-Zellen. Linien zeigen den Mittelwert an. (B) Die repräsentativen ‚dot‘-Diagramme zeigen die relative Größe (als % lebender Leukozyten) der endogenen SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Population und der exogenen OTI-Population im gleichen Rezipienten. (C) ‚Contour‘-Diagramme zeigen die CD27 und CD62L Expression von Populationen aus B. (D) Prozent an CD27⁺ CD62L⁺ T_{CM}, CD27⁺ CD62L⁻ T_{EM} und CD27⁻ CD62L⁻ T_{EF} in endogenen SIINFEKL-spezifischen T-Zell-Populationen und OTI-Populationen. Linien zeigen den Mittelwert an.

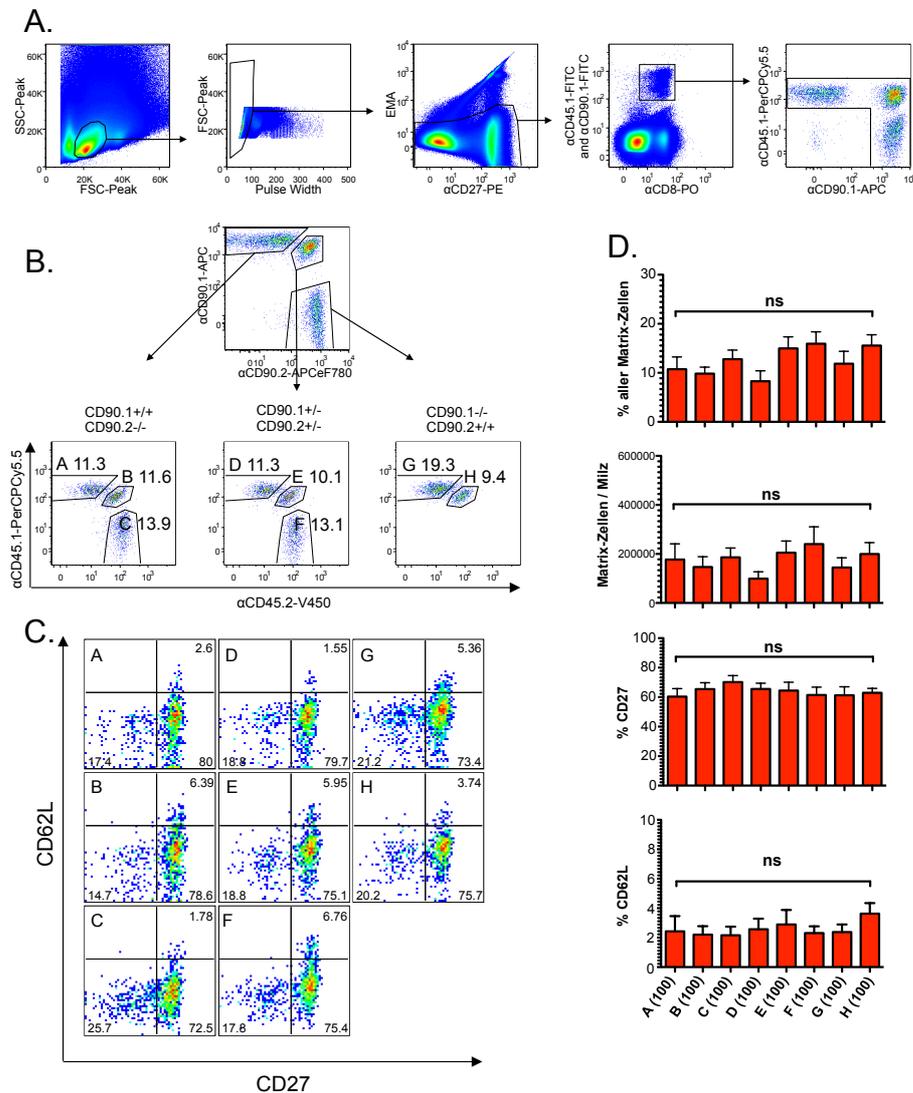


Abbildung 9: Populationen von je 100 OTI-Matrix-Zellen, gewonnen aus den acht verschiedenen Donorlinien, zeigen vergleichbare Expansion und Diversifikation in Effektor- und Gedächtnissubgruppen.

(A-D) In der Milz detektierte Nachkommen acht Tage nach i.p. Transfer von je 100 $CD8^+ CD44^{low}$ Zellen aus OTI-Matrix-Donoren A-H („8x100 Transfer“) und Infektion mit 5×10^3 kbE L.m.-OVA. (A-C) Die ‚pseudocolor‘-Diagramme stellen die verwendeten monoklonalen Antikörperfärbungen und die eingesetzte hierarchische ‚gating‘-Strategie dar, welche zur Detektion der Matrixkomponenten und der Evaluation ihrer CD27- und CD62L-Expression genutzt wurden. (A) Von links nach rechts: ‚Gating‘ auf Lymphozyten; Einzelzellen (Doubletten-Entfernung); lebende Zellen (EMA negative Zellen); $\alpha CD45.1$ -FITC und/oder $\alpha CD90.1$ -FITC positive Zellen; $\alpha CD45.1$ -PerCPCy5.5 und/oder $\alpha CD90.1$ -APC positive Zellen (Anmerkung: Die redundante Färbung mit $\alpha CD45.1$ -PerCPCy5.5 und $\alpha CD90.1$ -APC entfernt falsch positive Ereignisse

aus der α CD45.1-FITC und/oder α CD90.1-FITC positiven Population). **(B)** Von oben nach unten und links nach rechts: Auftrennung in „CD90.1/CD90.1“, „CD90.1/CD90.2“ und „CD90.2/CD90.2“- positive Populationen und weitere Auftrennung in „CD45.1/CD45.1“, „CD45.1/CD45.2“ und „CD45.2/CD45.2“- positive Populationen. Die Buchstaben A-H bezeichnen die acht OTI-Matrix-Populationen, die nebenstehenden Zahlen den prozentualen Anteil der jeweiligen Population an der Gesamtgröße aller. (Anmerkung: Eine vollständig gleiche Expansion aller Populationen würde zu einem jeweiligen Anteil einer Population von 12,5% führen ($100\% / 8 = 12,5\%$)). **(C)** ‚Pseudocolor‘-Diagramme der CD27- und CD62L-Expression in den OTI-Matrix-Populationen A-H. Nebenstehende Zahlen geben den Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten an. **(D)** Relative und absolute Größe aller OTI-Matrix- Populationen sowie Prozentsatz der CD27- bzw. CD62L-positiven Zellen innerhalb dieser Populationen nach „8x100 Transfer“. Säulen geben den Mittelwert, Fehlerbalken den SEM an. Zahl der Rezipienten n=9.

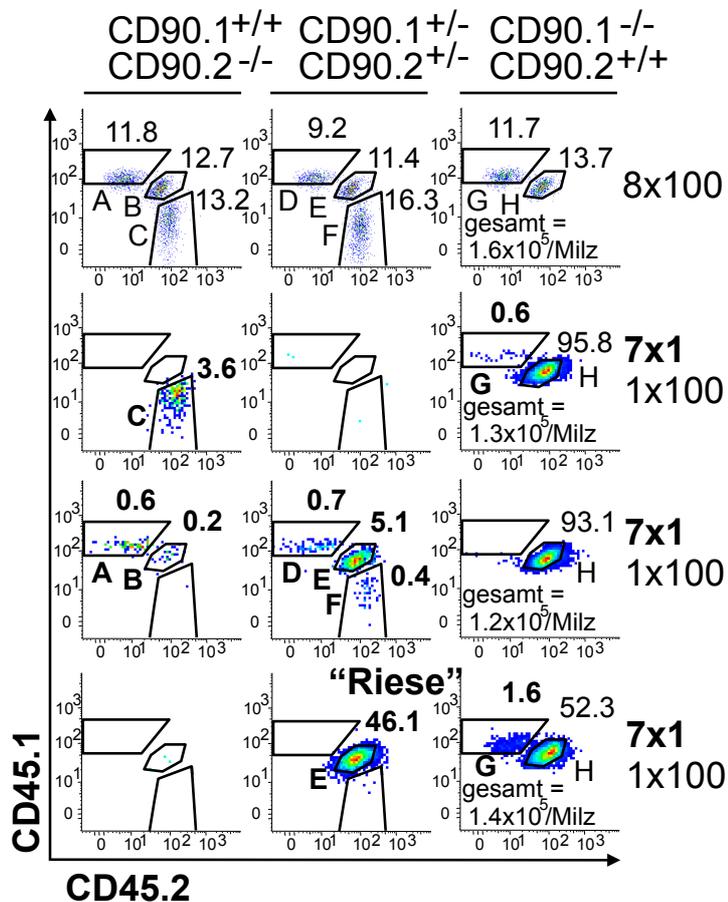


Abbildung 10: Nachkommen die von einer oder 100 OTI-Matrix-Zellen abstammen können an Tag zwölf nach Infektion durchflusszytometrisch detektiert werden.

In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach intraperitonealem (i.p.) Transfer von CD8⁺ OTI-Matrix-Zellen und intravenöser (i.v.) Infektion mit 5×10^3 (kbE) L.m.-OVA. Repräsentative „pseudocolor“-Diagramme von C57BL/6-Rezipienten, die 100 T-Zellen jedes Matrix-Phänotyps („8x100“ Transfer oberste Reihe) oder eine einzelne OTI-Zelle der Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7x1+100“ Transfer; untere Reihen) erhalten hatten. Angegeben ist der prozentuale Anteil der detektierten 100er-Nachkommenschaften und T-Zell-Familien an der Gesamtzahl aller Nachkommen innerhalb eines Rezipienten („gesamt“).

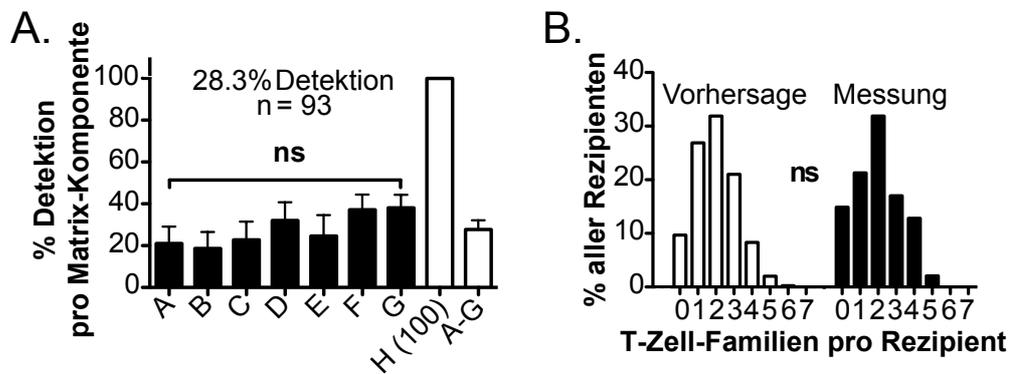


Abbildung 11: T-Zell-Familien der verschiedenen kongenen Phänotypen werden an Tag zwölf nach Infektion mit vergleichbarer Wahrscheinlichkeit detektiert.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach i.p. Transfer von CD8⁺ OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 (kbEs) L.m.-OVA. (A) Prozentuale Häufigkeit, in der nach Transfer von einer OTI-Zelle bzw. 100 OTI-Zellen eines bestimmten Matrix-Phänotypen (A-G bzw. H) eine entsprechende T-Zell-Familie bzw. 100er-Nachkommenschaft detektiert werden konnte. Insgesamt wurden n=93 T-Zell-Familien in 47 Rezipienten detektiert. Säulen zeigen den Mittelwert, Fehlerbalken den SEM an. (B) Vorhergesagte Binomialverteilung und gemessene Verteilung der pro Rezipient detektierten T-Zell-Familien (nach Transfer von n=7 Einzelzellen pro Rezipient und p=28,3% Wahrscheinlichkeit für die Detektion einer T-Zell-Familie pro Einzelzelle).

