

Aus der Klinik für Neurologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. Hans-Peter Hartung

*Next-Generation Sequencing* in der Neurologie:

Etablierung einer Methode zur Immunrepertoireanalyse von T- und B-Lymphozyten und  
Anwendung der T-Zell-Rezeptorrepertoireanalyse bei Patienten mit Multipler Sklerose unter  
immunmodulatorischer Behandlung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Armin Scheffler

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Goebels

Zweitgutachter: Prof. Dr. Colin R. MacKenzie

## **Zusammenfassung:**

Das sogenannte *Next-Generation Sequencing* (NGS) ist eine neue Art der Sequenzierungstechnologie. Im Vergleich zur konventionellen Sanger-Sequenzierung können nun nicht nur einzelne, sondern tausende bis Millionen von DNA-Strängen parallel sequenziert und riesige Mengen an Daten generiert werden. Neben vielfältigen Möglichkeiten in anderen Anwendungsbereichen ist man mit dieser Technologie in der Lage, einen großen Ausschnitt des Immunrepertoires zu einem bestimmten Zeitpunkt darzustellen und zu betrachten. Einen tieferen Einblick in das menschliche Immunrepertoire zu erhalten und dadurch immunologische Prozesse beschreiben zu können, schien auch für neurologische Erkrankungen relevant zu sein. Deshalb war es zunächst Ziel dieser Arbeit, den experimentellen Ablauf für eine NGS-basierte Analyse von T- und B-Zell-Rezeptoren zu etablieren. Dabei offenbarten sich sowohl die Möglichkeiten als auch die Anfälligkeit der Methode, die unter anderem in der Verwendung unterschiedlichen Ausgangsmaterials, in den diversen Möglichkeiten der sogenannten *Library*-Präparation und in der Komplexität der Auswertung der riesigen Datenmengen begründet liegt. Für eine praktische Anwendung der T-Zell-Rezeptorrepertoireanalyse bot die Behandlung der Multiplen Sklerose (MS), einer autoimmunen entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), mit Fingolimod (FTY720), einem Immunmodulator mit sehr spezifischer Wirkung auf Immunzellen, die ideale Voraussetzung, diese Technik anzuwenden, Veränderungen des T-Zell-Rezeptorrepertoires zu beobachten und den Nutzen der Methode zu evaluieren. Betrachtet wurden dabei die CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen von zwei Patientinnen vor und nach einem halben Jahr Behandlung mit Fingolimod. Neben bereits bekannten Veränderungen der T-Zell-Komposition zugunsten der CD8-Population konnten bei gleichzeitiger Diversitätsabnahme des peripheren Immunrepertoires persistierende Klone sowohl in der CD4- als auch in der CD8-Population beider Patientinnen während der Behandlung nachgewiesen werden. Vor allem das Rezeptorrepertoire der CD8-Population bestand nach sechsmonatiger Therapie zu einem großen Teil aus Sequenzen von Klonen, die bereits vor der Behandlung vorhanden waren. Diese Ergebnisse deuten nicht nur auf eine bereits bekannte morphologische Persistenz von Subpopulationen, sondern auch auf eine gewisse funktionelle Konstanz des Immunrepertoires unter der immunmodulatorischen Therapie hin. Tiefergreifende Untersuchungen näher definierter Subpopulationen in einer größeren Kohorte könnten helfen, die Pathologie der Erkrankung und die Wirkweise des Medikaments besser zu verstehen und neue Biomarker für die Multiple Sklerose zu identifizieren. Zusammengefasst liegt trotz der vorhandenen technischen Herausforderungen viel Potential in dieser Methode für die Beantwortung neurologischer Fragestellungen.

## **Abstract:**

Next-Generation Sequencing (NGS) is a new approach in sequencing technology. Compared to conventional Sanger sequencing, where only a single DNA strand can be sequenced, NGS enables a simultaneous sequencing of million DNA strands and therefore provides a tremendous increase of data output. Besides many other applications, NGS can reveal a wide view into the immune repertoire at a certain time. Obtaining this deep insight into the human immune repertoire seemed also to be relevant for describing immunological processes in neurological diseases. Thus, the aim of this thesis was to establish the experimental workflow for a NGS-based B cell and T cell receptor analysis. During this work, not only the potential of the technique became clear, but also the susceptibility of the method, like the usage of different starting material, the various ways of the so-called library preparation and the challenge of analysing vast amounts of data. A neurological question was chosen for testing the T cell receptor repertoire analysis. The treatment of multiple sclerosis (MS), an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system (CNS), with Fingolimod (FTY720), an immunomodulatory drug with a highly specialised effect on immune cells, offered the best conditions for testing the technique, to identify changes in the immune repertoire and to evaluate the utility of this method. CD4(+) and CD8(+) T cells of two female patients before and after half a year of treatment were analysed. Apart from already known changes in the T cell composition with a shift to the CD8 population, permanent clones in combination with a decreased diversity in the peripheral immune repertoire were found as well in the CD4 as in the CD8 population of both patients during the treatment. After six months of treatment, particularly the receptor repertoire of the CD8 population were composed of sequences of clones which were already identified before treatment. These findings indicate not only an already known morphological persistency of certain subpopulations, but also a functional consistency of the immune repertoire during the immunomodulatory treatment. Further investigations of defined subpopulations and a bigger cohort could help to understand the pathology of the disease, the mechanism of this drug and to find new biological markers for multiple sclerosis. In sum, despite of the still existing technical problems and challenges there is a high potential of this method for answering neurological questions.

## **Abkürzungsverzeichnis:**

**°C:** Grad Celsius

**5'RACE:** *5' rapid amplification of cDNA ends*

**5'-UTR:** Untranslatierter Bereich am 5'-Ende

**6Mo:** Sechs Monate

**AK:** Antikörper

**APC:** Antigen-präsentierende Zelle

**BMFZ:** Biomedizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**bp:** Basenpaar

**BZR:** B-Zell-Rezeptor

**Ca/β:** Konstante Region der α- bzw. β-Kette des T-Zell-Rezeptors

**CCR7:** CC-Chemokin-Rezeptor 7

**CD:** *Cluster of differentiation*

**cDNA:** komplementäre Desoxyribonukleinsäure

**CDR:** *Complementarity-determining region*

**CH:** Konstante Region der schweren Kette des Immunglobulins

**Chrom.:** Chromosom

**CIS:** *Clinically isolated syndrome*

**CTL:** Zytotoxischer T-Lymphozyt

**ddNTP:** Didesoxyribonukleosid-Triphosphat

**DGN:** Deutsche Gesellschaft für Neurologie

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DNA:** Desoxyribonukleinsäure

**dNTP:** Desoxyribonukleosid-Triphosphat

**E:** *Evenness*

**EAE:** *Experimental allergic encephalomyelitis*

**EDSS:** *Expanded disability status scale*

**Fab:** *Fragment antigen-binding*

**FACS:** *Fluorescence-activated cell sorting*

**Fc:** *Fragment crytallizable*

**FCS:** *Fetal calf serum*

**FID:** *Forward unique identifier*

**Fluoreszenzen/Färbungen:**

**APC:** Allophycocyanin

**DAPI:** 4',6-Diamidin-2-phenylindol

**FITC:** Fluoresceinisothiocyanat

**PE:** Phycoerythrin

**FR:** *Framework region*

**g:** Gramm

**GSP:** Genspezifischer *Primer*

**GTL:** *Genomics & Transcriptomics* Labor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**HTS:** *High-Throughput Sequencing*

**Ig:** Immunglobulin

**IgGH:** Schwere Kette des Immunglobulin G

**ITZ:** Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**k/mm<sup>2</sup>:** 1000/Millimeter

**l:** Liter

**L-P:** *Leader-Peptid*

**µl:** Mikroliter

**µM:** Mikromolare Lösung

**ml:** Milliliter

**MAF:** *Molecular amplification fingerprint*

**MHC:** *Major histocompatibility complex*

**min:** Minute

**MPS:** *Massive-Parallel Sequencing*

**mRNA:** *Messenger Ribonukleinsäure*

**MRT:** *Magnetresonanztomographie*

**MS:** Multiple Sklerose

**ng:** Nanogramm

**NGS:** *Next-Generation Sequencing*

**nM:** Nanomolare Lösung

**Nukleinbasen:**

**A:** Adenin

**C:** Cytosin

**G:** Guanin

**T:** Thymin

**PBMC:** *Perhiperal blood mononuclear cell*

**PBS:** *Phosphate buffered saline*

**PCR:** Polymerase-Kettenreaktion

**PGM:** *Personal Genome Machine*

**pH:** Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

**pM:** Pikomolare Lösung

**PPMS:** *Primary progressive multiple sclerosis*

**RID:** *Reverse unique identifier*

**RNA:** Ribonukleinsäure

**RRMS:** *Relapsing-remitting multiple sclerosis*

**S1P:** Sphingosin-1-Phosphat

**SA:** Shannon Index

**SI:** Simpson Index

**SPMS:** *Secondary progressive multiple sclerosis*

**T<sub>CM</sub>:** *Central memory T cell*

**T<sub>CON</sub>:** Konventionelle T-Zelle

**T<sub>EFF</sub>:** Effektor T-Zelle

**T<sub>EM(RA)</sub>:** *Effector memory T cell*

**T<sub>FH</sub>:** follikuläre T-Helferzeller

**TLR:** *Toll-like receptor*

**T<sub>REG</sub>:** Regulatorische T-Zelle

**TS-Oligo:** *Template-Switch Oligonukleotid*

**TZR:** T-Zell-Rezeptor

**UID:** *Unique identifier*

**UMI:** *Unique molecular identifier*

**UPM:** *Universal Primer Mix*

**UV:** Ultraviolett

**VB:** Vor Behandlung

**VH:** Variable Region der schweren Kette des Immunglobulins (*heavy chain*)

**VL:** Variable Region der leichten Kette des Immunglobulins (*light chain*)

**V $\alpha$ / $\beta$ :** Variable Region der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors

**ZNS:** Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Immunsystem und Immunrepertoire</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Das angeborene Immunsystem .....	1
1.1.2	Das erworbene/adaptive Immunsystem .....	2
1.1.2.1	Entwicklung von T- und B-Lymphozyten.....	2
1.1.2.2	Entwicklung des B- und T-Zell-Rezeptors.....	4
1.1.3	Definition eines Immunrepertoires .....	9
1.1.4	Diversität des Immunrepertoires .....	10
<b>1.2</b>	<b>Von der Sanger-Sequenzierung zu <i>Next-Generation Sequencing</i></b> .....	<b>11</b>
1.2.1	Sanger-Sequenzierung .....	11
1.2.2	<i>Next-Generation Sequencing</i> .....	12
1.2.2.1	Roche 454 GS FLX.....	12
1.2.2.2	Thermo Fisher Scientific <i>Ion Torrent PGM</i> .....	13
1.2.2.3	Illumina MiSeq.....	13
1.2.3	Aktuelle Anwendungen.....	16
<b>1.3</b>	<b>Multiple Sklerose und deren Behandlung mit Fingolimod</b> .....	<b>17</b>
1.3.1	Allgemeines zur Multiplen Sklerose .....	17
1.3.2	Klinische Einteilung der MS und Diagnosestellung .....	17
1.3.3	Immunologische Akteure.....	18
1.3.4	Entwicklung, Wirkprinzip und Anwendung von Fingolimod (FTY720).....	19
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>21</b>
1.4.1	Etablierung und Durchführung einer NGS-unterstützten Immunrepertoireanalyse von T- und B-Zellen .....	21
1.4.2	Verhalten des T-Zell-Rezeptor-Repertoires von Patienten mit Multipler Sklerose unter Behandlung mit Fingolimod .....	21
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden:</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientenmaterial</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Durchflusszytometrie</b> .....	<b>22</b>
2.2.1	<i>Flourescence-activated cell sorting</i> (FACS) und Isolation von Lymphozytenpopulationen	23
2.2.2	Datenanalyse der FACS-Daten .....	24
<b>2.3</b>	<b>RNA Isolierung mithilfe von TRIzol® und Qualitätskontrolle</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b><i>5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'RACE)</i></b> .....	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>PCR-Protokolle, <i>Library</i>-Präparation und Qualitätskontrolle</b> .....	<b>26</b>
2.5.1	T-/B-Zell-Rezeptornachweis.....	27

2.5.2	PCR-Protokoll für eine T-Zell-Rezeptorlibrary.....	29
2.5.2.1	PCR zur Amplifikation von Rezeptorsequenzen mit Überhängen („Rezeptor-PCR“)	29
2.5.2.2	Entfernen der <i>Primerreste</i> mittels <i>Beadaufreinigung</i> .....	30
2.5.2.3	PCR zur Vervollständigung der Adaptersequenz, zum Anfügen eines Barcodes („Barcode-PCR“) und Gelaufreinigung.....	31
2.5.3	PCR-Protokoll für eine B-Zell-Rezeptorlibrary .....	33
<b>2.6</b>	<b>Quantifizierung der <i>Libraries</i>.....</b>	<b>34</b>
2.6.1	... mit dem BioAnalyzer 2100.....	34
2.6.2	... mit dem Qubit 2.0 .....	34
2.6.3	<i>Pooling</i> der TZR-Libraries.....	35
<b>2.7</b>	<b>Sequenzierung auf Illumina Miseq.....</b>	<b>35</b>
2.7.1	Erste Sequenzierungen ohne Anpassung an die Zellzahl.....	36
2.7.2	Sequenzierung von T-Zell-Rezeptoren mit Anpassung an die Zellzahl.....	36
2.7.3	Variationen während der Etablierung .....	36
<b>2.8</b>	<b>Datenanalyse der NGS-Daten, Darstellungen, Abbildungen und Formeln .....</b>	<b>36</b>
<b>2.9</b>	<b>Materialliste.....</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse:</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung einer PCR-basierten <i>Library</i>präparation zur Erfassung des Immunrepertoires von IgG-exprimierenden (bzw. sezernierenden) B-Zellen und von T-Zellen, welche die <math>\beta</math>-Kette des TZR exprimieren .....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Etablierung einer Aufreinigungsmethode zur Entfernung von langen <i>Primern</i> aus PCR-Produkten.....	42
3.1.2	Für die Generierung von <i>Rezeptorlibraries</i> mussten das Protokoll der PCR an die Zellzahl der jeweiligen Probe angepasst und unspezifische PCR-Produkte von der Analyse ausgeschlossen werden .....	43
3.1.3	Eine Erhöhung der Molarität auf der <i>Flow cell</i> führte nur zu einer leichten Erhöhung generierter Sequenzen.....	50
3.1.4	Die Anzahl identifizierter Klone veränderten das Erscheinungsbild eines Repertoires, ohne dass eine erhöhte Anzahl an Sequenzen zwangsläufig zu einer erhöhten Anzahl identifizierter Klone führte .....	50
3.1.5	Etablierung eines Protokolls für die Generierung von <i>Libraries</i> mit B-Zell-Rezeptoren vom Typ IgG .....	55
<b>3.2</b>	<b>Multiple Sklerose und Fingolimod .....</b>	<b>56</b>
3.2.1	Fingolimod bewirkte eine Reduktion und eine veränderte Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation .....	56
3.2.2	Unter der Behandlung mit Fingolimod zeigte sich eine funktionelle Konstanz des Immunrepertoires.....	59