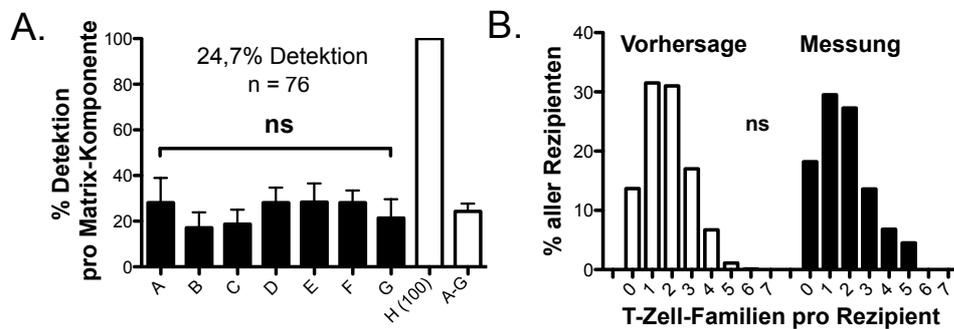


Abbildung 12: T-Zell-Familien der verschiedenen kongenen Phänotypen werden an Tag acht nach Infektion mit vergleichbarer Wahrscheinlichkeit detektiert.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien acht Tage nach i.p. Transfer von CD8⁺ OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 (kbEs) L.m.-OVA. (A) Prozentuale Häufigkeit, in der nach Transfer von einer OTI-Zelle bzw. 100 OTI-Zellen eines bestimmten Matrix-Phänotypen (A-G bzw. H) eine entsprechende T-Zell-Familie bzw. 100er-Nachkommenschaft detektiert werden konnte. Insgesamt wurden n=76 T-Zell-Familien in 44 Rezipienten detektiert. Säulen zeigen den Mittelwert, Fehlerbalken den SEM an. (B) Vorhergesagte Binomialverteilung und gemessene Verteilung der pro Rezipient detektierten T-Zell-Familien (nach Transfer von n=7 Einzelzellen pro Rezipient und p=24,7% Wahrscheinlichkeit für die Detektion einer T-Zell-Familie pro Einzelzelle).

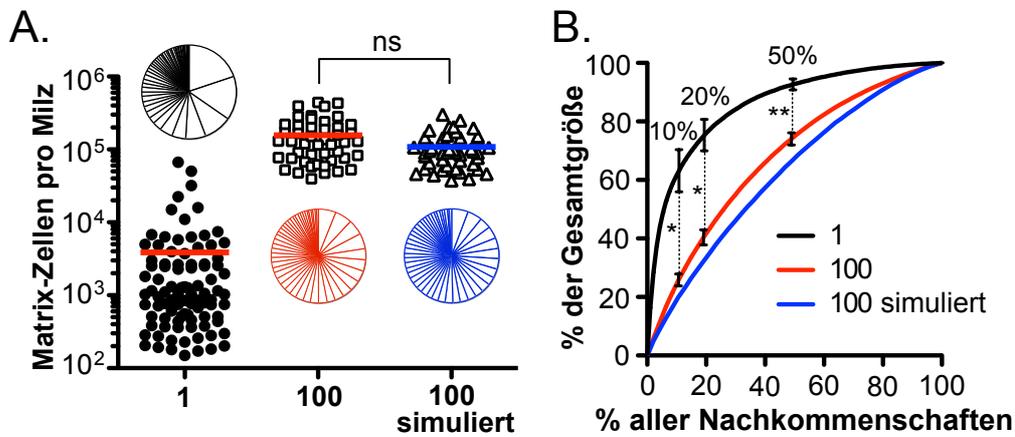


Abbildung 13: Die antigenabhängige Expansion von CD8⁺ T-Zell-Familien *in vivo* zeigt hohe Variabilität.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach intraperitonealem (i.p.) Transfer von CD8⁺ OTI-Matrix-Zellen und intravenöser (i.v.) Infektion mit 5×10^3 (kbE) L.m.-OVA. (A) Absolute Zahl der in der Milz detektierten Nachkommen, die aus einer (schwarze Punkte) (n=93) oder 100 OTI-Matrixzellen (weiße Rechtecke) (n=47) hervorgingen oder durch 28 zufällige Züge aus dem Einzelzelldatensatz als 100er-Populationen simuliert wurden (weiße Dreiecke). Linien zeigen den Mittelwert. Die Segmente der Kuchendiagramme geben den relativen Anteil einer Nachkommenschaft an der kumulativen Größe aller an. (B) Prozentualer Anteil an der kumulierten Gesamtgröße (y-Achse) aller T-Zell-Familien (schwarze Kurve), 100er-Populationen (rote Kurve) und simulierten 100er-Populationen (blaue Kurve), welcher durch einen bestimmten Prozentsatz (x-Achse) aller T-Zell-Familien, 100er-Populationen und simulierten 100er-Populationen generiert wird. Signifikante Unterschiede in der kumulierten Größe sind für Akkumulation der 10, 20 und 50% größten T-Zell-Familien und 100er-Populationen dargestellt. Fehlerbalken zeigen den SEM.

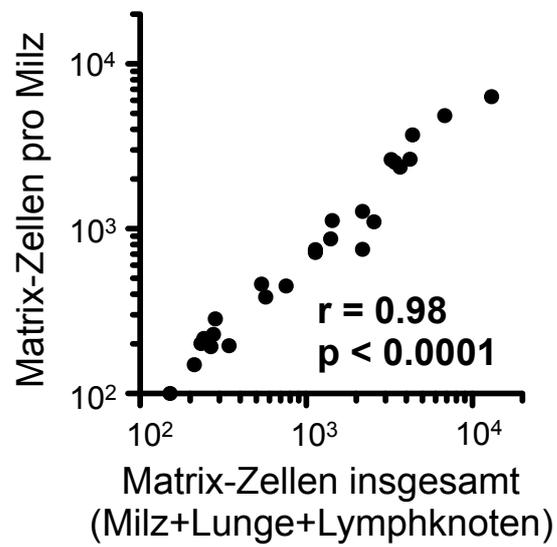


Abbildung 14: Die in der Milz detektierte Größe einer T-Zell-Familie korreliert eng mit ihrer aus Milz, Lymphknoten und Lunge bestimmten Gesamtgröße.

Darstellung der in der Milz detektierten Größe von T-Zell-Familien im Vergleich zu ihrer aus Milz, Lunge und Lymphknoten kumulierten Gesamtgröße. Analyse an Tag zwölf nach Einzelzelltransfer und Infektion mit 5×10^3 kbE L.m.-OVA.

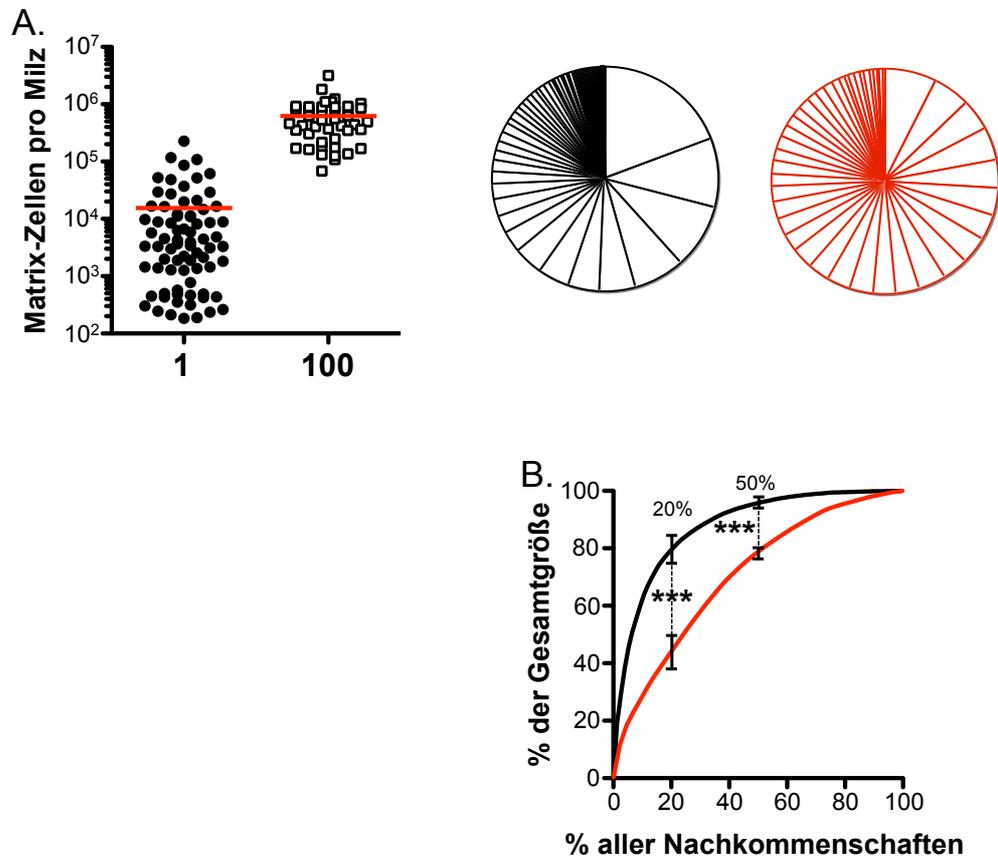


Abbildung 15: Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien ist bereits an Tag acht nach Infektion nachweisbar.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien acht Tage nach i.p. Transfer von $CD8^+ CD44^{low}$ OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 44 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („ $7 \times 1 + 100$ “ Transfer). (A) Absolute Zahl der in der Milz detektierten Nachkommen, die aus einer (schwarze Punkte) (n=76) oder 100 OTI-Matrixzellen (weiße Rechtecke) (n=44) hervorgingen. Linien zeigen den Mittelwert. Die Segmente der Kuchendiagramme geben den relativen Anteil einer Nachkommenschaft an der kumulativen Größe aller an. (B) Prozentualer Anteil an der kumulierten Gesamtgröße (y-Achse) aller T-Zell-Familien (schwarze Kurve) bzw. 100er-Populationen (rote Kurve), welcher durch einen bestimmten Prozentsatz (x-Achse) aller T-Zell-Familien bzw. 100er-Populationen generiert wird. Signifikante Unterschiede in der kumulierten Größe sind für Akkumulation der 20 und 50% größten T-Zell-Familien und 100er-Populationen dargestellt. Fehlerbalken zeigen den SEM.