3.2.3	Die Diversität des Immunrepertoire nahm unter sechsmonatiger Behandlung mit Fingolimod ab, während der Anteil der Top-Klone sich erhöhte.....	63
3.2.4	Unter Behandlung schränkte sich die Vielfalt unterschiedlicher V-J-Gen-Kombinationen tendenziell ein, vor allem in den Populationen von Patientin B bestimmten die Kombinationen der Top Klone das Repertoire. ....	67
<b>4</b>	<b><i>Diskussion:</i></b> .....	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung des experimentellen Ablaufs der Immunrepertoireanalyse von T- und B-Lymphozyten .....</b>	<b>73</b>
4.1.1	Wahl eines RNA-basierten Ansatz mit 5'RACE und einer PCR-basierten <i>Library</i> -Präparation .....	73
4.1.2	Auftreten zusätzlicher PCR-Produkte in der Gelelektrophorese am Ende der TZR- <i>Library</i> -Präparation .....	80
4.1.3	Kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Sequenzierungstiefe und Anzahl identifizierter Klone .....	81
4.1.4	Auftreten von gleichen Klonen in der CD4- und der CD8-Population .....	81
4.1.5	Verbesserungsoptionen dieses Protokolls einer <i>Library</i> -Präparation .....	82
4.1.6	Sequenzierung und Illumina Miseq .....	82
4.1.7	Eine einheitliche, standardisierte Möglichkeit der Datenanalyse steht noch nicht zur Verfügung .....	83
<b>4.2</b>	<b>Multiple Sklerose und Fingolimod: Fingolimod beeinflusst sehr spezifisch einige Subpopulationen der Lymphozyten und hinterlässt eine funktionelle Konstanz im Rezeptorrepertoire.....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b><i>Weiterführende Experimente und Ausblick .....</i></b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b><i>Bekanntmachung und potenzielle Interessenskonflikte.....</i></b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis .....</i></b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b><i>Anhang.....</i></b>	<b>103</b>
8.1	Dokumentation der Zellsortierung der einzelnen Proben (FACS).....	103
8.2	Berechnung der Diversitätsindices mit R/R-Studio (Protokoll).....	105
<b>9</b>	<b><i>Danksagung:</i></b> .....	<b>108</b>

# 1 Einleitung

Das erste Kapitel befasst sich mit den Grundlagen des Immunsystems und der Reifung von B- und T-Lymphozyten, insbesondere der Entwicklung und der Besonderheiten ihrer jeweiligen Rezeptoren. Daraufhin wird auf ihre Gesamtheit in Form des Immunrepertoires näher eingegangen. Ein kurzer Einblick in gängige Sequenzierungsmethoden und deren Anwendungen in verschiedenen Bereichen soll einen Bogen auf die aktuellen Möglichkeiten der Immunrepertoireanalyse schlagen. Zuletzt soll erläutert werden, wie diese auch in einer neurologischen Fragestellung hilfreich sein könnte.

## 1.1 Immunsystem und Immunrepertoire

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist notwendig für eine schnelle Immunantwort. Dabei muss es in der Lage sein, Eigen und Fremd zu unterscheiden und pathogene Eindringlinge wie beispielsweise Bakterien im Wirtsorganismus zu eliminieren. Bestandteile dieses Systems sind unter anderem humorale Komponenten wie das Komplementsystem, antimikrobielle Peptide oder die Akute-Phase Reaktion. Zu den zellulären Anteilen gehören unter anderem Granulozyten und Makrophagen. Über verschiedene Rezeptoren wie den sogenannten *Toll-like receptors* (TLR) sind sie in der Lage, konservierte Strukturen wie bakterielle Wandstrukturen oder DNA zu erkennen und somit Angreifer zu phagozytieren oder durch chemische Reaktionen zu degradieren. Über Zytokine und die Antigenpräsentation übernehmen sie zudem eine Verbindungsfunktion sowohl zum eigenen angeborenen als auch zum adaptiven Immunsystem (im Detail nachzulesen unter anderem in der Übersichtsarbeit von Beutler 2004).

Es gibt im menschlichen Genom nur 20.000-25.000 Protein-codierende Gene (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Diese Anzahl an Genen ist nicht ausreichend für die benötigte Variabilität des Immunsystems, um auf neue, dem Immunsystem unbekannt Pathogene zu reagieren. Im Folgenden wird auf das adaptive Immunsystem eingegangen und darauf, wie die nötige Variabilität erreicht wird.

## 1.1.2 Das erworbene/adaptive Immunsystem

### 1.1.2.1 Entwicklung von T- und B-Lymphozyten

Zum adaptiven Immunsystem gehören B- und T-Zellen, die in der Lage sind, ein „immunologisches Gedächtnis“ zu entwickeln. Vorstufen von Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark. Die Vorläuferzellen der B-Lymphozyten differenzieren im Knochenmark aus, wohingegen die Vorläufer der T-Lymphozyten ihre Reifung im Thymus durchleben.

Während der weiteren Entwicklung der T-Lymphozyten im Thymus findet das T-Zell-Rezeptorarrangement statt, auf das im Abschnitt 1.1.2.2. detaillierter eingegangen wird. Da T-Zellen nur Antigene erkennen können, die auf sogenannten *Major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen präsentiert werden, wird zu Beginn der Rezeptor so lange kombiniert, bis die Zelle dazu in der Lage ist, dieses Molekül zu erkennen. Wird es nicht erkannt, geht die Zelle durch fehlende weitere Stimulation in die Apoptose („*Die by neglect*“), was als positive Selektion bezeichnet wird. Die von den T-Vorläuferzellen zu erkennenden MHC-Moleküle tragen zudem Peptide von körpereigenen Strukturen, sogenannte Selbstantigene. Dabei spielt nun die Bindungsaffinität der Zelle zu diesem Molekülkomplex eine entscheidende Rolle. Ist diese zu hoch, stellt sie eine Gefahr für den Organismus dar und geht wiederum in die Apoptose (auch klonale Deletion genannt). Dieser Prozess wird als negative Selektion bezeichnet. Eine Ausnahme bilden dabei regulatorische T-Zellen (T<sub>REG</sub>), bei denen eine höhere Affinität zu körpereigenen Antigenen toleriert wird. Dem Organismus gelingt es durch diese Mechanismen der sogenannten „zentralen Toleranz“ jedoch nicht vollständig, alle potentiellen autoreaktiven Zellen zu erkennen. Um die Gefahr, die von solchen Zellen ausgeht, zu minimieren, existiert die sogenannte „periphere Toleranz“. Zu ihr gehören unter anderem die regulatorischen T-Zellen. Ein weiterer Mechanismus ist die Anergie, ein Zustand, in den die autoreaktive Zelle verfällt, wenn nach einem (Selbst-)Antigenkontakt die notwendige Kostimulation zur Aktivierung ausbleibt (vgl. auch Übersichtsarbeiten von Sakaguchi et al. 2009; Griesemer et al. 2010; Xing und Hogquist 2012; Lehrbuch von Murphy et al. 2014, Kapitel 8, S. 438-440). Die reife naive T-Zelle exprimiert entweder ein CD4- oder ein CD8-Molekül. CD4(+)-T-Zellen suchen zur Aktivierung in sekundären lymphatischen Organen nach antigenpräsentierenden Zellen. CD8(+)-T-Zellen, die über die Bindung an MHC-I-Moleküle Antigene erkennen, können sich über antigenpräsentierende Zellen (APC) und deren Kostimulation in zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) entwickeln. Durch die Bindung an MHC-I-Moleküle bereits infizierter Zellen mit zusätzlicher Kostimulation von CD4(+)-T-Zellen ist ebenfalls eine Aktivierung und Differenzierung der naiven CD8(+)-T-Zelle in einen CTL möglich. Einmal aktiviert, wird bei einem CTL für die Tötung infizierter Zellen keine weitere Kostimulation benötigt (vgl.

Lehrbücher von Nijkamp und Parnham (2011), S. 15-27; Murphy et al. (2014), Kapitel 8, S. 440-444).

Werden CD4(+)-T-Zellen über die Bindung an MHC-II-Molekülen und über Kostimulation aktiviert, kommt es zur Proliferation. Je nach Art der Kostimulation differenzieren sich CD4(+)-T-Zellen in verschiedene Subtypen ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H9}$ ,  $T_{H17}$ ,  $T_{H22}$ ,  $T_{FH}$ ,  $T_{REG}$ ), die sich ihrerseits durch ihre Zytokinproduktion unterscheiden und dadurch unterschiedliche Funktionen übernehmen (vgl. Übersichtsarbeit von Golubovskaya und Wu 2016).

CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen durchlaufen dabei verschiedene Stadien. Von einer naiven Zelle reifen sie zu einer zentralen Gedächtniszelle ( $T_{CM}$ ) und Effektor-Gedächtniszelle ( $T_{EM}$ ) heran, aus denen wiederum Effektorzellen ( $T_{EFF}$ ) generiert werden können. Diese können phänotypisch durch verschiedene Oberflächenantigene unterschieden werden. Darunter fällt auch der CC-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7), ein sogenannter *Homing*-Rezeptor, der für die Migration in sekundäre lymphatische Organe essentiell ist. So exprimieren  $T_{CM}$  diesen Rezeptor,  $T_{EM}$  jedoch nicht und verweilen dementsprechend eher in der Peripherie (vgl. Übersichtsarbeiten von Sallusto et al. 2004; Golubovskaya und Wu 2016).

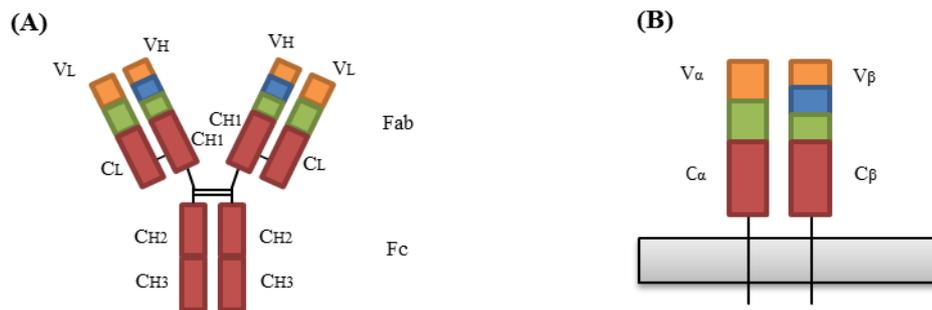
B-Zellen besitzen verschiedene Funktionen im Immunsystem. Darunter fällt unter anderem die Antikörperproduktion gegen Pathogene, zudem sind sie für die optimale Immunantwort CD4 exprimierender T-Zellen essenziell. B-Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark, wo die Genumlagerung des B-Zell-Rezeptors (BZR) stattfindet (siehe Abschnitt 1.1.2.2). Während der Reifung der B-Zelle wird die Genumlagerung über verschiedene Mechanismen kontrolliert. Hat der Lymphozyt die Selektionsmechanismen überstanden und die Genumlagerung einen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor hervorgebracht, wird er als unreife B-Zelle bezeichnet, deren Rezeptor noch auf Autoreaktivität getestet werden muss. Bindet der BZR der B-Zelle körpereigene Antigene, reagiert der Lymphozyt je nach Art des Antigens und der Affinität zum Antigen unterschiedlich. Dabei geht die Zelle entweder in die Apoptose, verfällt in einen anergischen Zustand oder bleibt klonal ignorant, was eine potentielle Gefahr für eine Autoimmunität darstellt. Als reife naive B-Zelle verlässt der Lymphozyt das Knochenmark, wobei er dabei die Immunglobuline (Ig) M und D auf seiner Oberfläche exprimiert. Für die Aktivierung ist nun der Kontakt mit dem für die B-Zelle spezifischen Antigen notwendig. Ist sie für ein thymusunabhängiges Antigen spezifisch, kann eine Aktivierung ohne zusätzliche Kostimulation von T-Helferzellen erfolgen und die B-Zelle sich in eine antikörperproduzierende Plasmazelle entwickeln, die Antikörper (AK) des Typs IgM sezerniert. Ist sie für ein thymusabhängiges Antigen spezifisch, benötigt sie eine Kostimulation von T-Zellen und sucht sich diese in peripheren lymphatischen Organen. Finden sich die komplementären B- und T-Zellen, bilden sie als erste organisierte Struktur zusammen mit weiteren antigenpräsentierenden

Zellen Primärfoci (je nach Art des lymphatischen Gewebes in unterschiedlicher Lokalisation), in denen die Zellen proliferieren und sich B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren. Auch diese produzieren zunächst Antikörper des Typs IgM. Teilweise gelangen Zellen auch in ein Primärfollikel lymphatischer Organe, in dem sie sich zu sogenannten Keimzentren organisieren, was zusammen nun sekundärer Follikel genannt wird. In den Keimzentren erfolgt durch die Stimulation der T-Zellen eine Affinitätsreifung in Form der somatischen Hypermutation. Dabei findet auch ein Klassenwechsel der antikörperproduzierenden Zellen von IgM zu einem anderen, effektiveren Immunglobulin statt, wobei IgG der Isotyp ist, welcher im Plasma letztlich am häufigsten vorkommt. Neben der Entwicklung von Plasmazellen kommt es auch zur Differenzierung von Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnelle spezifische Antikörperantwort induzieren können (vgl. auch Lehrbuch von Murphy et al. 2014, Kapitel 7, S. 327-345 und Kapitel 9, S. 481-504).

### **1.1.2.2 Entwicklung des B- und T-Zell-Rezeptors**

Reife Lymphozyten besitzen einen funktionstüchtigen Lymphozytenrezeptor, der die Zelle charakterisiert und während der Reifung im Thymus bzw. im Knochenmark entwickelt wird.

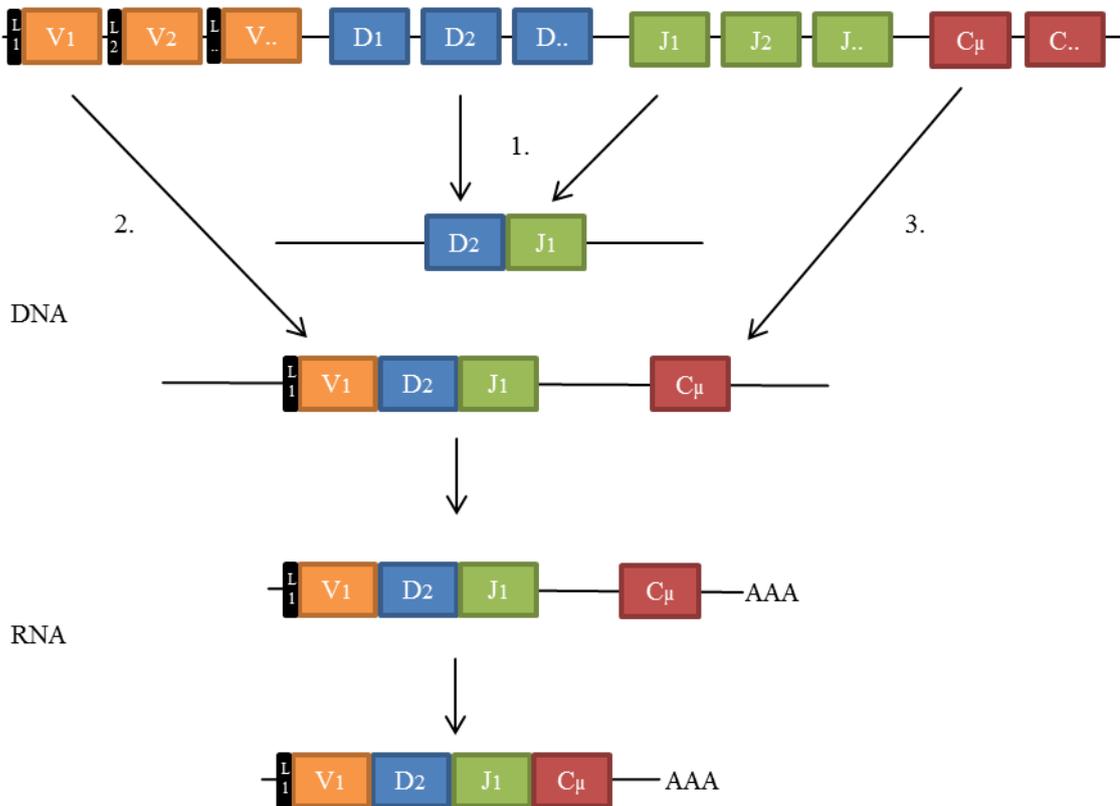
Der Lymphozytenrezeptor ist dabei jeweils auf ein spezielles Antigen angepasst und somit hochspezifisch. Ausdruck dieser Spezifität ist die DNA-Sequenz, die den Rezeptor kodiert (bzw. die daraus resultierende Aminosäuresequenz). Um diese Anpassung an ein Antigen zu erreichen, existiert ein Mechanismus, der in der T- als auch in der B-Zell-Rezeptorentwicklung teilweise sehr ähnlich ist. Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau beider Rezeptoren.



**Abb. 1.1: Schematischer Aufbau des Immunglobulins am Beispiel des sezernierten IgG (A) und des  $\alpha$ : $\beta$ -T-Zell-Rezeptors (B).** Das Immunglobulin besteht aus variablen Domänen (VH bzw. VL), welche zuständig für die Antigenerkennung sind, und konstanten Domänen (CH1-3 bzw. CL), die u.a. die Effektorfunktion festlegen. Während die konstante Domäne der leichten Kette nur einen Abschnitt besitzt und mit dem komplementären Teil der schweren Kette über eine Disulfidbrücke verbunden ist, hat letztere mehrere konstante Anteile. Im Übergang von CH1 zu CH2 bilden sie eine Gelenkregion, die wiederum Disulfidverbindungen zum anderen Arm des Immunglobulins aufbauen. Die Domänen VH/CH1 werden zusammen mit den Domänen VL/CL auch als *Fragment antigen-binding* (Fab), die CH2/CH3-Domänen auch als *Fragment crystallizable* (Fc) bezeichnet. Im Gegensatz zum Immunglobulin kann der T-Zell-Rezeptor nicht in sezernierter Form vorliegen. Er setzt sich aus den variablen Domänen der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette (V $\alpha$  bzw. V $\beta$ ) und der jeweiligen konstanten Domäne (C $\alpha$  bzw. C $\beta$ ) zusammen, welche in der Zellmembran verankert sind. Die mehrfarbigen Bereiche der variablen Domänen beider Lymphozytenrezeptoren stehen für die V(D)J-Rekombination, die in der variablen Region der jeweiligen Kette stattgefunden hat (modifiziert nach Lehrbuch von Murphy et al. 2014, Kapitel 3, S. 143-149, S. 157-158).

Immunglobuline bestehen (in der Form eines Monomers) aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Sie können gebunden an der Zelloberfläche vorliegen oder als Antikörper sezerniert werden. Jede Kette besteht aus einer variablen und einer konstanten Region (V- bzw. C-Region). Die C-Region der schweren Kette bestimmt die Immunglobulinklasse (IgG<sub>1-4</sub>, IgE, IgA<sub>1-2</sub>, IgD, IgM) und dadurch die Effektorfunktion des Antikörpers. Anhand der C-Region der leichten Kette kann die Zuordnung zur  $\lambda$ - oder  $\kappa$ -Kette getroffen werden, wobei ein Immunglobulin (als Monomer) entweder aus zwei  $\lambda$ - oder zwei  $\kappa$ -Ketten besteht. Die V-Regionen der schweren und der leichten Kette legen die Spezifität und die Antigenerkennung fest. Die V-Region setzt sich aus drei verschiedenen Genen zusammen, als V-, D- und J-Gen bezeichnet. D-Gene sind dabei nur bei der schweren Kette vorhanden. Von Ihnen existieren verschiedene Variationen. Die humanen Gene (haploid) sind in Tabelle 1.1 aufgelistet. Sie liegen für die leichten bzw. schweren Ketten an unterschiedlichen Orten im Genom. Im Zuge der sogenannten somatischen Rekombination wird jeweils ein V-Gen mit jeweils einem D- (bei der schweren Kette) und einem J-Gen kombiniert. Selten existieren D-D-Kombinationen (Briney et al. 2012; Hou et al. 2016b). Zunächst wird die schwere und daraufhin die leichte Kette umgelagert. Dabei lagert sich ein J-

mit einem D-Gen zusammen, diese werden anschließend mit einem V-Gen kombiniert (Abb. 1.2). Das V-Gen ist mit einer *Leader*-Peptid-Sequenz kombiniert, die für die weitere Prozessierung in der Zelle notwendig ist und nur auf mRNA-Ebene, nicht jedoch im fertigen Protein vorhanden ist.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der somatischen Rekombination anhand des Beispiels der schweren Kette des Immunglobulins.** Dabei werden zunächst auf DNA-Ebene ein J- mit einem D-Gen, daraufhin mit einem V-Gen und der dazugehörigen *Leader*-Peptid-Sequenz kombiniert, die für die weitere Prozessierung in der Zelle notwendig ist. Zuletzt wird die konstante Region angefügt, die bei der schweren Kette die Effektorfunktion des Antikörpers festlegt. Beim primären RNA-Transkript werden die konstante Region und das J-Gen durch Spleißen zusammengebracht (modifiziert nach Murphy et al. 2014, Kapitel 4, S. 185).

B-Zellen besitzen zudem die Möglichkeit, in sekundären lymphatischen Organen ihrer Rezeptoraffinität zu erhöhen und die Effektorfunktion ihres Antikörpers durch einen Klassenwechsel zu ändern. Hat eine reife B-Zelle ein Antigen erkannt und ist in ein Keimzentrum gelangt, kann sie durch die sogenannte somatische Hypermutation ihre Affinität nochmals steigern. Vermittelt durch Signale von aktivierten T-Zellen werden Punktmutationen in den hypervariablen Regionen eingebracht. Dieser Vorgang führt entweder zur Zerstörung oder zur Verbesserung des Immunglobulins, sodass eine Selektion in Richtung hochaffiner B-Zellen

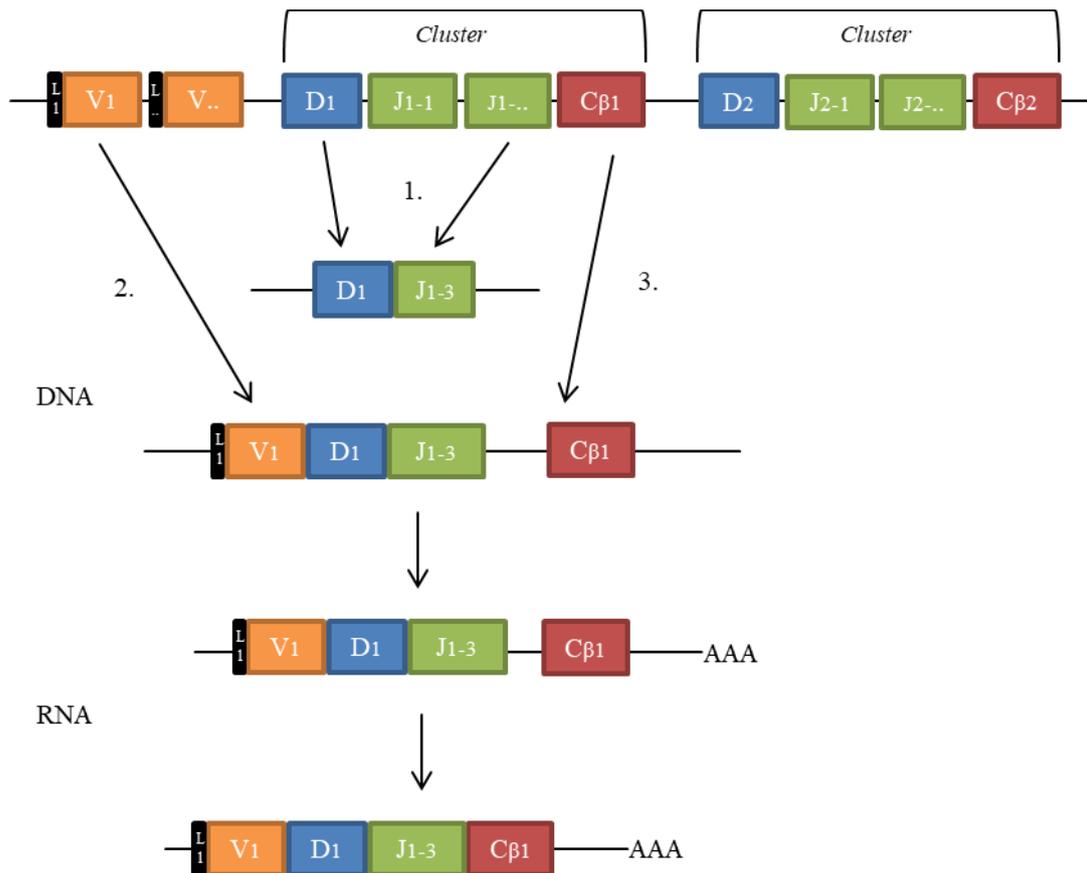
stattfindet. Zudem kann ein Klassenwechsel, auch als *Isotypenswitch* bezeichnet, stattfinden. Dabei findet ein Wechsel von der ursprünglichen Expression der Immunglobuline M und D zu IgE, IgA oder IgG statt.

Gene	Schwere Kette (Chrom. 14)	$\lambda$ -Kette (Chrom. 22)	$\kappa$ -Kette (Chrom. 2)	$\alpha$ -Kette (Chrom. 14)	$\beta$ -Kette (Chrom. 7)
V-Gene	40 <sub>1</sub> ; 38-46 <sub>2</sub>	30 <sub>1</sub> ; 29-33 <sub>2</sub>	40 <sub>1</sub> ; 34-38 oder 17-19 <sub>2</sub>	70-80 <sub>1</sub> ; 54 <sub>3</sub>	52 <sub>1</sub> ; 64-67 <sub>3</sub>
D-Gene	25 <sub>1</sub> ; 23 <sub>2</sub>	0 <sub>1,2</sub>	0 <sub>1,2</sub>	0 <sub>1,3</sub>	(D1, D2) <sub>1</sub> ; 2 <sub>3</sub>
J-Gene	6 <sub>1,2</sub>	(4*1) <sub>1</sub> ; 4-5 <sub>2</sub>	5 <sub>1,2</sub>	61 <sub>1,3</sub>	(J1*6; J2*7) <sub>1</sub> ; 14 <sub>3</sub>
Gen C- Region	(Ig $\mu$ , Ig $\delta$ , Ig $\epsilon$ , Ig $\gamma$ <sub>1-4</sub> , Ig $\alpha$ <sub>1-2</sub> ) <sub>1</sub> ; 9 <sub>2</sub>	4 <sub>1</sub> ; 4-5 <sub>2</sub>	1 <sub>1,2</sub>	1 <sub>1,3</sub>	2 <sub>1,3</sub>

**Tabelle 1.1: Anzahl funktioneller humaner Gene (haploid) der V-Region der schweren und leichten Ketten des BZR bzw. der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des TZR und die Varianten der jeweiligen C-Region.** Zusätzlich ist das Chromosom angegeben, auf dem sich der Locus der jeweiligen Kette befindet. Pseudogene, die kein funktionelles Protein ergeben, sind nicht aufgelistet. Auf dem Locus der  $\beta$ -Kette und der  $\lambda$ -Kette bilden J- und/oder D-Gene *Cluster* mit den verschiedenen Varianten der C-Gene. Somit entstehen bei der  $\beta$ -Kette zwei, bei der  $\lambda$ -Kette vier *Cluster*, was ebenfalls in der Tabelle durch (\*) vermerkt ist. Je nach Quellenangabe kann die Zahl der Gene variieren. ((1): Murphy et al. 2014, Kapitel 4, S.198-200; (2): Lefranc und Lefranc 2001a; (3): Lefranc und Lefranc 2001b, die beiden zuletzt genannten aktualisiert und zusammengefasst auf:

<http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/genetable/human/geneNumber.html>)

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Kette. (Auf die seltenen  $\gamma$ : $\delta$ -T-Zell-Rezeptoren wird hier nicht weiter eingegangen werden). Der  $\alpha$ : $\beta$ -TZR kann nur in gebundener Form an der Oberfläche des Lymphozyten vorliegen. Die  $\alpha$ -Kette setzt sich aus einem V-Gen, einem J-Gen und der konstanten Region zusammen. Die  $\beta$ - Kette besteht aus jeweils einem V-, D- und J-Gen und einer der zwei Varianten der konstanten Region. Die Varianten der Gene sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Auch der Ablauf der somatischen Rekombination ähnelt der Entwicklung des BZRs sehr. Dabei ist der Genlocus der  $\beta$ - Kette leicht anders aufgebaut, da hier D- und J-Gene in zwei verschiedenen *Clustern* zusammengefasst vorliegen (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der somatischen Rekombination der  $\beta$ - Kette des T-Zell-Rezeptors.** Die zwei Varianten des konstanten  $\beta$ -Segments bilden auf dem Genlocus mit einem D- und einigen J- Genen jeweils ein *Cluster*. Auch hier werden zunächst D- und J-Gen kombiniert, daraufhin folgt die Wahl des V-Gens und zum Schluss die konstante Region. Das primäre RNA-Transkript wird gespleißt, sodass in der fertigen mRNA die konstante Region dem J-Gen anliegt (modifiziert nach Murphy et al. 2014, Kapitel 4, S. 199)

Sowohl bei dem BZR als auch bei dem TZR gibt es Bereiche in der V-Region der Rezeptorsequenz, die weitestgehend konstant bleiben, während andere hochvariabel sind. Dabei existieren vier Gerüstregionen, die *framework regions* (FR1-4) und drei hypervariable Regionen, die sogenannten *complementarity determining regions* CDR1, CDR2 und CDR3. Während die CDR1 und CDR2 auf dem V-Gen kodiert liegen, deren Variabilität also zunächst genomisch festgelegt ist, ist die CDR3 dort lokalisiert, wo sich die V(D)J-Gene zusammenlagern (Abb. 1.4).