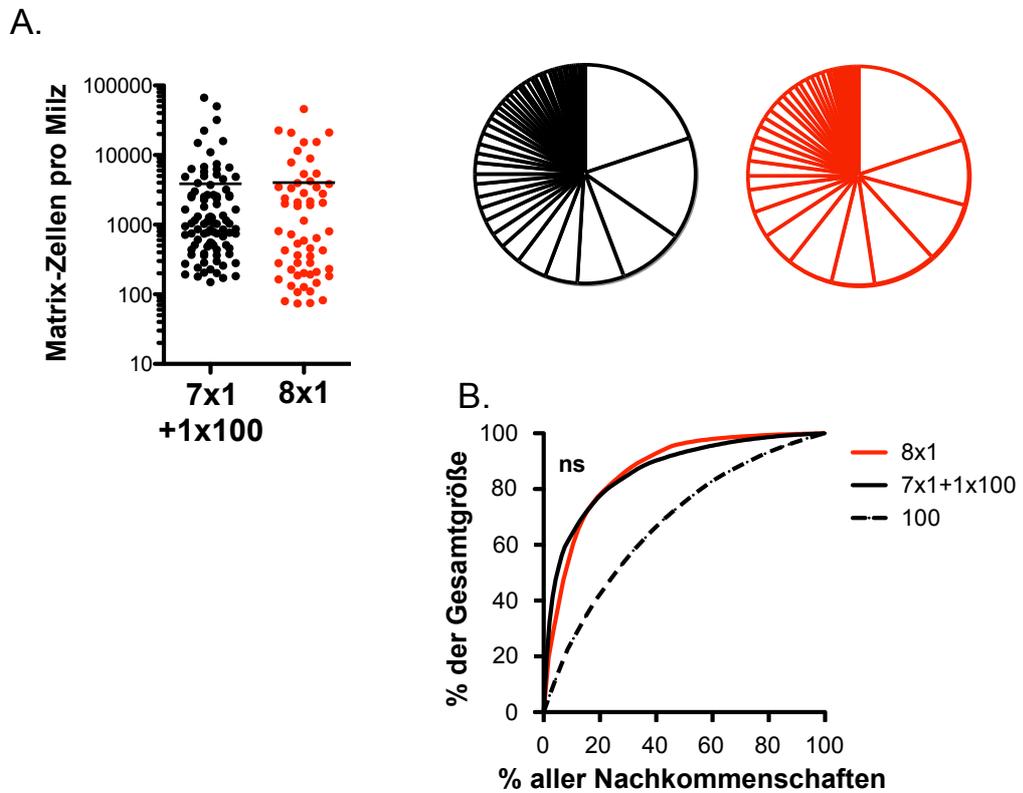


Abbildung 16: Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien bleibt auch in Abwesenheit der sonst mitgeführten 100er-Population erhalten.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien acht Tage nach i.p. Transfer von $CD8^+ CD44^{low}$ OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 44 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7x1+100“ Transfer). 30 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-H („8x1“ Transfer). (A) Absolute Zahl der in der Milz detektierten Nachkommen, die aus Einzelzellen in einem „7x1+100“ Transfer (schwarze Punkte) ($n=76$) oder einem „8x1“ Transfer (rote Punkte) ($n=57$) hervorgingen. Linien zeigen den Mittelwert. Die Segmente der Kuchendiagramme geben den relativen Anteil einer Nachkommenschaft an der kumulativen Größe aller an. (B) Prozentualer Anteil an der kumulierten Gesamtgröße (y-Achse) aller T-Zell-Familien (schwarze und rote Kurve) bzw. 100er-Populationen (gestrichelte Kurve), welcher durch einen bestimmten Prozentsatz (x-Achse) aller T-Zell-Familien bzw. 100er-Populationen generiert wird. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen T-Zell-Familien, die aus „7x1+100“ und „8x1“ Transfers hervorgegangen waren.

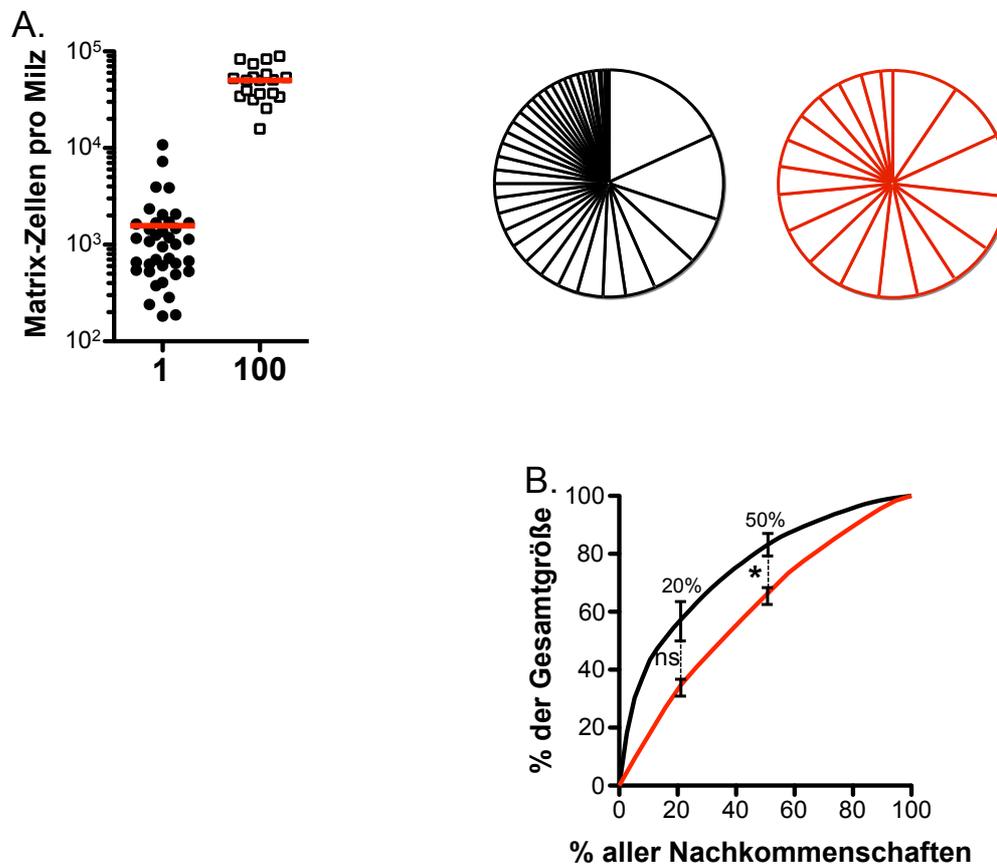


Abbildung 17: Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien tritt auch nach systemischer viraler Infektion auf.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien acht Tage nach i.p. Transfer von $CD8^+ CD44^{low}$ OTI-Matrix-Zellen und i.p. Infektion mit 1×10^6 plaqueformenden Einheiten (pfEs) VACV-OVA. 19 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („ $7 \times 1 + 100$ “ Transfer). (A) Absolute Zahl der in der Milz detektierten Nachkommen, die aus einer (schwarze Punkte) ($n=38$) oder 100 OTI-Matrixzellen (weiße Rechtecke) ($n=19$) hervorgingen. Linien zeigen den Mittelwert. Die Segmente der Kuchendiagramme geben den relativen Anteil einer Nachkommenschaft an der kumulativen Größe aller an. (B) Prozentualer Anteil an der kumulierten Gesamtgröße (y-Achse) aller T-Zell-Familien (schwarze Kurve) bzw. 100er-Populationen (rote Kurve), welcher durch einen bestimmten Prozentsatz (x-Achse) aller T-Zell-Familien bzw. 100er-Populationen generiert wird. Signifikante Unterschiede in der kumulierten Größe sind für Akkumulation der 20 und 50% größten T-Zell-Familien und 100er-Populationen dargestellt. Fehlerbalken zeigen den SEM.

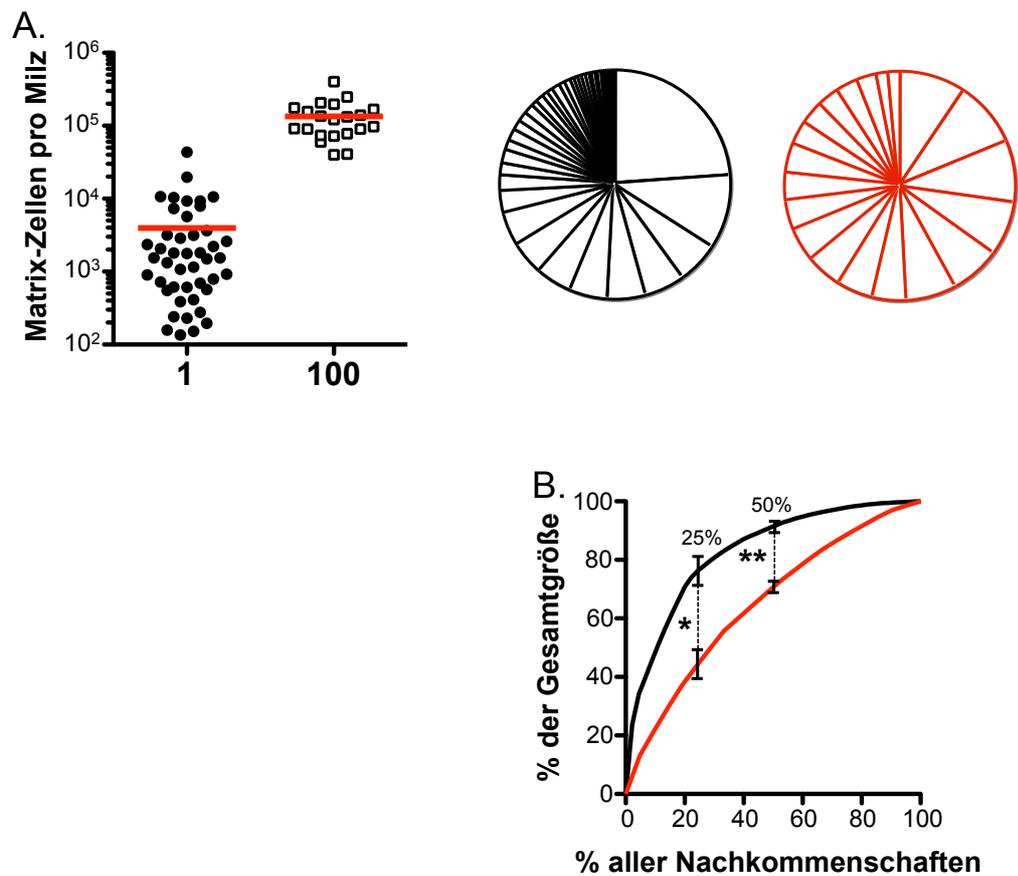


Abbildung 18: Die variable Expansion der OTI-T-Zell-Familien ist nicht durch die Expression zusätzlicher TCRs bedingt.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach i.p. Transfer von $CD8^+ CD44^{low} RAG1^{-/-}$ OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 21 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7×1+100“ Transfer). (A) Absolute Zahl der in der Milz detektierten Nachkommen, die aus einer (schwarze Punkte) ($n=45$) oder 100 OTI-Matrixzellen (weiße Rechtecke) ($n=21$) hervorgingen. Linien zeigen den Mittelwert. Die Segmente der Kuchendiagramme geben den relativen Anteil einer Nachkommenschaft an der kumulativen Größe aller an. (B) Prozentualer Anteil an der kumulierten Gesamtgröße (y-Achse) aller T-Zell-Familien (schwarze Kurve) bzw. 100er-Populationen (rote Kurve), welcher durch einen bestimmten Prozentsatz (x-Achse) aller T-Zell-Familien bzw. 100er-Populationen generiert wird. Signifikante Unterschiede in der kumulierten Größe sind für Akkumulation der 25 und 50% größten T-Zell-Familien und 100er-Populationen dargestellt. Fehlerbalken zeigen den SEM.

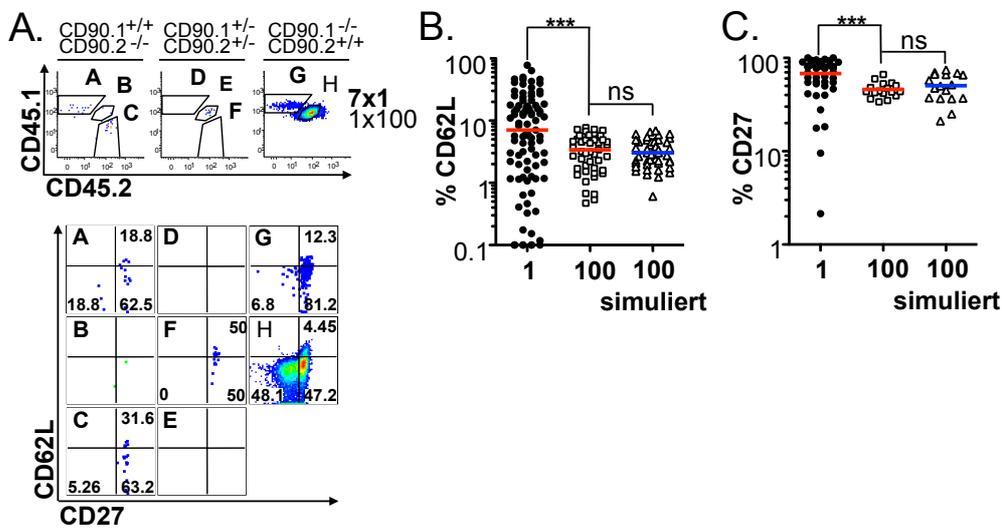


Abbildung 19: In T-Zellfamilien ist der relative Anteil von Nachkommen mit gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp an Tag zwölf nach Infektion im Mittel höher als in 100er-Populationen.