Damit hat die CDR3 eine Sonderrolle inne. Sie ist für die Variabilität des Rezeptors von besonderer Bedeutung und dadurch für die Antigenerkennung essenziell (Xu und Davis 2000).



**Abb. 1.4:** Verteilung der vier *framework regions* (FR) und der drei *complementarity determining regions* (CDR) über die variable Region einer Rezeptorsequenz am Beispiel einer schweren Kette des Ig bzw.  $\beta$ - Kette des TZR. Während die CDR1 und CDR2 im Genom des V-Gens kodiert liegen, kommt die CDR3 erst durch die somatische Rekombination zustande. Bei B-Zellen wird die Variabilität der CDRs durch die somatische Hypermutation im Rahmen der Affinitätsreifung nochmals erhöht (modifiziert nach Schroeder und Cavacini 2010 und Lehrbuch von Murphy et al. 2014, Kapitel 3, S. 151-152, Kapitel 4 S. 195-196).

Neben der kombinatorischen Vielfalt im Rahmen der somatischen Rekombination ergibt sich sowohl beim TZR- als auch beim BZR-Rearrangement durch das Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden eine noch höhere Variabilität. Beim Zusammensetzen der V-, D- und J-Gene werden durch das Anfügen von palindromischen Sequenzen (P-Nukleotide) oder von Nukleotiden, die keine DNA als Matrize haben (N-Nukleotide), Veränderungen der ursprünglichen genomischen Sequenz erzeugt, wodurch die Variabilität wiederum gesteigert wird. B-Zellen verändern ihre CDR nochmals durch die somatische Hypermutation in den Keimzentren und erhöhen damit zusätzlich die Variabilität. Dieser Prozess der Affinitätsreifung findet bei T-Zell-Rezeptoren nicht statt. Somit wird dadurch die Rolle der nicht im Genom definierten CDR3 für die Antigenerkennung noch deutlicher. (Für den Abschnitt vgl. Murphy et al. 2014, Kapitel 3-4, S. 141-223).

Bei immunologischen Analysen, die B- und T-Zellen betreffen, wird häufig von einem sogenannten Immunrepertoire gesprochen. Darauf soll im folgenden Abschnitt tiefer eingegangen werden.

### 1.1.3 Definition eines Immunrepertoires

Eine einheitliche Definition des Begriffs Immunrepertoire ist in der Literatur nicht zu finden. In Übersichtsarbeiten verschiedener Autoren werden leicht veränderte Definitionen dieses Begriffs verwendet. So wird das Immunrepertoire als die Ansammlung von Membran-durchspannenden Antigenrezeptor-Proteinen auf der Oberfläche der B- und T-Zellen bezeichnet (Benichou et al. 2012). Six et al. (2013) begriffen T- und B-Zell-Repertoires als Ansammlungen von Lymphozyten, die durch ihren Antigen-spezifischen Rezeptor charakterisiert sind. Hou et al.

(2016a) definierten das Immunrepertoire als Ansammlung von B- und T-Zellen mit funktioneller Diversität im Blutkreislauf zu einem bestimmten Zeitpunkt. Diese Definition kommt den Analysen dieser Arbeit am nächsten. Ergänzend wurde für die Bestimmung der funktionellen Diversität des Immunrepertoires die Rezeptorsequenz herangezogen. Diese wurde dabei im Besonderen durch die Sequenz der CDR3 der jeweiligen Kette des T-Zell- bzw. B-Zell-Rezeptors charakterisiert.

#### 1.1.4 Diversität des Immunrepertoires

Die funktionelle Diversität und die Vielfalt des Repertoires entstehen durch die im Abschnitt 1.1.2.2 beschriebenen Mechanismen: Darunter fallen die kombinatorische Diversität durch die Genumlagerungen, die junktionale Diversität durch das Einfügen von P- und N-Nukleotiden in der CDR3 und die kombinatorische Vielfalt durch die Verbindung der leichten mit den schweren Ketten bzw. einer  $\alpha$ - mit einer  $\beta$ -Kette. Zuletzt können B-Zellen durch die somatische Hypermutation zusätzlich ihr Immunglobulin verändern und somit die Diversität des Repertoires nochmals erhöhen (Murphy et al. 2014, Kapitel 4, S. 194).

Für die Schätzung der potentiellen Gesamtdiversität wird in vielen Arbeiten auf die Publikation von Davis und Bjorkman aus dem Jahre 1988 verwiesen (so z.B. Nikolich-Zugich et al. 2004; Miles et al. 2011; Yokota et al. 2017). Dabei wird die Diversität (ohne Berücksichtigung der somatischen Hypermutation) des BZR auf ca.  $10^{11}$  und des  $\alpha:\beta$ -TZR auf ca.  $10^{15}$  geschätzt. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass dieser Berechnung Gene aus dem Mäusegenom zugrunde liegen. Lehrbücher sprechen hingegen von einer humanen potentiellen Gesamtdiversität von ca.  $5 \cdot 10^{13}$  für den BZR (ohne somatische Hypermutation) und ca.  $10^{18}$  für den  $\alpha:\beta$ -TZR (Murphy et al. 2014, Kapitel 4, S. 200), die Schätzung einer anderen Übersichtsarbeit liegt für den  $\alpha:\beta$ -TZR in ähnlicher Größenordnung (Venturi et al. 2008).

Die tatsächliche biologisch existierende Vielfalt des menschlichen Immunrepertoires ist allerdings deutlich geringer als die statistisch mögliche Diversität. Eine ältere Publikation schätzte die untere Grenze des  $\alpha:\beta$ -Repertoires auf  $25 \cdot 10^6$  verschiedene TZR- $\beta$ -Ketten im Blut, wobei die Diversität für Gedächtnis-Zellen geringer angegeben wurde (ca.  $2 \cdot 10^5$ ) (Arstila et al. 1999). In einer neueren Publikation aus dem Jahr 2009 wurde mittels NGS das periphere humane Immunrepertoire für Subpopulationen bevor und nach Antigenkontakt von CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen zweier Patienten analysiert. Die untere Grenze unterschiedlicher Sequenzen für das TZR- $\beta$ -Repertoire für Klone nach Antigenkontakt wurde auf größer als  $10^5$ , für Klone vor Antigenkontakt auf größer als  $10^6$  geschätzt. Für T-Zellen nach Antigenkontakt, ohne Berücksichtigung ob CD4 oder CD8, wurde die Diversität mit mindestens  $1,4 \cdot 10^6$

unterschiedlichen TZR- $\beta$ -Sequenzen angegeben. Dabei könnte die Verknüpfung der  $\beta$ -Kette mit unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten die reale Diversität des heterodimeren T-Zell-Rezeptors potentiell erhöhen (Robins et al. 2009).

Die Bestimmung der Antikörperdiversität gestaltet sich als noch komplexer. Arnaout et al. (2011) gaben eine Gesamtdiversität der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors des Blutes (ohne Unterscheidung in Isotypen und charakterisiert durch die CDR3) von  $3\text{-}9 \cdot 10^6$  an. Vollmers et al. (2013) erhielten aus *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMC)-Proben eine ähnliche Schätzung unterschiedlicher schwerer Ketten des BZR im menschlichen Blut von durchschnittlich  $1,5 \cdot 10^6$ . Die Autoren berechneten diese Diversität jedoch nochmals in veränderter Art und Weise. Sie teilten ihre Sequenzen nach Häufigkeit in zwei Gruppen. Sequenzen, die nur in geringer Frequenz vorkamen, wurden naiven B-Zellen, Sequenzen, die einen größeren Anteil am Repertoire hatten, wurden expandierten, aktivierten B-Zellen zugeordnet. Innerhalb dieser Gruppen wurde zudem nach dem jeweiligen Isotyp unterschieden. Dabei ergab sich innerhalb des aktivierten Kompartiments eine unerwartet geringe Schätzung von ca. 25.000 unterschiedlichen B-Zell-Klonen, worunter sich nur ca. 12% IgG tragende Klone befanden. Gering vorkommende Sequenzen vom Typ IgM, also von den Autoren dem naiven Kompartiment zugeordnet, machten nun die geschätzte Mehrheit (im Bereich  $5,1 \cdot 10^6$ ) aus, sodass allein die Diversität dieser Zellen die Gesamtdiversität der vorigen Berechnung sogar überschritt.

Die wirkliche durchschnittliche biologische Gesamtdiversität des Immunrepertoires müssen weitere Analysen zeigen. Was aber deutlich wird, ist, dass es Möglichkeiten geben muss, bis zu Millionen Zellen zur selben Zeit analysieren zu können, um wirklich einen aussagekräftigen Ausschnitt des Gesamtrepertoires zu erhalten und interpretieren zu können. Da die funktionelle Diversität über den Lymphozytenrezeptor der B- bzw. T-Zellen definiert ist, sind Sequenzierungstechniken notwendig, die diese Massen an Rezeptorsequenzen verarbeiten können. Dabei hat die Entwicklung des sogenannten *Next-Generation Sequencing* das Tor für tiefe Analysen des Immunrepertoires weit aufgeschlagen.

## **1.2 Von der Sanger-Sequenzierung zu *Next-Generation Sequencing***

### **1.2.1 Sanger-Sequenzierung**

In den 1960/70er Jahren wurden die ersten Sequenzierungstechnologien entwickelt, darunter auch die wahrscheinlich relevanteste, von Frederick Sanger veröffentlichte Technik aus dem Jahr 1975, die sogenannte Kettenabbruchmethode. Durch Zugabe von Nukleotiden und basenspezifischen, radioaktiv markierten Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTP), die beim Einbau in den

DNA-Strang zum Abbruch der Reaktion führten, konnte auf einem Polyacrylamid-Gel durch die unterschiedliche Länge der Fragmente und die jeweilige Markierung auf die Ursprungssequenz geschlossen werden (Sanger und Coulson 1975; Sanger et al. 1977). Diese Technik wurde weiterentwickelt und die radioaktiven durch fluoreszenzmarkierte Nukleotide ersetzt (Smith et al. 1986). Heutzutage wird die Analyse mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt (Luckey et al. 1990; Swerdlow und Gesteland 1990).

### **1.2.2 Next-Generation Sequencing**

Die neue Generation von Sequenzierungstechniken besitzt viele Synonyme: *Next-Generation Sequencing* (NGS), *High-Throuput Sequencing* (HTS) oder *Massive-Parallel Sequencing* (MPS). Sie zeichnen sich im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung durch die Möglichkeit der parallelen Sequenzierung von DNA-Strängen und die dadurch resultierende erhöhte Menge an sequenzierten Basen pro Lauf aus.

Aktuelle Sequenzierungstechnologien, die die Sanger-Methode nutzen, können eine Sequenzierungsleistung pro Lauf erbringen, die im Kilo- bis Mega-Basen Bereich liegt (vgl. z.B. Angaben des Herstellers Thermo Fisher Scientific: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/brochure-ab-genetic-analyzers.pdf>).

NGS-Techniken können diese Leistung um das 1000fache oder mehr überbieten. Dabei sind aktuell verschiedene Systeme in Benutzung. Einig ist ihnen, dass für die Sequenzierung eine sogenannte *Library*-Präparation vorangehen muss, damit die verschiedenen Systeme eine Sequenzierung überhaupt durchführen. Dabei werden dem zu sequenzierenden DNA-Fragment Adaptersequenzen mittels PCR oder Ligation angehängen. Die Art der Sequenzierung selbst unterscheidet sich zwischen den einzelnen Systemen deutlich. Gängige und für eine Immunrepertoireanalyse relevante Technologien seien hier kurz vorgestellt.

#### **1.2.2.1 Roche 454 GS FLX**

Roche entwickelte mit der 454-Technologie als einer der ersten eine NGS-Technik. Sie wurde auch als „*Pyrosequencing*“ bezeichnet. Mittels einer Emulsions-PCR wurden DNA-Fragmente auf speziellen *Beads* angereichert und diese in Massen gleichzeitig sequenziert. Verschiedene enzymatische Reaktionen führten bei jedem *Bead* zu Lichtemissionen, die mittels einer Kamera detektiert wurden. Damit konnte auf die Basenabfolge der gewünschten Sequenz geschlossen werden (Margulies et al. 2005). Der Konzern kündigte jedoch 2013 an, ab Mitte 2016 die 454-

Technologie nicht weiter zu unterstützen (<https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business>), sodass nicht tiefer auf technische Details dieser Methode eingegangen wird. In aktuellen Publikationen kommen andere Systeme zum Einsatz.

### 1.2.2.2 Thermo Fisher Scientific *Ion Torrent PGM*

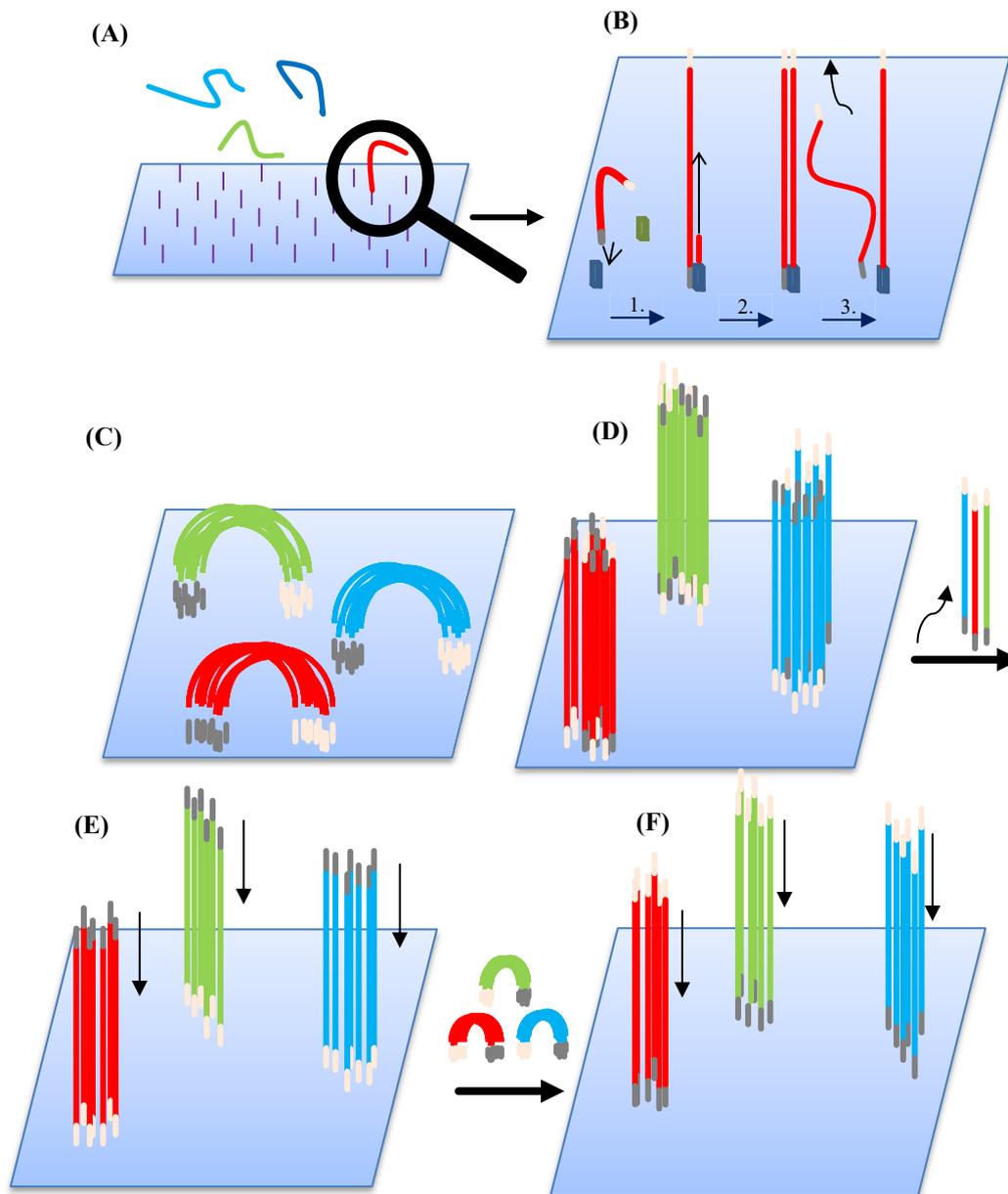
Eine andere Technik, die aktuell zur Verfügung steht, ist das Halbleitersystem von Thermo Fisher Scientific, die „*Ion Torrent Personal Genome Machine*“. Für die *Library*-Präparation wird entweder genomische DNA fragmentiert oder es werden in einer PCR die gewünschten Amplikons erstellt. Diese werden mit einem Adapter versehen, was gewöhnlich über eine Ligationsreaktion erfolgt. Darauf werden auch bei dieser Methode die DNA-Fragmente in einer Emulsions-PCR an speziellen *Beads* vervielfältigt und auf einen Chip geladen. In ihm sind Vertiefungen, sodass je ein angereicherter *Bead* in solch eine Vertiefung (*Well*) passt. Hierauf vollzieht sich dann die Sequenzierung. Dabei findet ein Sequenzierung-durch-Synthese Verfahren statt, bei dem jeweils eine der vier Basen hintereinander eingebaut wird. Wird die komplementäre Base zum gewünschten DNA-Fragment eingebaut, wird durch die Hydrolyse des Triphosphats des eingebauten Nukleotids ein Proton frei. Die Besonderheit der Halbleitertechnologie ist es, dass hier nicht indirekt der Einbau der Base dargestellt wird (z.B. durch eine Lichtemission über eine enzymatische Reaktion wie in Abschnitt 1.2.2.1 beschrieben), sondern dass direkt die Veränderung des pH-Werts gemessen wird und damit Rückschlüsse gezogen werden können, ob und wie viele Basen eingebaut wurden (Rothberg et al. 2011). Dabei sind laut Herstellerangaben je nach Reagenz und eingesetzten Material bis zu 2 Gigabasen pro Durchlauf möglich (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PGM-Specification-Sheet.pdf>).

### 1.2.2.3 Illumina MiSeq

Die Sequenzierungstechnologie des Illumina MiSeq unterscheidet sich zu beiden vorher erwähnten. Die DNA-Fragmente werden nicht in einer Emulsions-PCR auf einem *Bead* vervielfältigt, sondern direkt auf einer Flusszelle, der sogenannten *Flow cell*, auf der auch die Sequenzierung stattfindet. Während der *Library*-Präparation werden den DNA-Fragmenten Adaptersequenzen angefügt. Das geschieht für gewöhnlich (ähnlich wie im Abschnitt 1.2.2.2 erwähnt) über eine Ligationsreaktion. Die Adaptersequenzen sind an beiden Enden verschieden und besitzen Bindungsstellen sowohl für die Bindung an die *Flow cell* als auch für verschiedene *Primer*, die sowohl zur Vervielfältigung als auch zur Sequenzierung auf der *Flow cell* dienen. Die fertige *Library* kann nun mit einem Ende auf der *Flow cell* binden, auf der die spätere

Sequenzierung stattfindet und auf der zwei verschiedene Oligonukleotide als Bindungsstelle integriert vorliegen. Nach der Bindung wird der Strang auf dem gebundenen Oligonukleotid vervielfältigt. Daraufhin wird der entstandene Doppelstrang denaturiert und der originale DNA-Strang weggewaschen, sodass nur der komplementäre Strang auf der *Flow cell* gebunden vorliegt. Dieser ist nun fest an die *Flow cell* gebunden (Abb. 1.5, (B)). Daraufhin kann das freie Ende des Einzelstrangs ebenso an das andere Oligonukleotid auf der *Flow cell* binden, was dem Bild einer Brücke ähnelt. Dieser Strang wird im Zuge einer als „*Bridge-Amplifikation*“ bezeichneten Prozedur vervielfältigt (Abb. 1.5, (C)). Daraufhin liegen zwei Einzelstränge vor, die jeweils an einem der beiden verschiedenen Oligonukleotide gebunden sind. Diese beugen sich wiederum mit ihrem freien Ende zu ihrem jeweiligen freien Oligonukleotid und die *Bridge-Amplifikation* beginnt von neuem. Die Wiederholung dieser Prozedur führt zu einer sogenannten *Cluster-Bildung* und damit zu einem stärkeren Signal. Nach Ende dieses Vorgangs werden zunächst die *Reverse-Stränge* entfernt (Abb. 1.5, (D)), sodass die erste Sequenzierung mit dem *Forward-Strang* beginnen kann (Abb. 1.5, (E)). Für die Sequenzierung wird eine *Sequencing-by-Synthesis-Technologie* genutzt. Dabei werden unterschiedlich fluoreszierende Nukleotide (TCAG) verwendet, die nach jedem Einbau zum reversiblen Abbruch der Synthese führen. Mittels Laser wird der jeweilige Einbau des Nukleotids identifiziert und damit auf die Sequenz geschlossen. Nach chemischer Entfernung der Fluoreszenz und des zum Abbruch führenden Anhangs beginnt der Zyklus von neuem. Ist der *Forward-Strang* sequenziert und liegt durch das Syntheseverfahren nun als Doppelstrang vor, wird der durch die Synthese entstandene Strang wiederum denaturiert und weggewaschen. Der Einzelstrang bindet nun mit dem freien Ende an das freie Oligonukleotid auf der *Flow cell* und wird darauf vervielfältigt. Dabei bildet sich der *Reverse-Strang* auf der *Flow cell*. Der originale *Forward-Strang* wird entfernt und die Sequenzierung des zweiten Durchgangs beginnt (Abb. 1.5, (F)) (Bentley et al. 2008).

Für die Identifikation der Proben können Barcodes in die Adaptersequenzen integriert werden (Craig et al. 2008). Auch Techniken mit zwei Barcodes wurden entwickelt (Kozich et al. 2013). Laut Herstellerangaben sind mit dem Illumina Miseq je nach Reagenz zwischen 7,5 und 15 Gigabasen oder 12-25 Millionen Single- bzw. 24-50 Millionen *Paired-End-Reads* möglich ([https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_miseq.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_miseq.pdf)).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der auf der *Flow cell* ablaufenden Prozesse.** Gelangt ein Einzelstrang auf die *Flow cell* (A), binden die einzelnen Amplikons mit einem Ende an eines von zwei verschiedenen Oligonukleotiden auf der *Flow cell* (B). Ein komplementärer Strang wird an dieses erste Oligonukleotid gebaut, der generierte Doppelstrang denaturiert und der Originalstrang gewegewaschen. Dann erfolgt mittels PCR eine Vervielfältigung der Amplikons auf der *Flow cell*, die *Bridge-Amplifikation*, indem der Einzelstrang an das zweite Oligonukleotid auf der *Flow cell* bindet (C). Dieser Vorgang wiederholt sich vielfach. Dabei bilden sich sogenannte *Cluster* von Einzelsträngen. Nach Abschluss der Amplifikation werden die *Reverse*-Stränge gewegewaschen, sodass nur noch der *Forward* Strang vorliegt (D). Dieser wird zunächst sequenziert (E). Nach Abschluss binden die Stränge wieder an das komplementäre Oligonukleotid, werden dort einmal vervielfältigt, denaturiert und der Originalstrang wieder gewegewaschen, sodass nun die Einzelstrang-Situation wie in (E) vorliegt, nur dass jetzt der *Reverse*-Strang als Grundlage der Sequenzierung dient (F). Jede Seite, als *Read* bezeichnet, kann später in der bioinformatischen Auswertung zusammengefügt werden (modifiziert nach Bentley et al. 2008).

### 1.2.3 Aktuelle Anwendungen

Die NGS-Technik erhält nach und nach Einzug in viele Forschungsbereiche.

Dabei kann die Technologie zum Nachweis von genetischen Mutationen in verschiedenen Erkrankungen genutzt werden. So gibt es Anwendungen für die Identifikation von Mutationen in BRAC1 und BRAC2, die beispielsweise das Risiko für maligne Tumore erhöhen (Costa et al. 2013), oder Mutationen in der DNA-Sequenz von CFTR identifizieren, die zu einer zystischen Fibrose führen (Loukas et al. 2015) und daher von hoher klinischer Relevanz sind. Außerdem kann die Technik zur Sequenzierung des Genoms unterschiedlichster Organismen, von RNA-Viren (Batty et al. 2013) bis hin zu Pflanzen (Wu et al. 2014) genutzt werden.

Des Weiteren gewinnt die NGS-Technik für Analysen des Immunrepertoires an großer Wichtigkeit. Im Gegensatz zu den vorherigen Techniken wie der Sanger-Sequenzierung, bei der man sich auf einzelne Zellen beschränken musste, können nun tausende Zellen gleichzeitig sequenziert und somit ein großer Ausschnitt des Immunrepertoires betrachtet werden. Wurde beispielsweise ein *Pool* an Amplikons mittels PCR aus einer Population von tausenden Zellen generiert, wird theoretisch jedes dieser Amplikons einzeln sequenziert (z.B. auf einem *Bead* oder auf einer *Flow cell*). Dies kann die Möglichkeit bieten, das Rezeptorrepertoire im Detail darzustellen. Im Bereich der onkologischen Hämatologie wird dies genutzt, um Auffälligkeiten im Immunrepertoire zu erkennen bzw. dabei malignomsuspekte Immunglobulinsequenzen als sensitive Biomarker und zum Monitoring für die Krankheitsentwicklung zu testen (Faham et al. 2012; Kurtz et al. 2015). Mithilfe der Analyse soll frühzeitig auf einen Krankheitsrückfall reagiert werden können. Auch im Rahmen von T-Zell-Malignomen werden Techniken der Rezeptoranalyse für die Entdeckung von Klonalität immer weiterentwickelt (Ruggiero et al. 2015). Bei viralen Infektionen kam die NGS-Technologie für die Entdeckung und Verfolgung relevanter T-Zell-Klone zum Einsatz (Dziubianau et al. 2013), so auch um Antigen-spezifische T-Zellen zu identifizieren (Estorninho et al. 2013). Zudem ermöglichte die Anwendung der NGS-Technologie, Zusammenhänge zwischen der Diversität des T-Zell-Rezeptorrepertoires und zunehmendem Alter zu entdecken und damit tiefere Einblicke in die Immunologie zu erhalten. Dabei offenbarte die Technik, dass Rezeptorsequenzen selbst interindividuell identisch sein können (Britanova et al. 2014).

Die Gesamtheit von B- und T-Zellen bzw. ihr molekularbiologisches Korrelat in Form des jeweiligen Rezeptorrepertoires können auch Aufschluss im Hinblick auf neurologische Erkrankungen liefern. Die folgenden Abschnitte sollen zunächst die neurologische Erkrankung erläutern und daraufhin die Frage beantworten, welchen konkreten Erkenntnisgewinn die NGS-Technologie liefern könnte.

## 1.3 Multiple Sklerose und deren Behandlung mit Fingolimod

### 1.3.1 Allgemeines zur Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie geht einher mit Ödemen, Demyelinisierung und konsekutiver Schädigung von Axonen im ZNS. Dadurch kommt es zu vielfältigen vorübergehenden oder persistierenden Symptomen. Darunter fallen unter anderem Sehstörungen, sensorische, motorische und kognitive Einschränkungen sowie Fehler in der Blasen- und Sexualfunktion. Die Erkrankung betrifft vorwiegend junge Erwachsene, darunter insgesamt häufiger Frauen als Männer (zusammengefasst u.a. in: Sospedra und Martin 2005; Compston und Coles 2008; Martin et al. 2016). Neben Alter und Geschlecht spielen weitere Risikofaktoren wie die genetische Disposition (Sawcer et al. 2011) und die geographische Lage eine Rolle (Koch-Henriksen und Sørensen 2010).

### 1.3.2 Klinische Einteilung der MS und Diagnosestellung

Die 1996 zunächst eingeführten Einteilungen der Multiplen Sklerose wurden 2013 überarbeitet und sehen aktuell folgende Unterscheidungen vor: *clinically isolated syndrome* (CIS), *relapsing-remitting multiple sclerosis* (RRMS), *secondary progressive multiple sclerosis* (SPMS) und *primary progressive multiple sclerosis* (PPMS) (Lublin und Reingold 1996; Lublin et al. 2014). Die mit Abstand häufigste Form ist die schubförmige RRMS, welche zunächst mit Verbesserungen nach einem Schub einhergeht, jedoch nach und nach zu bleibenden Schäden führt. Über einen langjährigen Krankheitsverlauf kann diese Erkrankung in eine SPMS mit einem eher kontinuierlichen Krankheitsprogress übergehen. Ein kleiner Teil der Erkrankten erleidet keine Schübe, sondern entwickelt direkt bleibende Schäden ohne Verbesserungen der Symptomatik, was dann als PPMS bezeichnet wird (vgl. Übersichtsarbeit von Martin et al. 2016). Die klinischen Einschränkungen, die während der Erkrankung auftreten, werden häufig mit dem *Expanded disability status scale* (EDSS) (Kurtzke 1983) bestimmt.

Für die Diagnosestellung werden die revidierten McDonald-Kriterien genutzt. Dabei berücksichtigen sie die klinische Ausprägung, radiologische Gegebenheiten, Hinweise für sogenannte oligoklonale Banden in der isoelektrischen Fokussierung bzw. eine IgG-Erhöhung im Liquor sowie die örtliche und zeitliche Disseminierung für die Diagnose einer MS (McDonald et al. 2001; Polman et al. 2005; Polman et al. 2011). Für die aktuelle Überarbeitung der

Diagnosekriterien, die für diese Arbeit noch nicht zur Verfügung standen, siehe Thompson et al. (2018).