(A-C) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach i.p. Transfer von CD8⁺ CD44^{low} OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 47 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7x1+100“ Transfer). (A) Repräsentative „pseudocolor“-Diagramme zeigen Größe sowie CD27 und CD62L-Phänotyp der in einem Rezipienten detektierten T-Zell-Familien und der mitgeführten 100er-Population. (B) Prozentsatz CD62L-positiver Zellen in T-Zell-Familien (schwarze Punkte) (n=93), 100er-Populationen (weiße Quadrate) (n=47) und simulierten 100er-Populationen (weiße Dreiecke). (C) Wie B, nur für Prozentsatz CD27-positiver Zellen.

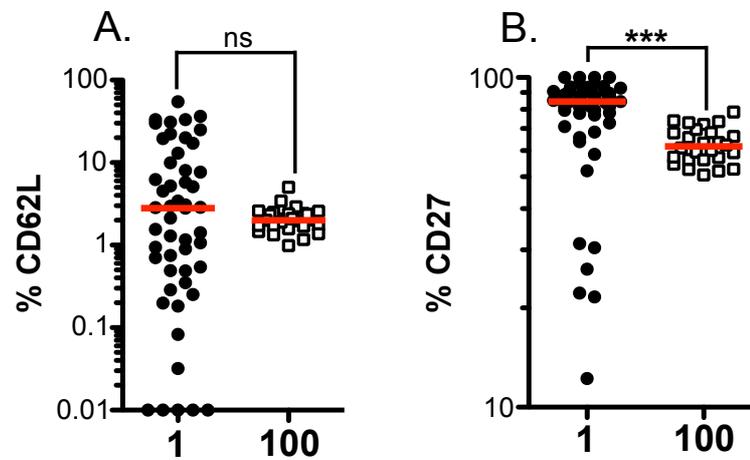


Abbildung 20: In T-Zellfamilien ist der relative Anteil von Nachkommen mit gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp an Tag acht nach Infektion im Mittel höher als in 100er-Populationen.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien acht Tage nach i.p. Transfer von CD8⁺ CD44^{low} OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 44 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7×1+100“ Transfer). (A) Prozentsatz CD62L-positiver Zellen in T-Zell-Familien (schwarze Punkte) (n=76) und 100er-Populationen (weiße Quadrate) (n=44) (B) Wie A, nur für Prozentsatz CD27-positiver Zellen.

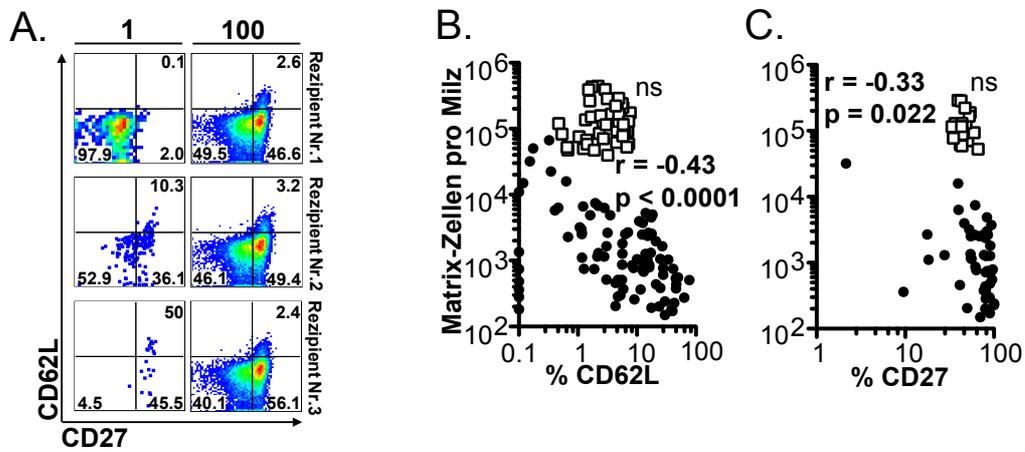


Abbildung 21: Der relative Anteil an T-Zellen mit gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp nimmt in expandierenden T-Zell-Familien ab.

(A-C) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach i.p. Transfer von CD8⁺ CD44^{low} OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 47 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7×1+100“ Transfer). (A) Repräsentative ‚pseudocolor‘-Diagramme, welche den CD27-CD62L-Phänotypen großer bis kleiner T-Zell-Familien und den der jeweils mitgeführten 100er-Populationen zeigen. (B) Korrelation der Größe und des Prozentsatzes CD62L-positiver Zellen in T-Zell-Familien (schwarze Punkte) und 100er-Populationen (weiße Quadrate). (C) Wie in B, aber bezogen auf den Prozentsatz CD27-positiver Zellen.

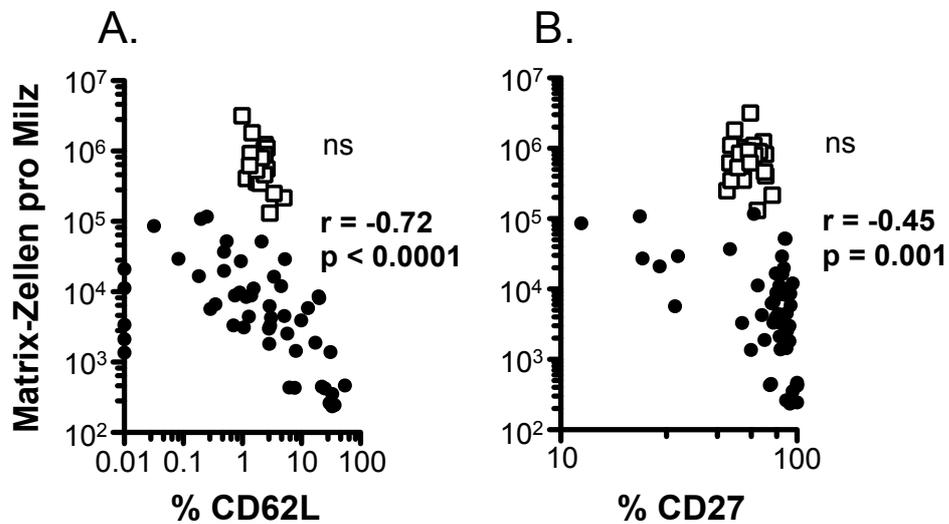


Abbildung 22: Die inverse Korrelation von Größe und gedächtnistypischem Oberflächenphänotyp einer T-Zell-Familie ist bereits an Tag acht nach Infektion nachweisbar.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien acht Tage nach i.p. Transfer von $CD8^+ CD44^{low}$ OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 44 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („ $7 \times 1 + 100$ “ Transfer). (A) Korrelation der Größe und des Prozentsatzes CD62L-positiver Zellen in T-Zell-Familien (schwarze Punkte) und 100er-Populationen (weiße Quadrate). (B) Wie in A, aber bezogen auf den Prozentsatz CD27-positiver Zellen.

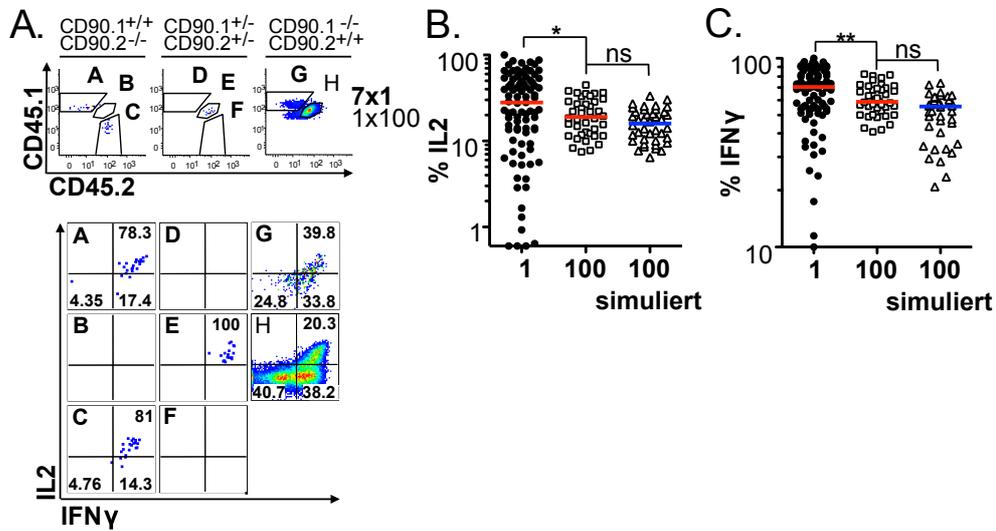


Abbildung 23: In T-Zellfamilien ist der relative Anteil von Nachkommen mit gedächtnistypischer Zytokinexpression im Mittel höher als in 100er-Populationen.

(A-C) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach i.p. Transfer von CD8⁺ CD44^{low} OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 47 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7x1+100“ Transfer). (A) Repräsentative „pseudocolor“-Diagramme zeigen Größe sowie IL-2 und IFN- γ Phänotyp der in einem Rezipienten detektierten T-Zell-Familien und der mitgeführten 100er-Population. (B) Prozentsatz IL-2-positiver Zellen in T-Zell-Familien (schwarze Punkte) (n=93), 100er-Populationen (weiße Quadrate) (n=47) und simulierten 100er-Populationen (weiße Dreiecke). (C) Wie B, nur für Prozentsatz IFN- γ -positiver Zellen.

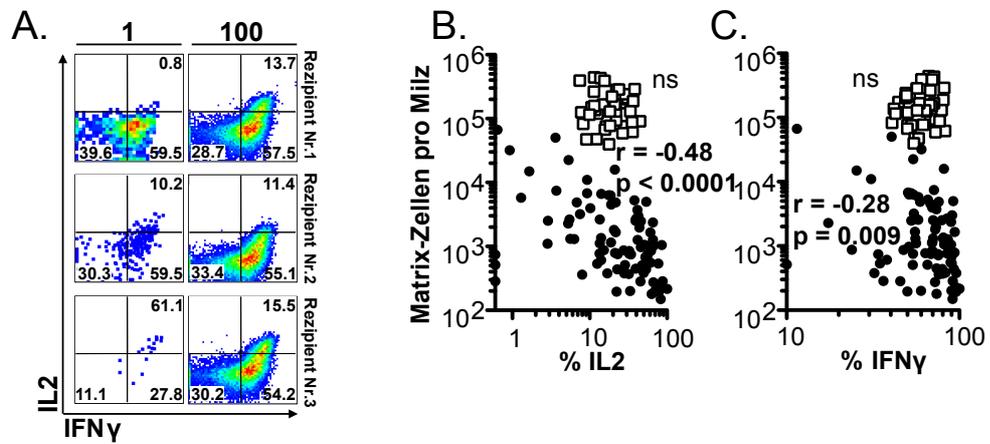


Abbildung 24: Der relative Anteil an T-Zellen mit gedächtnistypischer Zytokinexpression nimmt in expandierenden T-Zell-Familien ab.

(A-C) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach i.p. Transfer von CD8⁺ CD44^{low} OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 47 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („7x1+100“ Transfer). (A) Repräsentative „pseudocolor“-Diagramme, welche den IL2-IFN- γ -Phänotypen großer bis kleiner T-Zell-Familien und den der jeweils mitgeführten 100er-Populationen zeigen. (B) Korrelation der Größe und des Prozentsatzes IL-2-positiver Zellen in T-Zell-Familien (schwarze Punkte) und 100er-Populationen (weiße Quadrate). (C) Wie in B, aber bezogen auf den Prozentsatz IFN- γ -positiver Zellen.