### 1.3.3 Immunologische Akteure

Bei der Entstehung der MS sind verschiedene Zellen des Immunsystems involviert, allerdings bleiben die Ursache bzw. der Auslöser der Autoimmunität noch weitgehend unverstanden. Jedoch wächst das Verständnis über die Rolle der verschiedenen Immunzellen stetig. Die Entdeckung, dass MS-Patienten eine größere Anzahl und ein erhöhtes Aktivitätsniveau von Myelin-spezifischen CD4(+)-T-Zellen besitzen (Chou et al. 1992; Zhang et al. 1994), führte zunächst zu der Annahme, dass Subtypen von CD4(+)-T-Zellen Hauptverursacher der MS seien. Dabei unterstützte auch das Tiermodell der MS, die „*experimental allergic encephalomyelitis*“ (EAE), diese These, da die EAE entweder durch CD4(+)-T-Zellen, die auf Myelin „abgerichtet“ werden, ausgelöst (Stromnes und Goverman 2006a) oder auch durch die direkte Transplantation aktivierter CD4(+)-T-Zellen von einem kranken in ein gesundes Tier verursacht werden kann (Stromnes und Goverman 2006b). Viglietta et al. (2004) zeigten hingegen, dass neben autoimmunen Eigenschaften einiger T-Zellen zugleich auch eine Einschränkung der regulatorischen Funktion einer CD4-Subpopulation besteht, was zusätzlich die Homöostase des Immunsystems bei MS-Patienten negativ beeinflussen könnte. Aber auch CD8(+)-T-Zellen scheinen ihre Rolle in der multiplen Sklerose zu spielen. Dabei konnte in organotypischen Schnittkulturen des Mäusehirns gezeigt werden, dass zytotoxische T-Zellen neben der Zerstörung des Myelins auch Schäden am Axon verursachen (Sobottka et al. 2009). Bei der Charakterisierung von MS-Läsionen des Gehirns zeigte sich zudem, dass diese vorwiegend durch CD8(+)-T-Zellen bestimmt wurden und diese oligoklonalen Charakter besaßen (Babbe et al. 2000). CD8(+)-T-Zell-Klone aus den MS-Läsionen des Gehirns wurden auch in anderen Kompartimenten wiedergefunden (sowohl im Liquor und im peripheren Blut) und persistierten über Jahre hinweg (Skulina et al. 2004), womit man auch diesen Zellen eine besondere Rolle innerhalb der Erkrankung zusprechen könnte.

Zellen der B-Zell-Reihe sind unter anderem für das Auftreten sogenannter oligoklonaler Banden verantwortlich, welche Ausdruck einer intrathekalen Immunglobulinsynthese sind (Walsh et al. 1985). In Studien, bei denen Patienten mit Rituximab, einem monoklonalen chimären Antikörper gegen CD20, behandelt wurden, wurde fast die gesamte B-Zell-Reihe depletiert. Obwohl diese spezielle immunmodulatorische Behandlung keinen direkten Einfluss auf Plasmazellen und die Antikörperkonzentration zu haben scheint, waren trotz dessen klinische Verbesserungen zu verzeichnen (Hauser et al. 2008). Diese Beobachtungen deuteten eine weitere Funktion der B-

Zellen in der MS-Pathogenese an und zeigen, dass diese nicht nur der Antikörperproduktion dienen. Harp et al. (2010) vermuten eine potentielle Rolle der B-Zellen in der Aktivierung der T-Zellen, wodurch eine autoimmune Entzündungsreaktion weiter aufrechterhalten werden könnte.

Die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ist bei MS-Patienten gestört (Gay und Esiri 1991), was unter anderem die Migration von Immunzellen vom Blut in das Liquorsystem ermöglicht (für detailliertere Information siehe Übersichtsarbeit von Ortiz et al. 2014). Dabei zeigten Bahbouhi et al. (2009), dass T-Lymphozyten von MS-Patienten gesteigerte Migrationsfähigkeit im Vergleich zu T-Lymphozyten von gesunden Spendern besitzen. Die Verwendung der NGS Technologie in neueren Studien führte zu Ergebnissen, die für die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke in beide Richtungen sprechen. Dabei wurden die schweren Ketten des IgGs in Blut und Liquor analysiert. Die Auswertungen zeigten einen Austausch in beide Richtungen und des Weiteren eine Reifung in beiden Kompartimenten (Büdingen et al. 2012). CD8(+)-T-Zellen mit gleicher Rezeptorsequenz konnten zwischen den verschiedenen Kompartimenten (MS-Läsionen, Liquor und Blut) mittels einer Kombination verschiedener Methoden nachgewiesen werden (Salou et al. 2015), sodass eine Verbindung zwischen der peripheren und der zentralen CD8(+)-T-Zell-Population bei der MS, ähnlich bereits bei Skulina et al. (2004) erwähnt, bestätigt werden konnte. Unter Betrachtung des Rezeptorrepertoires von T-Zellen von MS-Patienten konnte mittels *CDR3-Spectratyping* Expansionen von Klonen mit einem speziellen V $\beta$ -Gen gezeigt werden (Matsumoto et al. 2003). Aufgrund der Bevorzugung einzelner V $\beta$ -Gene bei T-Zell-Klonen von MS-Patienten, analysiert ebenfalls mittels *CDR3-Spectratyping*, vermutete eine Studie einen Zusammenhang zwischen der Einschränkung des Rezeptorrepertoires und dem Auftreten von MRT-Läsionen (als Ausdruck der Krankheitsprogredienz) (Laplaud et al. 2006).

Die hochkomplexe Immunologie dieser Erkrankung zu verstehen, wird noch viele Jahre Gegenstand der Forschung sein. Dabei können neuere immunmodulatorische Behandlungsmethoden neben der klinischen Verbesserung für Patienten auch durch ihre spezialisierte Wirkung dabei helfen, das Verständnis für Ursache und Wirkung der verschiedenen Immunzellen zu erweitern. Eine dieser immunmodulatorischen Optionen soll im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

### **1.3.4 Entwicklung, Wirkprinzip und Anwendung von Fingolimod (FTY720)**

Fingolimod bzw. FTY720 (vertrieben unter dem Handelsnamen Gilenya® von dem Unternehmen Novartis) ist eine chemische Modifikation von ISP-1/Myriocin, ein Metabolit des Pilzes *Isaria sinclairii* (Fujita et al. 1994; Adachi et al. 1995). Fingolimod galt als das erste orale, für die MS

zugelassene Medikament mit immunmodulatorischer Wirkung (vgl. Übersichtsarbeit von Brinkmann et al. 2010). Im Laufe der Jahre nahm das Wissen über die Beeinflussung des Immunsystems immer weiter zu. Bekannt ist derzeit, dass die phosphorylierte Form von Fingolimod als Agonist am Sphingosin-1-Phosphat/(S1P)-Rezeptor fungiert und an vier von fünf Subtypen dieses Rezeptors bindet (Brinkmann et al. 2002; Mandala et al. 2002). Als Agonist des S1P<sub>1</sub>-Subtyps, welcher für den Austritt der T-Lymphozyten aus dem Thymus und den sekundären lymphatischen Organen verantwortlich ist, bewirkt Fingolimod eine Internalisierung dieses Rezeptors. Dies führt zu einer verminderten Expression des Rezeptors. Dadurch werden die Lymphozyten teilweise gehindert, den Thymus und periphere lymphatische Organe zu verlassen (Matloubian et al. 2004; Brinkmann et al. 2004). Die Funktionalität der Immunzellen scheint dabei unbeeinträchtigt zu bleiben (Brinkmann et al. 2001). Die Wirkung von Fingolimod führt messbar zu einer Reduktion der Lymphozytenzahl im peripheren Blut und zu einer veränderten Zusammensetzung der T- und B-Zell-Subpopulationen, da nur spezielle Subpopulationen der CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen bzw. der B-Zellen beeinflusst werden (Mehling et al. 2008; Miyazaki et al. 2014; Nakamura et al. 2014). Auf die mögliche Beeinflussung anderer Organsysteme und die Wirkung auf u.a. das Endothel und das ZNS wird hier nicht weiter eingegangen und ist unter anderem in folgenden Übersichtsarbeiten nachzulesen: Adachi und Chiba (2007), Klatt et al. (2007); Brinkmann (2009); Chun und Hartung (2010); Brinkmann et al. (2010); Chun und Brinkmann (2011).

Für die Behandlung der RRMS mit diesem „atypischen Immunsuppressivum“ sind bereits Ergebnisse aus großen Phase-III-Studien wie der FREEDOMS- (Kappos et al. 2010) und der TRANSFORMS-Studie (Cohen et al. 2010) und ihren jeweiligen Langzeitbeobachtungen (Kappos et al. 2015; Cohen et al. 2016) vorhanden. Sie konnten eine Verbesserung der Schubrate und der im MRT sichtbaren Läsionen im Vergleich zu Placebo bzw. IFN- $\beta$ -Therapie zeigen. Weitere Analysen ergaben einen therapeutischen Nutzen unter einer täglichen oralen Dosis von 0,5mg FTY720 (Agius et al. 2014). Eine systematische Metadatenanalyse der *Cochrane Library* bestätigte eine Reduktion der Entzündungsaktivität, konnte aber nur eine schwache oder keine Wirkung auf den Progress der Behinderung nachweisen. Zu dem Risiko/Nutzen-Profil im Vergleich zu einer IFN- $\beta$ -Therapie konnten sich die Autoren aufgrund der zugrundeliegenden Datenlage nicht abschließend äußern (La Mantia et al. 2016).

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

### **1.4.1 Etablierung und Durchführung einer NGS-unterstützten Immunrepertoireanalyse von T- und B-Zellen**

Der Fokus dieser Arbeit liegt zunächst darauf, den experimentellen Ablauf für die Immunrepertoireanalyse der  $\beta$ -Kette des TZR und der schweren Kette des IgG mithilfe des NGS zu etablieren, auftretende Probleme zu beschreiben und zu diskutieren. Daraufhin soll gezeigt werden, ob diese Art der Analyse für die untenstehende Fragestellung bei der Multiplen Sklerose geeignet ist. Die Ergebnisse mit kleinen Fallzahlen sollen zeigen, ob damit interessante Aspekte zum Vorschein kommen und somit eine weitere, tiefergehende Forschung mit der Methode sinnvoll ist.

### **1.4.2 Verhalten des T-Zell-Rezeptor-Repertoires von Patienten mit Multipler Sklerose unter Behandlung mit Fingolimod**

Wie in den vorherigen Abschnitten bereits erläutert, sind viele Immunzellen bei der Multiplen Sklerose beteiligt. Für die Behandlung der RRMS steht FTY720 zur Verfügung. Dabei hat das Medikament eine sehr spezielle Wirkung auf die Immunzellen, dessen Auswirkungen auf das periphere Rezeptorrepertoire sind aber noch weitgehend unbekannt. Welchen Einfluss Fingolimod auf das TZR- $\beta$ -Repertoire von CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen hat, soll an zwei Patientenproben vor und nach sechsmonatiger Behandlung mit diesem Immunmodulator gezeigt werden. Dabei könnten weitere Hinweise auf die Akteure der Erkrankung erlangt und mögliche neue Biomarker identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden:

### 2.1 Patientenmaterial

Nach positiver Bewertung der Ethikkommission (Studennummer MC-LKP-553; EudraCT-Nummer: 2011-005732-25; Prüfplancode: Fingo\_HHU) und schriftlicher Einwilligung wurde Patienten mit diagnostizierter RRMS Blut abgenommen. Alle Patienten befanden sich in Behandlung mit dem Medikament Fingolimod. Aus dem Blut wurden PBMCs nach Protokollen des Instituts isoliert. In dieser Arbeit wurden PBMCs zweier Frauen im Alter von 48 und 57 Jahren (zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme) untersucht. Der erste Untersuchungszeitpunkt war vor Beginn der Behandlung (VB), der zweite Untersuchungszeitpunkt nach einem halben Jahr Therapie mit Fingolimod (6Mo).

### 2.2 Durchflusszytometrie

Antigen (human)	Fluoreszenz	Klon	Wirt	Isotyp	Firma	Katalog Nummer	Konzentration
CD3	PE	UCHT1	Maus	IgG1	Beckman Coulter®, Brea, Kalifornien, USA	A07747	1:11
CD4	FITC	RPA-T4	Maus	IgG1, κ	BD Pharmingen™, San Jose, Kalifornien, USA	555346	1:11
CD8	PE/Cy7	SK1	Maus	IgG1, κ	BioLegend®, San Diego, Kalifornien, USA	344712	1:22
CD19	PE/Cy5	HIB19	Maus	IgG1, κ	BioLegend®, San Diego, Kalifornien, USA	302210	1:22

CD27	APC/Cy7	O323	Maus	IgG1, $\kappa$	BioLegend®, San Diego, Kalifornien, USA	302816	1:22
CD138	APC	B-B4	Maus	IgG1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-091- 250	1:11
Kern/DNA	DAPI	/	/	/	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	D1306	(10 $\mu$ M Lösung): 1:11

**Tabelle 2.1: Antikörper und Färbungen**

### 2.2.1 *Flourescence-activated cell sorting (FACS) und Isolation von Lymphozytenpopulationen*

PBMC-Proben der Patientinnen A und B wurden aufgetaut und in einem 50ml Reaktionsgefäß in 15ml 4°C kaltem DMEM-Medium, versetzt mit 2% FCS, gelöst. Die Zellen wurden 10min bei 300g und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in FACS-Puffer (PBS mit 1% FCS) gelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Antikörperkombination aus Tabelle 2.1 wurde hinzugegeben und mit FACS-Puffer auf die in der Tabelle angegebene Verdünnung und ein Gesamtvolumen von 100 $\mu$ l gebracht. Unter Eiskühlung ruhten die Zellen 20min lichtgeschützt auf einem Taumelwipptisch. Daraufhin wurden die Zellen mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und bei 4°C für 5min bei 300g zentrifugiert, der entstandene Überstand wiederum verworfen, das *Pellet* in 1ml FACS-Puffer gelöst und auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen von Katharina Raba (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mithilfe des MoFlo XDP sortiert. Aus der Lymphozytenpopulation wurden nach Ausschluss DAPI-positiver Zellen die Populationen CD3(+)/CD4(+), CD3(+)/CD8(+), CD19(+)/CD27(+) und CD138(+) in jeweils 100 $\mu$ l DMEM-Medium, versetzt mit 2% FCS, in einem 15ml Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend auf Eis gelagert. Darauf wurden die Zellen bei 4°C 10min bei 300g zentrifugiert, woraufhin der Überstand abermals verworfen wurde. Die Zellen wurden daraufhin in 1ml

TRIzol® gelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, wo sie zunächst bei -80°C eingelagert wurden.