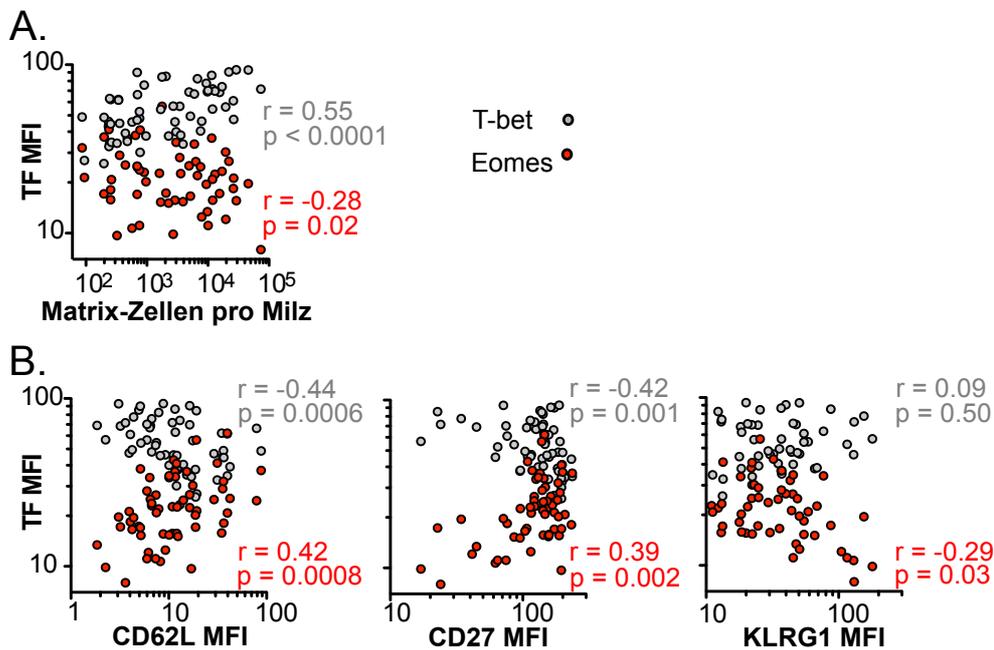


Abbildung 25: Der relative Anteil an T-Zellen mit gedächtnistypischer Transkriptionsfaktorexpression nimmt in expandierenden T-Zell-Familien ab.

(A-B) In der Milz detektierte T-Zell-Familien zwölf Tage nach i.p. Transfer von $CD8^+ CD44^{low}$ OTI-Matrix-Zellen und i.v. Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. 47 C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („ $7 \times 1 + 100$ “ Transfer). Dargestellt ist die Korrelation der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) für Eomes (rote Punkte) und T-bet (graue Punkte) mit (A) der Größe der jeweiligen T-Zell-Familie, (B) ihrem MFI für CD62L, CD27 oder KLRG1.

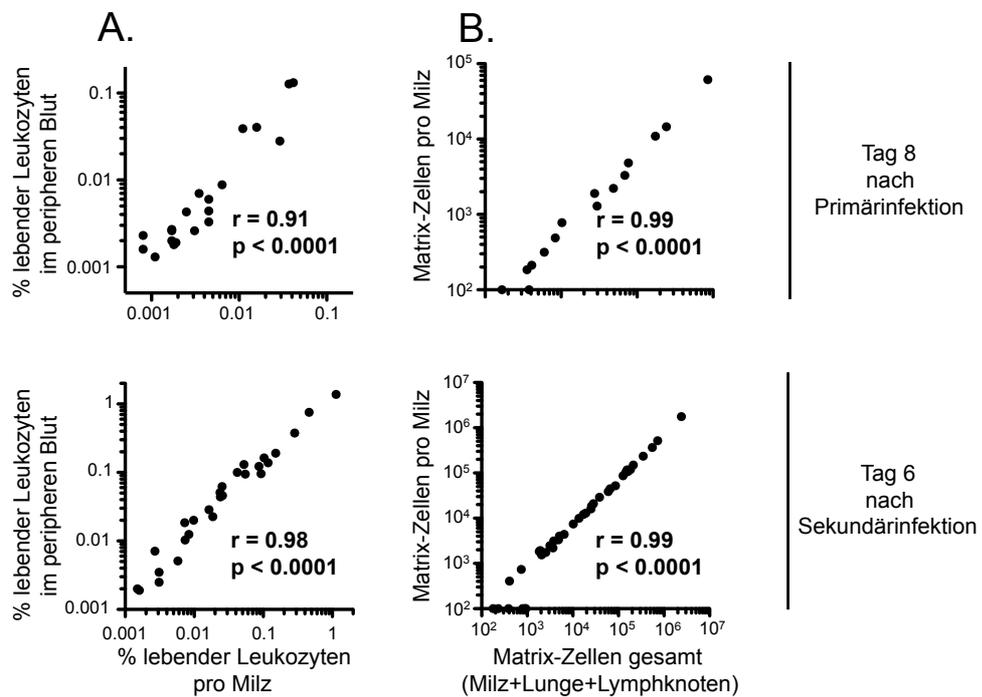


Abbildung 26: Während der Primär- und Sekundärexpansion korreliert die im peripheren Blut detektierte Größe einer T-Zell-Familie eng mit ihrer aus Milz, Lymphknoten und Lunge bestimmten Gesamtgröße.

(A-C) C57BL/6-Rezipienten erhielten je eine Zelle der OTI-Matrix-Phänotypen A-G und 100 des Phänotyps H („ $7 \times 1 + 100$ “ Transfer) und wurden nachfolgend i.v. mit 5×10^3 kbE L.m.-OVA infiziert. Acht Tage später wurden T-Zell-Familien im Blut detektiert. Die gleichen Rezipienten erhielten mehr als 35 Tage nach Primärinfektion eine i.v. Sekundärinfektion mit 1×10^5 kbE L.m.-OVA. Sechs Tage nach Sekundärinfektion wurden die T-Zell-Familien erneut im Blut detektiert. Mehr als 200 Tage nach Primärinfektion erhielten alle vorhandenen Rezipienten eine Tertiärinfektion mit 1×10^8 pfE MVA-OVA i.v. Sechs Tage nach Sekundärinfektion wurden die T-Zell-Familien erneut im Blut detektiert. (A) Repräsentative „pseudocolor“-Diagramme zeigen die Größe der in einem Rezipienten detektierten T-Zell-Familien und der mitgeführten 100er-Population. Angegeben ist der prozentuale Anteil der detektierten 100er-Populationen und T-Zell-Familien an der Gesamtzahl der Nachkommen in der Blutprobe eines Rezipienten. (B-C) Korrelation der Primär- und Sekundärexpansion (B) sowie Sekundär- und Tertiärexpansion (C) detektierte T-Zell-Familien. Die jeweils größte T-Zell-Familie der Primär-, Sekundär- bzw. Tertiärantwort wurde auf 100 % gesetzt, die restlichen T-Zell-Familien entsprechend skaliert. Die rote Linie zeigt eine log-log-Regression.

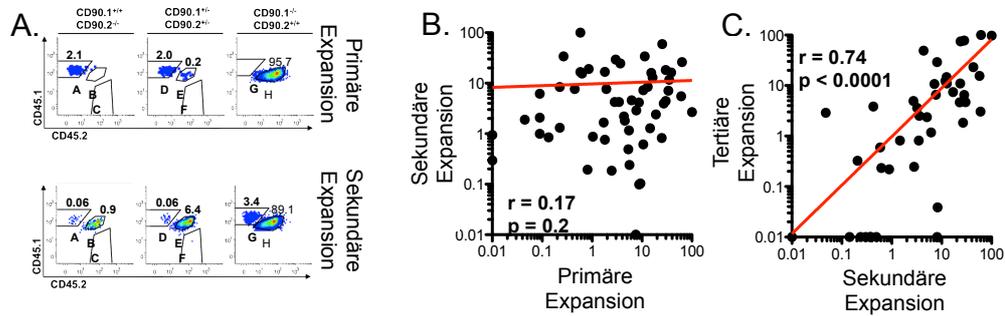


Abbildung 27: Die Primärexpansion einer T-Zell-Familie ist ein schlechter Prädiktor für ihre Fähigkeit zur Sekundärexpansion.

(A) Korrelation der relativen Größe von T-Zell-Familien in Blut und Milz an Tag acht nach Einzelzelltransfer und Infektion mit 5×10^3 kbEs L.m.-OVA. (B) Korrelation der absoluten Größe von T-Zell-Familien in der Milz im Vergleich zu ihrer aus Milz, Lunge und Lymphknoten kumulierten Gesamtgröße. Analyse an Tag sechs nach Sekundärinfektion mit 1×10^5 kbE L.m.-OVA. Die Sekundärinfektion erfolgte mehr als 35 Tage nach Primärinfektion und adoptivem Einzelzelltransfer.

5. Diskussion

5.1. Protektion und Gedächtnis: eine doppelte Herausforderung

Während einer T-Zell-Immunantwort gegen ein Pathogen werden jene T-Zellen selektiert, die mit diesem Pathogen assoziierte Epitope über ihren TCR erkennen. In den Tagen nach der Pathogenexposition kommt es zu einer massiven, etwa 10000-fachen Vermehrung dieser epitopspezifischen T-Zellen (Williams und Bevan, 2007). Diese Expansion geht von wenigen T_N aus. In der Maus wird deren Anzahl pro Epitop auf etwa 50 bis 500 Zellen geschätzt (Moon et al., 2007; Obar et al., 2008). Diese Zahl erscheint besonders eindrucksvoll, wenn man berücksichtigt, dass im murinen adaptiven Immunsystem insgesamt etwa 1×10^8 naive T-Zellen zur Verfügung stehen (Casrouge et al., 2000). Die Verteidigung gegen einen spezifischen Erreger, aber auch die Immunantwort nach einer Impfung, geht also nur von einem Bruchteil aller T-Zellen aus. Im Rahmen einer Infektion muss eine solche epitopspezifische T-Zell-Population zwei wesentliche Herausforderungen bewältigen: Sie muss sich erstens rasch genug vervielfältigen, um ausreichend Nachkommen für die akute Verteidigung des Organismus bereitzustellen. Bei $CD8^+$ T-Zellen gilt diese Prämisse umso mehr, da die durch sie vermittelte Protektion zu wesentlichen Teilen auf der spezifischen Abtötung infizierter Wirtszellen beruht. Diese erfordert direkte Zell-Zell-Kontakte mit jeder infizierten Zelle und damit eine ausreichend hohe Zahl an epitopspezifischen $CD8^+$ T-Zellen.

Die zweite Herausforderung an die epitopspezifische T-Zell-Population besteht darin, sich während der Expansion in Subgruppen kurz- und langlebiger Nachkommen aufzuteilen. Diese Diversifikation ermöglicht einerseits die notwendige Populationskontraktion nach erfolgreicher Elimination des Erregers und andererseits den Erhalt einer im Vergleich zum naiven Repertoire vergrößerten Gedächtnispopulation. In der Regel sind Expansion sowie Diversifikation in robust regulierter Weise an das Infektionsgeschehen angepasst. So kommt es bei gleicher Infektion verschiedener Individuen unter kontrollierten Experimentalbedingungen in der Regel zu sehr vergleichbaren Expansions- und Diversifikationsmustern der epitopspezifischen T-Zell-Population (Zehn et al., 2009). Es war das Ziel der hier

vorliegenden Dissertation zu klären, auf welcher Organisationsebene einer adaptiven Immunantwort dieses robuste Verhältnis von „Infektionsinput“ und „immunologischem Output“ garantiert wird.

5.2. Klassischer Einzelzelltransfer und kongene Matrix

Der dazu verwendete Ansatz wurde im Labor von Professor Dirk Busch am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München entwickelt und beruht auf dem adoptiven Transfer einer einzelnen kongen markierten TCR-transgenen CD8⁺ T-Zelle. Dieser innovative Ansatz hat bereits erste Einblicke in das Entwicklungspotential einzelner CD8⁺ T-Zellen *in vivo* ermöglicht (Stemberger et al., 2007). Die Beobachtung einer für die Zusammensetzung physiologischer Immunantworten repräsentativen Anzahl von T-Zell-Familien wäre mit diesem Ansatz jedoch nur unter großem Material- und Versuchstieraufwand möglich gewesen. Denn, wie auch die vorliegende Arbeit bestätigt, liegt die Wahrscheinlichkeit dafür, Nachkommen einer einzeln transferierten OTI-Zelle zu detektieren, bei nur etwa 25% (Stemberger et al., 2007) (Abb. 11A und 12A). Dies bedeutet, dass bei klassischem Einzelzelltransfer nur etwa jedes vierte Empfängertier überhaupt zur Analyse genutzt werden kann. Die hier erstmals durchgeführte multiple Einzelzellsortierung aus bis zu acht kongenen OTI-Matrix-Donoren erhöht diese Effizienz deutlich. Bei Durchführung eines „7×1+100 Transfers“ steigt der Anteil erfolgreicher Einzelzelltransfers auf nahezu neun von zehn (Abb. 11B und 12B). Der Anteil an Rezipienten mit mindestens zwei detektierbaren T-Zell-Familien erreicht im gleichen Ansatz mindestens 50% (Abb. 11B und 12B). Dieser experimentelle Aufbau ermöglicht also erstmals den direkten Vergleich individueller T-Zell-Familien im gleichen Rezipienten (Abb. 10) sowie einer großen Anzahl von T-Zell-Familien über viele Rezipienten hinweg (z.B. Abb. 13A). Er erleichtert außerdem die Interpretation von Einzelzellphänomenen durch das Mitführen einer aus vielen T-Zellen hervorgegangenen Kontrollpopulation (100er-Population) (z.B. Abb. 10 und 13).

5.3. Robustheit wird auf Populationsebene realisiert

OTI-Matrix-Transfers gefolgt von bakterieller oder viraler Infektion zeigten, dass T-Zell-Familien, welche von einzelnen naiven OTI-Zellen abstammen, ein – aus populationsbasierten Experimenten nicht ableitbares – Expansions- und Diversifikationsmuster an den Tag legen. So werden mehr als 50% der Gesamtgröße einer Immunantwort von weniger als 5% aller rekrutierten Einzelzellen generiert (z.B. Abb. 13B). Die Gesamtgröße der Immunantwort ergibt sich hierbei aus der Kumulation der Größen aller T-Zell-Familien, die in der entsprechenden Experimentalreihe gefunden wurden. Da diese Kumulation über viele Rezipienten hinweg erfolgte, kann der Schluss, dass sie die tatsächliche Zusammensetzung einer populationsbasierten Immunantwort innerhalb eines Rezipienten korrekt wiedergibt, nicht zwanglos erfolgen. Die gemessene mittlere Größe der 100er-Populationen sowie die Schiefe ihrer Größenverteilung weichen jedoch nur unwesentlich von den durch mathematische Simulation aus T-Zell-Familien rekonstruierten Werten ab (Abb. 13). Dies erlaubt die Annahme, dass trotz Kumulation aus mehreren Rezipienten die tatsächliche Familienstruktur einer populationsbasierten Antwort korrekt wiedergegeben wird. Diese Annahme wird weiter untermauert durch deckungsgleiche Resultate von Gerlach et al., welche mittels genetischem „Barcoding“ die Entwicklung von mehr als 100 OTI-T-Zell-Familien im gleichen Rezipienten nach L.m.-OVA-Infektion aufschlüsseln. Auch dieser Datensatz zeigt ausgesprochene Größenvariabilität und die deutliche Dominanz weniger, sehr großer T-Zell-Familien (Gerlach et al., 2013). Um die Größe einer T-Zell-Familie mittels genetischem „Barcoding“ präzise zu bestimmen, muss die Frequenz eines bestimmten Barcodes in der Gesamtheit aller Nachkommen ermittelt werden. Dies erfordert DNS-Sequenzierungsmethoden der zweiten Generation, welche mit der gleichzeitigen Analyse phänotypischer Charakteristika auf Einzelzellebene nicht vereinbar sind. Demgegenüber erlaubt der OTI-Matrix-Ansatz neben der Quantifizierung der Anzahl auch die durchflusszytometrische Analyse der phänotypischen Charakteristika der kongen markierten Nachkommen einer T-Zelle. Die gleichzeitige Analyse der Expansionsgröße und des phänotypischen Diversifikationsmusters von T-Zell-Familien zeigte, dass beide Parameter eng miteinander verknüpft sind. So fand sich in

den seltenen großen T-Zell-Familien ein deutlich geringerer Prozentsatz an T-Zellen mit gedächtnistypischem Phänotyp als in den häufig auftretenden kleinen. Durch Kumulation dieser in Größe und Phänotyp kovariierenden T-Zell-Familien konnte das Erscheinungsbild der gemessenen 100er-Populationen rekonstruiert werden (Abb. 19B-C und Abb. 23B-C), was erneut für die physiologische Relevanz dieser Einzelzellbeobachtungen spricht. Weiterhin zeigte die funktionelle Überprüfung der Gedächtnisfähigkeit von T-Zell-Familien keine signifikante Korrelation von Primär- und Sekundärexpansion (Abb. 27B), jedoch eine deutliche positive Korrelation von Sekundär- und Tertiärexpansion (Abb. 27C). Dies legt nahe, dass die absolute Zahl zukünftiger Gedächtniszellen weitgehend unabhängig von der Größe der Primärexpansion bestimmt wird.

Weiterhin scheint sich die primäre Variabilität an erzeugten Gedächtniszellen stabil in Sekundär- und Tertiärexpansion fortzusetzen. Die auf Einzelzellebene entstandene Inhomogenität prägt also auch die langfristige Struktur des immunologischen Gedächtnisses. In der Summe zeigen diese Beobachtungen klar, dass die sinnvolle Anpassung von CD8⁺ T-Zell-Immunantworten an das Infektionsgeschehen erst durch Rekrutierung mehrerer einzelner T-Zellen möglich wird. Im Sinne der Fragestellung dieser Dissertation wird also die Robustheit der Expansions- und Diversifikationsprozesse einer CD8⁺ T-Zell-Immunantwort populationsbasiert und nicht einzelzellbasiert garantiert. Interessant ist, dass vergleichbare populationsbasierte Strategien auch für die Sicherung des homöostatischen Gleichgewichts zwischen adulten Gewebstammzellen und ihren kurzlebigen Nachkommen verantwortlich gemacht werden. Auch hier etablieren zwar alle Stammzellen gemeinsam ein robustes Gleichgewicht, die einzelne Stammzelle erzeugt jedoch in variabler Weise ein Übergewicht lang- oder kurzlebiger Nachkommen (Simons und Clevers, 2011; Snippert et al., 2010).

5.4. Einzelzelldaten unterstützen progressives Differenzierungsmodell

Abgesehen von der Frage, auf welcher Ebene die Erzeugung akut protektiver T_{EF}- und langlebiger T_M-Zellen an das Infektionsgeschehen angepasst wird, existieren in der

Literatur sehr unterschiedliche Vorstellungen darüber, in welcher entwicklungsgeschichtlichen Abfolge kurz- und langlebige T-Zell-Subgruppen entstehen (Ahmed et al., 2009). Zwei wesentliche Modelle zur Gedächtnisentwicklung bei CD8⁺ T-Zellen schlagen entweder eine späte Entstehung von T_M-Zellen aus der stark expandierten kurzlebigen Effektorpopulation vor („lineares Differenzierungsmodell“) (Wherry et al., 2003) oder favorisieren eine frühe Entwicklung von T_M-Zellen, die sich dann kaum am Expansionsmaximum ihrer T_{EF}-Nachkommen beteiligen („progressives Differenzierungsmodell“) (Gett et al., 2003). Das lineare Differenzierungsmodell nimmt also an, dass Gedächtnis- und Effektorzellen eine lange gemeinsame Entwicklungsgeschichte und damit eine vergleichbar hohe Zahl von Zellteilungen durchlaufen. Auch sollte sich die Größe des Gedächtniskompartiments hier anteilig aus dem T_{EF}-lastigen Expansionsmaximum ergeben. Demgegenüber sagt das progressive Differenzierungsmodell eine frühe Trennung von Gedächtnis- und Effektorentwicklung und damit eine geringere Zahl von T_M-Teilungen voraus und erfordert keine enge Korrelation zwischen der Größe des Expansionsmaximums und der des Gedächtniskompartiments. Unter der Annahme, dass Zelltod bis zum Erreichen des Expansionsmaximums keine wesentliche Rolle für die Größenentwicklung von T-Zell-Familien spielt (Garrod et al., 2012), lassen die für Tag acht nach der Infektion gemessenen Expansions- und Diversifikationsmuster Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Entwicklungsreihenfolge von T_M- und T_{EF}-Zellen zu. Unter Berücksichtigung der CD62L- und CD27-Expression erscheint zunächst eine weitere Aufteilung der T_M-Zellen in CD27⁺ CD62L⁺ T_{CM}⁻ und CD27⁺ CD62L⁻ T_{EM}⁻-Zellen sinnvoll. Da diese Subgruppen bisher vor allem während der Gedächtnisphase definiert wurden (Sallusto et al., 2004), soll von T_{CM}⁻ und T_{EM}⁻-Vorläuferzellen (T_{CMp}⁻ und T_{EMp}-Zellen) gesprochen werden. Die bereits mehrfach erwähnte inverse Korrelation von Expansionsgröße und Gedächtnisphänotyp von T-Zell-Familien zeigte sich am deutlichsten für die Expression von CD62L (Abb. 21B und 22A) und IL-2 (Abb. 24B) – also für T_{CMp}-Zellen. Diese sind in kleinen T-Zell-Familien deutlich überrepräsentiert, während in den gefundenen Riesen an Tag acht (Abb. 22) und zwölf (Abb. 21 und 24) nach der Infektion T_{EF}-Zellen dominieren. Zusammen mit der fehlenden Korrelation zwischen der Größe der Primär- und Sekundärantwort (Abb. 27B) ergeben sich so bereits durch qualitative Datenanalyse klare Argumente gegen

das lineare Differenzierungsmodell und für eine frühe Trennung von Gedächtnisentwicklung und T_{EF} -getriebener Populationsexpansion. Eine von Dr. Michael Floßdorf und Professor Thomas Höfer durchgeführte eingehende biomathematische Modellanalyse ergab weiterhin, dass von 304 möglichen Differenzierungsmodellen, welche unter Annahme der Differenzierungszustände T_N , T_{CMP} , T_{EMP} und T_{EF} sowie aller möglichen Differenzierungswege von T_N zu und zwischen den restlichen drei Zuständen erzeugt wurden, nur zwei zu den gemessenen Einzelzelldaten kongruent waren. Beide dieser Modelle verlangen eine progressive Differenzierung von T_N zu T_{CMP} zu T_{EMP} zu T_{EF} , wobei in dieser Reihenfolge auch eine deutliche Zunahme der Teilungsaktivität vorhergesagt wird. Eines der beiden Modelle lässt in etwa 10% der Fälle eine direkte Differenzierung von T_N zu T_{EMP} zu, was mit einer geringen Rate asymmetrischer erster Zellteilungen kongruent wäre (Buchholz et al., 2013a). Asymmetrische Zellteilung als unverzichtbare Grundlage für die getrennte Entwicklung kurz- und langlebiger Zellen, wie von Chang et al. vorgeschlagen (Chang et al., 2007), unterstützt diese Modellierung jedoch nicht (Buchholz et al., 2013a).