### **2.2.2 Datenanalyse der FACS-Daten**

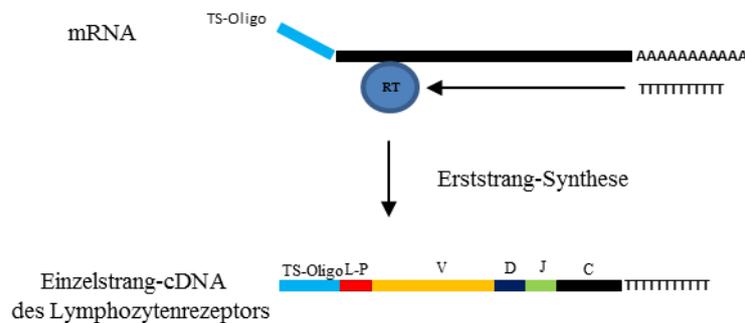
Die Sortierung der Zellen und die Auswertung der Daten wurden mithilfe der Software Summit 5.2 (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) durchgeführt. Eine erneute Auswertung der Rohdaten erfolgte mit FlowJo Version 7.6.5 (Flowjo LLC, Ashland, Oregon, USA). Weitere Bearbeitungen wurden mit PowerPoint 2016 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) durchgeführt.

### **2.3 RNA Isolierung mithilfe von TRIzol® und Qualitätskontrolle**

Die Isolierung der RNA mithilfe von TRIzol® erfolgte nach Herstellerangaben. Die isolierten Zellen bzw. die PBMC-Proben wurden in einen 1,5ml Reaktionsgefäß in 1ml TRIzol® gelöst und 200µg Glykogen wurden hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Raumtemperatur wurden 200µl Chloroform hinzugegeben und 15 Sekunden per Hand geschüttelt. Nach dreiminütiger erneuter Inkubation auf Raumtemperatur wurden die Proben bei 4°C mit 12.000g 15min zentrifugiert, sodass drei Phasen erkennbar waren. Die farblose Oberphase, in der sich die RNA befand, wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol gefällt. Daraufhin erfolgte eine weitere zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben bei 4°C mit 12.000g 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das *Pellet* mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen und mit einem Vortexmischer verwirbelt. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C mit 7.500g für 5min. Der Überstand wurde verworfen und das *Pellet* je nach Feuchtigkeit 5-10min luftgetrocknet. Kurz vor dem trockenen Zustand wurde die in dem *Pellet* vorhandene RNA in 20µl sterilem Wasser gelöst und direkt auf Eis gelagert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgt mithilfe des Nanodrop® 2000, zudem wurde ein kleines Aliquot von ca. 3µl für eine Qualitätsanalyse auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer abgenommen. Die Analyse auf diesem Gerät erfolgte durch die freundliche Unterstützung der Mitarbeiter des *Genomics and Transcriptomics* Labors (GTL) des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Universität Düsseldorf. Je nach Konzentration wurde für die Analyse entweder ein RNA 6000 Pico Chip oder ein RNA 6000 Nano Chip verwendet. Auswertung der Daten erfolgte mit der Agilent 2100 Bioanalyzer Expert Software. Die restlichen RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingelagert.

## 2.4 5'-Rapid amplification of cDNA ends (5'RACE)

Für die Sequenzierung wurde ein auf mRNA basierender Ansatz und für die reverse Transkription ein 5'RACE-Protokoll in Form eines kommerziell erwerblichen Kits (Takara/Clontech) gewählt, damit die Amplifikation am 5'-Ende über eine bekannte Oligonukleotid-Sequenz möglich wurde. Somit konnte auf eine Multiplex-PCR verzichtet werden, die wegen der Variabilität der verschiedenen V-Gene notwendig gewesen wäre (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des 5'RACE *Template-Switch* Effekts während der reversen Transkription (modifiziert nach Matz et al. 1999). Eine bekannte Oligonukleotid-Sequenz mit RNA-Anteilen bindet an das 5'-Ende der mRNA und wird während der reversen Transkription mit umgeschrieben, sodass sie in der Einzelstrang-cDNA des Lymphozytenrezeptors integriert vorliegt (RT: Reverse Transkriptase, L-P: *Leader*-Peptid Sequenz (und weiterer untranslatierter Bereich, nicht explizit dargestellt), V: V-Gen, D: D-Gen, J: J-Gen, C: Konstante Region).

Dabei war ein Reaktionsvolumen von 20µl möglich, sodass 10µl RNA-Lösung verwendet werden konnte, um bei geringen Konzentrationen auf eine Mindestmenge von 10ng *total*-RNA zu kommen. Die Synthese erfolgte nach Herstellerangaben. Für jede Probe wurde ein steriles 0,5ml Reaktionsgefäß mit jeweils 10µl *total*-RNA-Lösung und 1µl 5'-CDS *Primer A* vermischt und mit einem Vortexmischer verwirbelt. In einem *Thermocycler* wurde die RNA zunächst für 3min bei 72°C denaturiert und anschließend 2min bei 42°C inkubiert, um die Bindung des *Primers* an den RNA-Strang zu ermöglichen. Daraufhin wurde jeder Probe auf Eis 1µl *SMARTer II A Oligonucleotide* (24µM) dazugegeben. Anschließend wurden die Proben mit den Reagenzien für die cDNA Synthese gemischt: 4µl 5x *First-Strand Buffer*, 0,5µl DTT (100mM), 1µl dNTP (20mM), 0,5µl *RNase Inhibitor* (40µl/U), 2µl *SMARTScribe Reverse Transcriptase* (100U/µl). Daraufhin folgte eine zweite Inkubation im *Thermocycler*. Die Synthese der cDNA erfolgte bei 42°C für 90min, anschließend wurde das Enzym durch eine zehnmünütige Inkubation bei 70°C

inaktiviert. Danach wurden die Proben jeweils mit 20µl Tricin-EDTA-Puffer verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

## 2.5 PCR-Protokolle, *Library*-Präparation und Qualitätskontrolle

Für die verschiedenen PCR-Protokolle wurde das für die 5'-RACE-cDNA Synthese vorgeschlagene *Advantage® 2 Polymerase Kit* verwendet. Die verwendeten *Primer* sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 zusammengefasst:

<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Quelle</b>
TCR_beta	AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG AA	Van Heijst et al. (2013)
BCR_IgGH	GGG AAG ACS GAT GGG CCC TTG GTG G	Büdingen et al. (2012)
UPM A Mix	Long: CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT Short: CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	5'RACE Kit (Takara/Clontech)
BCR_IgG_adP1	TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT GGG AAG ACS GAT GGG CCC TTG GTG G	BCR_IgGH- <i>Primer</i> s.o. und Illumina** (in Anlehnung an Vollmers et al. (2013))
TCR_adP1	TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG AA	TCR_beta- <i>Primer</i> Anteil: s.o und Illumina** (in Anlehnung an Vollmers et al. (2013))
TCR_UID_adP1	TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT NNN NNN NNN NNN NNN AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG AA	TCR_beta- <i>Primer</i> Anteil: s.o und Illumina** (in Anlehnung an Vollmers et al. (2013))
FS_RACE	ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	Teil von <i>Long</i> aus SMARTER RACE Amplification Kit; Illumina**, (in Anlehnung an Vollmers et al. (2013))
Forward_Ill_adP2_BC_X	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC(X XXX XXX X)AC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T	Illumina mit variabler Barcodesequenz** (in Anlehnung an Vollmers et al. (2013))

Reverse_Ill_adP2_BC_X	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT (XXX XXX XX) G TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	Illumina mit variabler Barcodesequenz** (adaptiert in Anlehnung an Vollmers et al. (2013))
-----------------------	---	---

**Tabelle 2.2: Bezeichnungen, Sequenzen und Quellen der verwendeten Primer.** Die mit (X) dargestellten Barcodesequenzen wurden mit Illumina-Barcodes aus Tabelle 2.3 versehen. (\**Oligonucleotide sequences* © 2017 Illumina, Inc. All rights reserved. \*\**Oligonucleotide sequences* © 2017 Illumina, Inc. All rights reserved. Derivative works created by Illumina customers are authorized for use with Illumina instruments and products only. All other uses are strictly prohibited.)

<b>15 Indices (5'-3') für den Forward_Ill_AdP2_BC*</b>	<b>17 Indices (5'-3') für den Reverse_Ill_AdP2_BC*</b>	<b>17 Indices (5'-3') für Reverse_Ill_AdP2_BC in der für den direkten Einbau notwendigen reverse-complement Form*</b>
D501 TATAGCCT	D701 ATTACTCG	D701 CGAGTAAT
D502 ATAGAGGC	D702 TCCGGAGA	D702 TCTCCGGA
D503 CCTATCCT	D703 CGCTCATT	D703 AATGAGCG
D504 GGCTCTGA	D704 GAGATTCC	D704 GGAATCTC
D505 AGGCGAAG	D705 ATTCAGAA	D705 TTCTGAAT
D506 TAATCTTA	D706 GAATTCGT	D706 ACGAATTC
D507 CAGGACGT	D707 CTGAAGCT	D707 AGCTTCAG
D508 GTACTGAC	D708 TAATGCGC	D708 GCGCATTA

**Tabelle 2.3: Bezeichnungen und Sequenzen der Illumina-Barcodes.** Die mit (X) dargestellten Barcodesequenzen aus Tabelle 2.2 wurden mit diesen Illumina-Barcodes versehen. Dabei wurde in den Forward\_Ill\_adP2\_BC-Primer eine D50x-Sequenz eingebaut. Die D70x mussten zunächst in die *reverse-complement* Form gebracht werden. Diese wurden daraufhin in den Reverse\_Ill\_AdP2\_BC-Primer eingebaut. (\**Oligonucleotide sequences* © 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.)

### 2.5.1 T-/B-Zell-Rezeptornachweis

Vor der eigentlichen *Library*-Präparation erfolgte zunächst die Amplifikation der Rezeptorsequenzen mit dem von der Firma Takara/Clontech empfohlenen *Universal-Primer Mix* (UPM) als *Forward-Primer* für die Bindung am 5'-Ende und mit bereits publizierten genspezifischen *Reverse-Primern*, die für Sequenzierungen auf dem 454 von Roche genutzt wurden. Für die Amplifikation des Immunglobulin G wurde auf den Isotyp-spezifischen *Primer*



folgenden Bedingungen durchgeführt: (94°C 30sek, 72°C 1min): 6 Zyklen; (94°C 30sek, 70°C 1min, 72°C 1min): 6 Zyklen; (94°C 30sek, 68°C 1min, 72°C 1min): 26 Zyklen. Die fertigen Produkte wurden mit 5µl *6x Loading Dye* gemischt und auf einem mit Ethidiumbromid versetzten, 2%igen Agarose Gel geladen. *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* wurde in eine Tasche zur Markierung hinzugegeben und eine Spannung von 170V für ca. 35min angelegt. Unter UV-Licht wurden die Produkte sichtbar gemacht.

## 2.5.2 PCR-Protokoll für eine T-Zell-Rezeptorlibrary

Gelang ein Nachweis von Rezeptorsequenzen in den Proben, konnte mit der *Library*-Präparation begonnen werden. In Anlehnung an das BZR-*Library*-Protokoll (mit konventioneller cDNA Synthese) von Vollmers et al. (2013) wurden die Adaptersequenzen, notwendig für die Sequenzierung, schrittweise durch zwei PCRs den Rezeptorsequenzen angehängt. So wurden die *Primer* für beide Rezeptortypen (BZR und TZR) und für die 5'RACE-cDNA sowie das Aufreinigungsverfahren angepasst und ein passendes PCR-Protokoll entwickelt.

### 2.5.2.1 PCR zur Amplifikation von Rezeptorsequenzen mit Überhängen („Rezeptor-PCR“)

Für die erste PCR wurde ein Teil der Illumina-Adaptersequenzen den *Forward*- und *Reverse-Primern* angefügt. Der *Forward-Primer* war spezifisch für die Oligonukleotid-Sequenz am 5'-Ende und somit sowohl für BZR- als auch für TZR-*Libraries* identisch. Den genspezifischen *Primern* TCR\_beta bzw. BCR\_IgG wurde ebenfalls ein Teil der Adaptersequenz angehängt. Für eine Variante des TZR-*Primers* wurden zwischen der genspezifischen und der Adaptersequenz zusätzlich 15 zufällige Nukleotide als UID-Sequenz angefügt (siehe Kapitel 4.1.1). Damit banden der *Forward-Primer* mit Teilen des Adapters als Überhang nun an die während des 5'RACE angehängene Oligonukleotid-Sequenz, die genspezifischen *Reverse-Primer* mit ihren Überhängen an die konstante Region der  $\beta$ -Kette des TZR bzw. IgG des BZR (siehe Abb. 2.3).

Für die T-Zell-Rezeptor-Amplifikation und die Erstellung einer TZR-*Library* wurde ein Reaktionsvolumen von 50µl benötigt. Zusammengefügt wurden für jede Probe 36µl H<sub>2</sub>O, 5µl *5x Advantage 2 PCR-Puffer*, 1µl dNTP Mix (10mM), 1µl *50x Advantage 2 Polymerase Mix*, 1µl FS-RACE-*Primer* (10µM), 1µl TCR\_adP1-*Primer* (1µM) oder TCR\_UID\_adP1-*Primer* (1µM) und 5µl cDNA aus der vorherigen 5'RACE-cDNA-Synthese. Alles wurde in PCR-Gefäßen

gesammelt. Eine *Touchdown*-PCR mit 6 Zyklen wurde durchgeführt: 94°C 1min; (94°C 30sek, 72°C 2min): 2 Zyklen; (94°C 30sek, 70°C 1min, 72°C 1min): 2 Zyklen; (94°C 30sek, 68°C 1min, 72°C 1min): 2 Zyklen. Die fertige Reaktion wurde in ein 1,5ml DNA-*loBind*- Reaktionsgefäß überführt.

Für eine erneute Sequenzierung der T-Zell-Rezeptoren der verwendeten Proben, nun angepasst an die ursprüngliche Zellzahl, wurden für die erste PCR lediglich 2,5µl cDNA und ein Gesamtvolumen der PCR-Reaktion von 25µl verwendet und somit die oben angegebenen Reagenzien halbiert. Das *Touchdown*-PCR-Protokoll wurde außer bei einer Probe nicht verändert. Nur für die Probe B\_CD4\_6Mo wurde aufgrund niedriger Zellzahlen die PCR um zwei Zyklen erweitert: 94°C 1min; (94°C 30sek, 72°C 2min): 2 Zyklen; (94°C 30sek, 70°C 1min, 72°C 1min): 2 Zyklen; (94°C 30sek, 68°C 1min, 72°C 1min): 4 Zyklen. Nach der PCR wurden die fertigen Produkte in ein 1,5ml DNA-*loBind*-Reaktionsgefäß überführt und mit 25µl sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50µl gebracht.