5.5. Ursprung variabler Einzelzellschicksale

Die variable Entwicklung von T-Zell-Familien aus phänotypisch gleichen, naiven T-Zellen, ausgestattet mit identischen TCR, wirft die Frage nach dem Ursprung dieser Variabilität auf. Bei dem hier untersuchten transgenen OTI-TCR handelt es sich um einen TCR, der mit hoher Affinität an sein spezifisches Epitop SIINFEKL bindet. Die TCR-Affinität kann substantiellen Einfluss auf das Expansions- und Diversifikationsverhalten einer T-Zell-Population haben. Da in dieser Arbeit keine weiteren TCRs untersucht wurden, besteht die Möglichkeit, dass die beobachtete Variabilität von Einzelzellschicksalen nur bei hochaffinen Interaktionen des TCRs mit Peptid-MHC-Komplexen auftritt. Auch eine unphysiologische Regulation der Expression des transgenen TCRs kann als variabilitätsinduzierender Faktor nicht von vorneherein ausgeschlossen werden. Für die allgemeine Gültigkeit der mit diesem System identifizierten Phänomene spricht jedoch eindeutig, dass variable Einzelzellschicksale auch bei niedrig affinen Interaktionen des OTI-TCR mit alterierten

Peptid-Liganden unverändert auftreten (Gerlach et al., 2013). Außerdem demonstrieren wenige endogene SIINFEKL-spezifische T-Zellen nach adoptivem Transfer ebenfalls hochvariables Expansionsverhalten (Plumlee et al., 2013). Der tatsächliche Einzelzellursprung ist in diesen mittels Grenzverdünnung durchgeführten Transfers zwar nicht sicher gewährleistet, die hohe endogene Antwortvariabilität aus wenigen Ursprungszellen genügt jedoch, um transgene TCR-Expression als Variabilitätsursache auszuschließen. Das durchschnittliche Verhalten einer T-Zell-Population (Zehn et al., 2009) und damit notwendigerweise auch das ihrer einzelnen Mitglieder (Tubo et al., 2013) wird von der Affinität des jeweiligen TCRs grundlegend beeinflusst. Dieser Einfluss der TCR-Affinität wird auf Einzelzellebene jedoch von drastischen Schwankungen überlagert, welche die einheitliche transgene Expression eines identischen TCRs nicht zu kontrollieren vermag (Buchholz et al., 2013a; Gerlach et al., 2013). Es bleibt also die Frage, welche sonstigen Einflüsse das variable Schicksal von T-Zell-Familien bedingen. Diesbezüglich erscheint zunächst eine Einteilung in zellintrinsische und -extrinsische Faktoren sinnvoll. Eine Quelle zellintrinsischer Variabilität könnte das sogenannte „transkriptionelle Rauschen“ sein. Hierbei handelt es sich um zufällige Fluktuationen der Transkriptionsaktivität an bestimmten Genloci einer einzelnen Zelle, die sich in nachfolgenden Fluktuationen der Translationsaktivität und schließlich in einer unterschiedlichen Prävalenz der kodierten Proteine äußert (Chang et al., 2008; Eldar und Elowitz, 2010; Pina et al., 2012; Raser und O'Shea, 2005). Ein derartiges Rauschen könnte bereits die Rezeptivität von T_N -Zellen für die epitopspezifische Ligation ihres TCRs verändern, aber natürlich auch die Tendenz einer T_{CMP} -Zelle, sich weiter in eine T_{EMP} -Zelle zu differenzieren. Die Entwicklung der seltenen Riesen müsste demnach mit einem nur selten erreichten zellulären Fluktuationzustand assoziiert sein, die der Zwerge mit einem wahrscheinlicheren. Tatsächlich legen die biomathematischen Modellierungen von Floßdorf und Höfer nahe, dass die im vorliegenden Einzelzelldatensatz enthaltenen Expansions- und Diversifikationsmuster durch die stochastisch fluktuierende Exekution eines definierten zellulären Entwicklungsprogramms bedingt sind (Buchholz et al., 2013a). Ob diese Fluktuation jedoch intrinsisch und/oder extrinsisch motiviert ist, lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten. Um dies zu klären, wäre es nötig, bestimmte intrinsische Fluktuationzustände bzw. von extern empfangene Signale auf

Einzelzellebene zu identifizieren und ihre Auswirkung auf das weitere Schicksal dieser Zelle und ihrer Nachkommen zu bestimmen. Ein Weg, intrinsische Fluktuation zu identifizieren, ist, die Transkriptionsaktivität einer Zelle durch mRNA-Sequenzierung möglichst vollständig abzubilden, nachfolgend Oberflächenmarker zu identifizieren, die mit dem einen oder anderen Zustand assoziiert sind, und dann das Verhalten der so identifizierten Zellgruppen prospektiv zu analysieren. Zwei aktuelle Arbeiten haben diesen Ansatz bereits erfolgreich zum besseren Verständnis von Differenzierungsvorgängen verschiedener Immunzellen *in vitro* umgesetzt (Shalek et al., 2013; Yosef et al., 2013). Die Kopplung dieses Ansatzes mit dem Transfer einzelner T_N -Zellen könnte es erlauben, die Rolle verschiedener möglicher Zustandsformen von T_N -Zellen bezüglich ihrer tatsächlichen Auswirkungen auf den Ablauf einer Immunantwort zu überprüfen. Um die Einflüsse externer Signale auf das Schicksal einer einzelnen T-Zelle und ihrer Nachkommen *in vivo* zu bestimmen, wäre es nötig, den Empfang eines definierten Signals sichtbar zu machen und dann die Nachkommen der signalempfangenden T-Zelle zu verfolgen. Eine Studie, die sich diesen Zielen annähert, verwendet OTI-T-Zellen, die abhängig von der Stärke des empfangenen TCR-Signals abgestufte Mengen eines fluoreszierenden Proteins exprimieren. Diese werden dann per Durchflusszytometrie in den Rezipienten detektiert und einzeln entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität sortiert. Nachkommen dieser einzelnen T-Zellen werden *in vitro* propagiert und so wird das resultierende Schicksal der T-Zell-Familie zur primären Signalrezeption in Beziehung gesetzt (Beuneu et al., 2010). Um den tatsächlichen mikroanatomischen Kontext, in welchem die Aktivierung einer einzelnen T-Zelle stattfindet, in Beziehung zur langfristigen Entwicklung der entsprechenden T-Zell-Familie zu setzen, bedarf es jedoch weiterer technologischer Innovation. Proteine, die erst durch einen Laserpuls in ihre fluoreszierende Konformation überführt werden, bieten heute bereits die Möglichkeit, T-Zellen, die sich in einem spezifischen mikroanatomischen Kontext befinden, zu markieren und das Migrationsverhalten dieser markierten Zellen Tage später im lebenden Lymphknoten abzufragen (Victoria et al., 2010). Diese Art der Markierung geht bei Zellteilungen jedoch rasch verloren. Um die dynamischen Expansions- und Diversifikationsprozesse einer $CD8^+$ T-Zell-Immunantwort in Bezug zu ihrem

mikroanatomischen Ursprungsort zu setzen, bedürfte es einer vergleichbaren Markierbarkeit auf genetischer Ebene.

5.6. Klinische Implikationen

Aus den hier diskutierten grundlagenwissenschaftlichen Beobachtungen ergeben sich verschiedene klinische Implikationen. Die Etablierung eines robusten Verhältnisses von Infektion und resultierender Immunantwort wird erst durch eine Population von antwortenden T_N -Zellen realisiert. Eine zu kleine epitopspezifische T-Zell-Population läuft demnach Gefahr, eine bezüglich akuter Expansion und/oder langfristiger Gedächtnisentwicklung suboptimale Immunantwort auszuprägen. In älteren Menschen nimmt die Anzahl der pro Epitop im naiven Repertoire vorgehaltenen T-Zellen deutlich ab (Nikolich-Zugich und Rudd, 2010). Dies mag ein Grund für die häufig unzureichende Reaktion des alternden Immunsystems auf *de novo* auftretende Antigene sein. So lässt sich zum Beispiel der Impferfolg der Influenza- oder Pneumokokken-Impfung in älteren Probanden deutlich schlechter vorhersagen als in jungen (Chen et al., 2009; McElhaney und Effros, 2009). Möglicherweise könnte der Impferfolg bei älteren Menschen durch eine allgemeine Vergrößerung der naiven epitopspezifischen T-Zell-Populationen (z.B. durch Gabe von Wachstumsfaktoren wie IL-7 oder eine medikamentöse Reaktivierung des Thymusaktivität) befördert werden (Dorshkind et al., 2009). Weiterhin könnte der Applikationsmodus der Impfung einen Einfluss auf die Rekrutierungseffizienz und damit Robustheit adaptiver Immunantworten ermöglichen (Buchholz et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass systemische Immunisierung mit einem lebenden Pathogen zu nahezu vollständiger Rekrutierung im murinen Modellsystem führt (Van Heijst et al., 2009). Ob eine ähnlich vollständige Aktivierung auch durch lokalisierte Impfungen garantiert wird, ist zumindest fraglich. Gerade Impfungen, bei denen von einer geringen Frequenz epitopspezifischer T_N -Zellen ausgegangen werden muss, könnten von systemischer Applikation profitieren.

Klinische Implikationen für die optimale Strukturierung adaptiver T-Zell-Therapie ergeben sich aus der Bestätigung des progressiven Differenzierungsmodells durch die hier präsentierten Einzelzelldaten. Der Transfer reaktiver T-Zellen zeigt gerade in der

Therapie infektiologischer Komplikationen bei schwer immunsupprimierten Patienten (Cobbold et al., 2005), ebenso wie in der Therapie maligner Erkrankungen, erste klinische Erfolge (Brentjens et al., 2013; Grupp et al., 2013; Porter et al., 2011). Für die therapeutische Effizienz erscheint hierbei die langfristige Persistenz der transferierten T-Zell-Population von ganz wesentlicher Bedeutung (Berger et al., 2008; Maus et al., 2014). Die hier präsentierten Daten legen nahe, dass eine langfristige Präsenz transferierter epitopspezifischer T-Zellen wesentlich von der Größe ihrer T_{CM} -Population und nicht von der Zahl der akut protektiven T_{EF} -Zellen abhängt. Dies unterstreicht die mögliche Relevanz der $CD8^+$ T_{CM} -Population für die Umsetzung erfolgreicher zelltherapeutischer Strategien.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung von CD8⁺ T-Zell-Immunantworten ausgehend von einzelnen naiven T-Zellen untersucht. Hierzu wurden Primär-, Sekundär- und Tertiärexpansion, Oberflächenphänotyp, Zytokinsekretion und Expression von Transkriptionsfaktoren analysiert und über verschiedene Teilexperimente hinweg insgesamt 448 T-Zell-Familien beobachtet.

Aus diesem Datensatz lassen sich folgende Kernaussagen ableiten:

1. Die Robustheit der Expansions- und Diversifikationsprozesse im Rahmen von CD8⁺ T-Zell-Immunantworten basiert auf der sehr unterschiedlichen Entwicklung einzelner T-Zell-Familien. Gemeinsam ergeben diese variablen Einzelschicksale jedoch ein vorhersagbares, an das Infektionsgeschehen angepasstes Muster. Die Robustheit der CD8⁺ T-Zell-Immunantwort wird also nicht auf Ebene der einzelnen in die Immunantwort rekrutierten T_N gewährleistet, sondern erst durch die Einbeziehung einer ausreichend großen epitopspezifischen T-Zell-Population etabliert.
2. Das aus dem Einzelzellverhalten ableitbare Entwicklungsmodell entspricht dem der progressiven Differenzierung. Dieses Modell impliziert, dass die zukünftigen T_M zu einem frühen Zeitpunkt der Expansionsphase entstehen und im weiteren Verlauf nur geringen Einfluss auf die Größe der Primärantwort nehmen. Wie viele T_M primär entstehen, scheint jedoch wesentlich die Größe einer sekundären oder tertiären Immunantwort zu bestimmen.

7. Literaturverzeichnis

Ahmed, R., Bevan, M.J., Reiner, S.L., and Fearon, D.T. (2009). The precursors of memory: models and controversies. *Nat Rev Immunol* 9, 662–668.

Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286, 958–961.

Badovinac, V.P., Haring, J.S., and Harty, J.T. (2007). Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity* 26, 827–841.

Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol* 185, 4988–4992.

Berger, C., Jensen, M.C., Lansdorp, P.M., Gough, M., Elliott, C., and Riddell, S.R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118, 294–305.

Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107, 4781–4789.

Beuneu, H., Lemaître, F., Deguine, J., Moreau, H.D., Bouvier, I., Garcia, Z., Albert, M.L., and Bousso, P. (2010). Visualizing the functional diversification of CD8+ T cell responses in lymph nodes. *Immunity* 33, 412–423.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*

329, 506–512.

Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., and Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*.

Brentjens, R.J., Davila, M.L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L.G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., et al. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5, 177ra38.

Buchholz, V.R., Flossdorf, M., Hensel, I., Kretschmer, L., Weissbrich, B., Gräf, P., Verschoor, A., Schiemann, M., Höfer, T., and Busch, D.H. (2013a). Disparate individual fates compose robust CD8+ T cell immunity. *Science* 340, 630–635.

Buchholz, V.R., Gräf, P., and Busch, D.H. (2012). The origin of diversity: studying the evolution of multi-faceted CD8+ T cell responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1585–1595.

Buchholz, V.R., Gräf, P., and Busch, D.H. (2013b). The smallest unit: effector and memory CD8(+) T cell differentiation on the single cell level. *Front Immunol* 4, 31.

Buchholz, V.R., Neuenhahn, M., and Busch, D.H. (2011). CD8+ T cell differentiation in the aging immune system: until the last clone standing. *Curr Opin Immunol* 23, 549–554.

Burnet, S.F.M. (1959). *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity* (Cambridge University Press).

Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (2000). Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* 164, 5782–5787.

Chang, H.H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D.E., and Huang, S. (2008). Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 453, 544–547.

Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A.,

Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al. (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315, 1687–1691.

Chen, W.H., Kozlovsky, B.F., Effros, R.B., Grubeck-Loebenstien, B., Edelman, R., and Sztein, M.B. (2009). Vaccination in the elderly: an immunological perspective. *Trends Immunol* 30, 351–359.

Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., et al. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 202, 379–386.

Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y., and Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* 206, 51–59.

Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W.B., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., et al. (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 13, 843–850.

Doherty, P.C., and Zinkernagel, R.M. (1975). H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* 141, 502–507.

Dorshkind, K., Montecino-Rodriguez, E., and Signer, R.A.J. (2009). The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* 9, 57–62.

Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C.G., et al. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107–111.

Dutton, R.W., Bradley, L.M., and Swain, S.L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16, 201–223.

Edelson, B.T., and Unanue, E.R. (2000). Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol* 12, 425–431.

Edelson, B.T., Bradstreet, T.R., Hildner, K., Carrero, J.A., Frederick, K.E., Kc, W., Belizaire, R., Aoshi, T., Schreiber, R.D., Miller, M.J., et al. (2011). CD8 α (+) Dendritic Cells Are an Obligate Cellular Entry Point for Productive Infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity* 35, 236–248.

Efron, B., and Tibshirani, R.J. (1994). *An Introduction to the Bootstrap* (Chapman & Hall/CRC Monographs on Statistics & Applied Probability). (15 May 1994).

Eldar, A., and Elowitz, M.B. (2010). Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature* 467, 167–173.

Feau, S., Arens, R., Togher, S., and Schoenberger, S.P. (2011). Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nat Immunol* 12, 908–913.

Foulds, K.E., Zenewicz, L.A., Shedlock, D.J., Jiang, J., Troy, A.E., and Shen, H. (2002). Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J Immunol* 168, 1528–1532.

Garrod, K.R., Moreau, H.D., Garcia, Z., Lemaître, F., Bouvier, I., Albert, M.L., and Bousso, P. (2012). Dissecting T cell contraction in vivo using a genetically encoded reporter of apoptosis. *Cell Rep* 2, 1438–1447.

Gerlach, C., Rohr, J.C., Perié, L., van Rooij, N., van Heijst, J.W.J., Velds, A., Urbanus, J., Naik, S.H., Jacobs, H., Beltman, J.B., et al. (2013). Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8+ T cells. *Science* 340, 635–639.

Gerlach, C., van Heijst, J.W.J., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R.M., Zehn, D., Bevan, M.J., Schepers, K., and Schumacher, T.N.M. (2010). One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Med* 207, 1235–1246.

Gett, A.V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Geginat, J. (2003). T cell fitness

determined by signal strength. *Nat Immunol* 4, 355–360.

Grupp, S.A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D.L., Rheingold, S.R., Teachey, D.T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J.F., et al. (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368, 1509–1518.

Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F., and Pantaleo, G. (2004). Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 103, 966–972.

Hendriks, J., Gravestein, L.A., Tesselaar, K., van Lier, R.A., Schumacher, T.N., and Borst, J. (2000). CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1, 433–440.

Hendriks, J., Xiao, Y., Rossen, J.W.A., van der Sluijs, K.F., Sugamura, K., Ishii, N., and Borst, J. (2005). During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J Immunol* 175, 1665–1676.

Henrickson, S.E., and Andrian, von, U.H. (2007). Single-cell dynamics of T-cell priming. *Curr Opin Immunol* 19, 249–258.

Henson, S.M., Franzese, O., Macaulay, R., Libri, V., Azevedo, R.I., Kiani-Alikhan, S., Plunkett, F.J., Masters, J.E., Jackson, S., Griffiths, S.J., et al. (2009). KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood* 113, 6619–6628.

Hikono, H., Kohlmeier, J.E., Takamura, S., Wittmer, S.T., Roberts, A.D., and Woodland, D.L. (2007). Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 204, 1625–1636.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3

deficiency reveals a critical role for CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.

Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17–27.

Huster, K.M., Busch, V., Schiemann, M., Linkemann, K., Kerksiek, K.M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2004). Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 5610–5615.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6, 1236–1244.

Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* 27, 281–295.

Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4, 1191–1198.

Lane, F.C., and Unanue, E.R. (1972). Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis. *J Exp Med* 135, 1104–1112.

Lucy, L.B. (2000). Hypothesis testing for meagre data sets. *Monthly Notices RAS* 318, 92–100.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291, 2413–2417.

Maus, M.V., Fraietta, J.A., Levine, B.L., Kalos, M., Zhao, Y., and June, C.H. (2014). Adoptive Immunotherapy for Cancer or Viruses. *Annu Rev Immunol*.

McElhaney, J.E., and Effros, R.B. (2009). Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr Opin Immunol* 21, 418–424.

Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., and Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203–213.

Murphy, K. (2011). *Janeway's Immunobiology*, Eighth Edition (Garland Science).

Neuenhahn, M., Kerksiek, K.M., Nauwerth, M., Suhre, M.H., Schiemann, M., Gebhardt, F.E., Stemberger, C., Panthel, K., Schröder, S., Chakraborty, T., et al. (2006). CD8alpha+ dendritic cells are required for efficient entry of *Listeria monocytogenes* into the spleen. *Immunity* 25, 619–630.

Nikolich-Zugich, J., and Rudd, B.D. (2010). Immune memory and aging: an infinite or finite resource? *Curr Opin Immunol* 22, 535–540.

Obar, J.J., Khanna, K.M., and Lefrançois, L. (2008). Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28, 859–869.

Pamer, E. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol*.

Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C.-A., et al. (2003). Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 302, 1041–1043.

Peperzak, V., Xiao, Y., Veraar, E.A.M., and Borst, J. (2010). CD27 sustains survival of CTLs in virus-infected nonlymphoid tissue in mice by inducing autocrine IL-2 production. *J Clin Invest* 120, 168–178.

Pina, C., Fugazza, C., Tipping, A.J., Brown, J., Soneji, S., Teles, J., Peterson, C., and

Enver, T. (2012). Inferring rules of lineage commitment in haematopoiesis. *Nat. Cell Biol.* *14*, 287–294.

Plumlee, C.R., Sheridan, B.S., Cicek, B.B., and Lefrançois, L. (2013). Environmental Cues Dictate the Fate of Individual CD8(+) T Cells Responding to Infection. *Immunity*.

Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* *365*, 725–733.

Raser, J.M., and O'Shea, E.K. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* *309*, 2010–2013.

Reiner, S.L., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2007). Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science* *317*, 622–625.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708–712.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* *22*, 745–763.

Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med* *205*, 625–640.

Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* *59*, 1035–1048.

Schepers, K., Swart, E., Van Heijst, J.W., Gerlach, C., Castrucci, M., Sie, D., Heimerikx, M., Velds, A., Kerkhoven, R.M., Arens, R., et al. (2008). Dissecting T cell lineage relationships by cellular barcoding. *Journal of Experimental Medicine* *205*,

2309–2318.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* *1*, 426–432.

Schluns, K.S., and Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* *3*, 269–279.

Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X., and Lefrançois, L. (2002). Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* *168*, 4827–4831.

Schroeder, T. (2008). Imaging stem-cell-driven regeneration in mammals. *Nature* *453*, 345–351.

Schumacher, T.N.M., Gerlach, C., and van Heijst, J.W.J. (2010). Mapping the life histories of T cells. *Nat Rev Immunol* *10*, 621–631.

Seder, R.A., Darrah, P.A., and Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* *8*, 247–258.

Shalek, A.K., Satija, R., Adiconis, X., Gertner, R.S., Gaublomme, J.T., Raychowdhury, R., Schwartz, S., Yosef, N., Malboeuf, C., Lu, D., et al. (2013). Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* *498*, 236–240.

Simons, B.D., and Clevers, H. (2011). Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* *145*, 851–862.

Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es, J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., et al. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* *143*, 134–144.

Stemberger, C., Huster, K.M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H., and

Busch, D.H. (2007). A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* 27, 985–997.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669.

Townsend, A.R., Rothbard, J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D., and McMichael, A.J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44, 959–968.

Tube, N.J., Pagán, A.J., Taylor, J.J., Nelson, R.W., Linehan, J.L., Ertelt, J.M., Huseby, E.S., Way, S.S., and Jenkins, M.K. (2013). Single Naive CD4+ T Cells from a Diverse Repertoire Produce Different Effector Cell Types during Infection. *Cell* 153, 785–796.

Van Heijst, J.W.J., Gerlach, C., Swart, E., Sie, D., Nunes-Alves, C., Kerkhoven, R.M., Arens, R., Correia-Neves, M., Schepers, K., and Schumacher, T.N.M. (2009). Recruitment of Antigen-Specific CD8+ T Cells in Response to Infection Is Markedly Efficient. *Science* 325, 1265–1269.

Verschoor, A., Neuenhahn, M., Navarini, A.A., Graef, P., Plaumann, A., Seidlmeier, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., et al. (2011). A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8 α (+) dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol*.

Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605.

Voehringer, D., Blaser, C., Brawand, P., Raulet, D.H., Hanke, T., and Pircher, H. (2001). Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells. *J Immunol* 167, 4838–4843.

Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R.,

Andrian, von, U.H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4, 225–234.

Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171–192.

Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 441, 890–893.

Yager, E.J., Ahmed, M., Lanzer, K., Randall, T.D., Woodland, D.L., and Blackman, M.A. (2008). Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *J Exp Med* 205, 711–723.

Yosef, N., Shalek, A.K., Gaublomme, J.T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., et al. (2013). Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 496, 461–468.

Zehn, D., Lee, S.Y., and Bevan, M.J. (2009). Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458, 211–214.

Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.-M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.-H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33, 229–240.

Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701–702.

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Professor Dirk Busch für die ungeteilte Unterstützung und das Vertrauen, das er mir in den letzten Jahren entgegengebracht hat. Ich hätte mir keinen besseren Mentor wünschen können. Die kritischen Diskussionen mit ihm haben meine wissenschaftliche Arbeit geformt und voran gebracht. Weiterhin danke ich Professor Jürgen Ruland und Professor Percy Knolle für ihre gutachterlichen Stellungnahmen zu dieser Dissertation.

Auch meinen lieben Kolleginnen und Kollegen bin ich zu großem Dank verpflichtet. Im Einzelnen möchte ich Patricia Gräf, Inge Hensel, Katherine Molter und Bianca Weißbrich erwähnen. Weiterhin danke ich Dr. Matthias Schiemann und seiner Mitarbeiterin Lynette Henkel für ausgezeichnete durchflusszytometrische Sortierungen, die ein wesentlicher Baustein für das Gelingen dieser Arbeit waren. Natürlich gilt mein Dank auch Dr. Christian Stemberger, dessen Pionierarbeit im Bereich des adoptiven Transfers einzelner T-Zellen die unverzichtbare Grundlage meiner Arbeit bildete. Auch danke ich ihm für viele anregende Diskussionen. Auf keinen Fall darf ich meinen Büronachbarn Dr. Stefan Dreher vergessen – ihm, ebenso wie Dr. Michael Neuenhahn, Dr. Georg Doessinger, Dr. Florian Anderl und Dr. Admar Verschoor danke ich für viele wissenschaftlich und persönlich bereichernde Gespräche. Dr. Georg Gasteiger und Dr. Thomas Grünwald danke ich ebenfalls für intensive Diskussionen – nicht nur zu wissenschaftlichen Themen.

Großer Dank gilt meiner wunderbaren Frau Dr. Grete Buchholz und zu guter Letzt meinen lieben Eltern.