### 2.5.2.2 Entfernen der *Primer*reste mittels *Bead*aufreinigung

Die 50µl PCR-Produkte wurden daraufhin mit *Agencourt AMPure XP Beads* gereinigt. Das Protokoll des Herstellers wurde für das gewünschte Produkt teilweise angepasst. So wurde dem PCR-Produkt 40µl *Agencourt AMPure XP Beads* zugesetzt und mit der Pipette 10mal gemischt, bis die Lösung eine homogene braune Farbe angenommen hatte. Nach wenigen Minuten Inkubation wurden die Proben in einen magnetischen Ständer gehangen, bis die Lösung klar wurde und sich die *Beads* an der nun magnetischen Seite des Reaktionsgefäßes sammelten. Dabei hatten die *Beads* die PCR-Produkte gebunden, während sich die *Primer* noch in der klaren Lösung befanden. Vorsichtig wurde die klare Lösung mit den *Primern* entfernt, ohne die *Beads* mit den PCR-Produkten zu berühren. Daraufhin wurden 200µl 75%iger Ethanol hinzugegeben, ohne die *Beads* dabei abzuspülen oder zu berühren. Die Ethanol-Lösung wurde abgenommen und die Prozedur ein weiteres Mal wiederholt. Nach Abnahme des Ethanols wurden die *Beads* für wenige Minuten (<5min) luftgetrocknet, bis der Ethanol verdunstet war, die *Beads* aber noch keine Risse gebildet hatten. Daraufhin wurde das Reaktionsgefäß vom Magneten genommen und die *Beads* in 52µl H<sub>2</sub>O gelöst, bis die Lösung eine homogene braune Farbe angenommen hatte. Dadurch wurde die Bindung der *Beads* an die PCR-Produkte gelöst. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße wieder in das magnetische Gestell gehangen, bis sich die *Beads* an der magnetischen Seite des Reaktionsgefäßes sammelten (nach ca. 2min). Nun lagen die PCR-Produkte in Wasser gelöst vor und waren nicht mehr an den *Beads* gebunden. Anschließend wurden 50µl des gereinigten PCR-Produktes abgenommen, ohne die *Beads* zu berühren und in

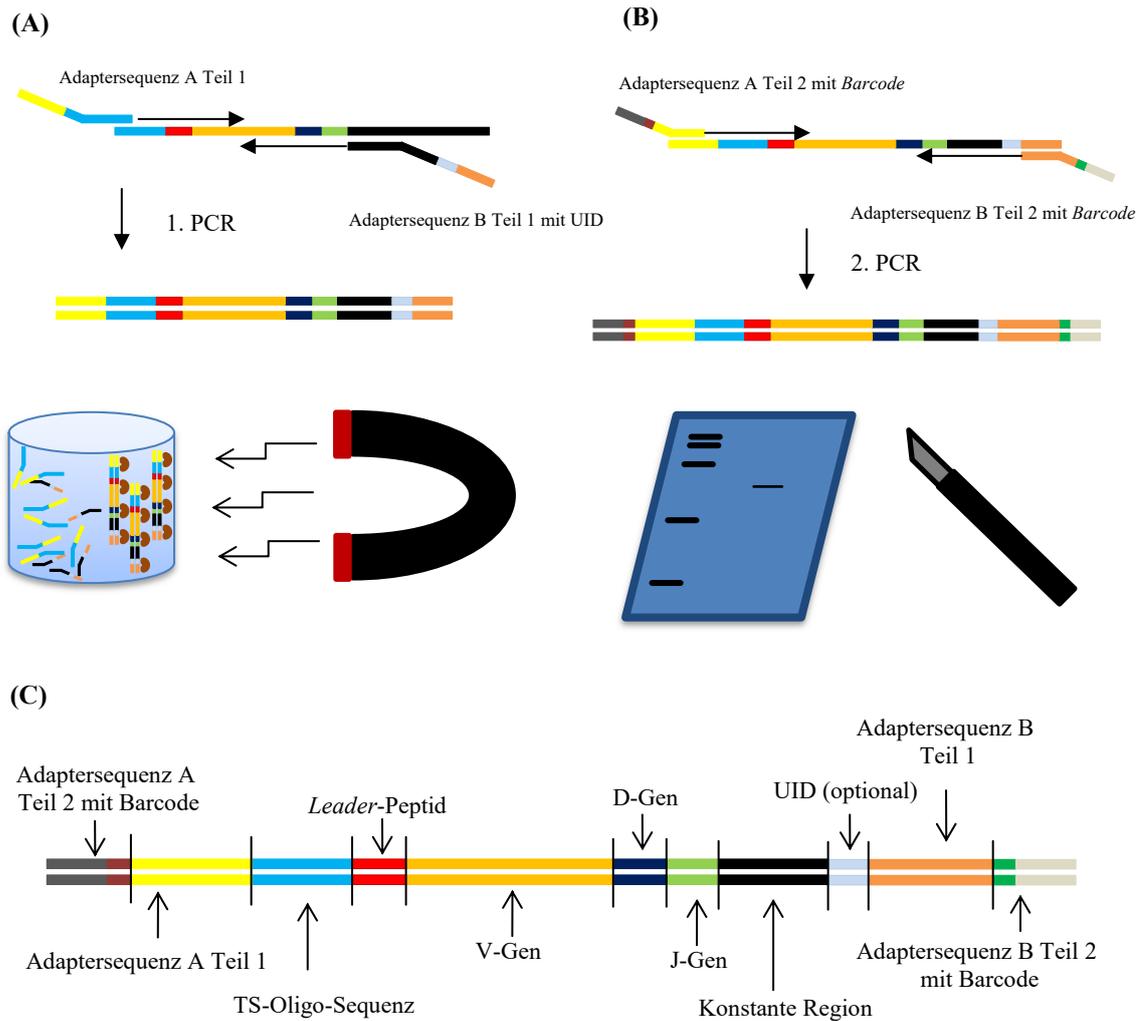
ein neues 1,5ml PCR-reines DNA-*loBind*-Reaktionsgefäß überführt. Um die Effektivität der Aufreinigung zu erhöhen, wurden dem 50µl gereinigten PCR-Produkt ein zweites Mal 40µl *Beads* hinzugegeben und die vorher erläuterten Schritte bis zur Lösung der *Beads* in Wasser wiederholt. Dabei wurden die *Beads* diesmal lediglich in 22 µl Wasser gelöst und bis zur Homogenisierung pipettiert. Daraufhin wurde die Lösung wieder in den magnetischen Ständer gestellt, bis sich die *Beads* an der magnetischen Seite des Reaktionsgefäßes sammelten (nach ca. 2min). 20µl der klaren Lösung (mit den PCR-Produkten) wurden ohne Berührung der *Beads* in ein neues 1,5ml DNA-*loBind*- Reaktionsgefäß überführt.

### 2.5.2.3 PCR zur Vervollständigung der Adaptersequenz, zum Anfügen eines Barcodes („Barcode-PCR“) und Gelaufreinigung

In einem zweiten PCR-Schritt wurde mittels Überhänge an den 5'- und 3'-*Primern* die restliche Sequenz für die Bindung an die *Flow cell* bzw. für die Bindung eines Sequenzierungs*primers* in die Amplikons integriert; einschließlich eines Barcodes, der die Zuordnung der Proben erlaubte. Welche Barcodes miteinander kombiniert werden konnten, konnte vorab mit dem Illumina *Experiment Manager* getestet werden. Dafür wurden für jede Probe 37µl H<sub>2</sub>O, 5µl *5xAdvantage 2 PCR*-Puffer, 1µl dNTP Mix (10mM), 1µl *Forward\_Ill\_adP2-Primer* (10µM), 1µl *Reverse\_Ill\_adP2-Primer* (10µM) und 5µl PCR-Produkt aus den vorherigen Schritten für eine weitere PCR gemischt. Beide *Primer* waren mit einem *Barcode* versehen, um die einzelnen Proben nachher unterscheiden zu können. Daraufhin folgte eine PCR in einem *Thermocycler* unter folgenden Konditionen: (94°C 30sek, 68°C 1min, 72°C 1min): 30 Zyklen.

Die fertigen PCR-Produkte wurden mit je 5µl *Loading Dye* gemischt und daraufhin auf einem 2%igem, mit SYBR *Safe DNAGel Stain* versetzten Agarose-Gel geladen, als Marker wurde der *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* verwendet. Für die Gelelektrophorese wurde Strom mit einer Spannung von ca. 150-170V für ca. 30-40 Minuten angelegt, bis ein gut erkennbares PCR-Produkt einer Länge von 600-700bp zu sehen war. Das Produkt wurde mit sterilen Klingen ausgeschnitten und in ein steriles 2ml DNA-*loBind*-Reaktionsgefäß überführt.

Daraufhin folgte die Aufreinigung mit dem Qiagen *Gel Extraction Kit* nach nur geringfügig veränderten Herstellerangaben. Das extrahierte Agarose-Stück mit dem PCR-Produkt wurde gewogen. Dem Gewicht in mg wurde das dreifache Volumen in µl des QG-Puffers hinzugegeben



**Abb. 2.3: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs und der Aufreinigung der ersten „Rezeptor“- (A) und zweiten „Barcode“-PCR (B) und der allgemeine Aufbau einer Rezeptorlibrary unabhängig von der Art des Rezeptors (C).** An beiden Enden wird zunächst ein Teil der Adaptersequenz durch die PCR angebracht (A). Der *Forward-Primer* bindet an das *Template-Switch-Oligonukleotid* (hellblauer Bereich), der *Reverse-Primer* an die jeweilige konstante Region (schwarzer Bereich). Beide besitzen als Überhang einen Teil der Illumina-Adaptersequenz. In den TZR-Primer wurde alternativ eine Sequenz von 15 Nukleotiden mit zufälliger Reihenfolge integriert (*Universal Identifier/UID*) (grauer Bereich). Anschließend erfolgt zweimal die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels magnetischer *Beads*. Die *Primer* der zweiten PCR (B) besitzen wiederum Überhänge, um die Adaptersequenz zu komplettieren. Sie binden an die bereits integrierte Adaptersequenz des Amplikons. Die *Primer* beinhalten zudem Barcodes, um die später generierten Sequenzen einer Probe zuordnen zu können. Die fertige *Library* wird mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht, das Gelstück ausgeschnitten und aufgereinigt. (C) zeigt den schematischen Aufbau einer *Rezeptorlibrary*. Beide Enden besitzen eine Adaptersequenz, die die Bindung an die *Flow cell* und der Sequenzierungs*primer* ermöglicht. Die türkisenen und burgunderroten Bereiche sind die jeweiligen *Barcode*-Sequenzen. Das *Template-Switch-Oligonukleotid*/-die *TS-Oligo-Sequenz* wurde während des 5'RACE angehängen.

Der untranslatierte Bereich am 5'-Ende (5'-UTR) ist nicht gesondert dargestellt und wird mit der *Leader-Peptid*-Sequenz zusammengefasst. Der VDJ-Bereich ist der Bereich von Interesse für die nachfolgende Sequenzierung. Da der *Reverse-Primer* an der konstanten Region des jeweiligen Rezeptors bindet, sind Teile dieser Region in der *Library* vorhanden. Ist dem konstanten *Primer* eine UID-Sequenz angehängt worden, ist diese ebenso zu finden. Sie fehlt bei der *BZR-Library*. Auf eine korrekte Darstellung der Relationen der einzelnen Bereiche wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

(100mg Produkt ergaben eine Zugabe von 300µl QG-Puffer). Das Gemisch wurde bei 50°C schüttelnd ca. 5-10min inkubiert, bis sich das Agarosestück vollständig aufgelöst hatte. Gelegentlich wurden die Proben zudem per Vortexmischer verwirbelt. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem bestimmten, aus dem Gewicht des Gels resultierenden Volumen mit Isopropanol gefällt (bei 100mg Gel ergaben sich 100µl Isopropanol). Eine *Spin-Column* wurde in das im Kit beiliegende 2ml Auffanggefäß gesetzt, das Gel/Puffer-Gemisch auf die Membran pipettiert und bei 17.900g und Raumtemperatur 1min zentrifugiert. Der durch die Membran getretene Puffer wurde verworfen. Danach wurden nochmals 500µl QG-Puffer auf die Säule pipettiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und 750µl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Wiederum wurde wie oben zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Ohne erneute Zugabe wurde die Säule nochmals nach gleichen Konditionen zentrifugiert, um Reste des Puffers aus der Membran zu entfernen. Daraufhin wurden die Säule in ein steriles 1,5ml *DNA-loBind*- Reaktionsgefäß gesetzt und 20µl steriles Wasser oder TE-Puffer direkt auf die Membran pipettiert, ohne diese zu berühren. Danach wurde die Säule ca. 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei gleichen Konditionen. Die Säule wurde verworfen und das PCR-Produkt (die *Library*) bei -20°C gelagert. Der schematische Ablauf ist in Abb. 2.3 dargestellt.

### 2.5.3 PCR-Protokoll für eine B-Zell-Rezeptorlibrary

Für die BZR-Amplifikation bzw. *BZR-Library*-Präparation wurden für jede Probe 19,25µl H<sub>2</sub>O, 2,5µl *5xAdvantage 2 PCR-Puffer*, 0,5µl dNTP Mix (10mM), 0,5µl *50x Advantage 2 Polymerase Mix*, 0,5µl *FS-RACE-Primer* (10µM), 0,5µl *BCR\_IgG\_adP1-Primer* (10µM) und 1,25µl cDNA aus der vorherigen 5'RACE-cDNA-Synthese für ein Reaktionsvolumen von 25µl zusammengeführt. Danach folgte eine *Touchdown*-PCR mit 12 Zyklen: 94°C 1min; (94°C 30sek, 72°C 2min): 2 Zyklen; (94°C 30sek, 70°C 1min, 72°C 1min): 2 Zyklen; (94°C 30sek, 68°C 1min, 72°C 1min): 6 Zyklen. Die fertige Reaktion wurde in 1,5ml *DNA-loBind*-Reaktionsgefäß überführt. Der weitere Ablauf (Aufreinigung mit *Beads* und die zweite „Barcode“-PCR zur

Vervollständigung der Illumina-Adapter) war mit der TZR-*Library*-Präparation identisch (siehe Abschnitt 2.5.2.2 und 2.5.2.3).

## 2.6 Quantifizierung der *Libraries*...

Die Sequenzierung erfolgte zunächst in Kombination mit *Libraries* komplett anderer Präparationsmethoden und Zielsequenzen. Nicht nur deshalb war eine korrekte Konzentrationsbestimmung für eine gute *Clusterbildung* der *Rezeptorlibraries* auf der *Flow cell* essenziell. Bei den ersten Sequenzierungen war die Menge generierter Sequenzen je Probe zunächst sehr variabel, obwohl alle Proben auf eine 2nM Konzentration gebracht worden waren und die Sequenzierung letztlich mit einer Konzentration von 8-10pM durchgeführt wurde (vgl. Abschnitt 2.7.1). Anfangs erfolgte die Quantifizierung mit dem *2100 BioAnalyzer* (Agilent). Die Variationen der *Readanzahl* pro Sequenzierung veranlassten jedoch einen Wechsel der Quantifizierung auf den Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific).

### 2.6.1 ... mit dem BioAnalyzer 2100

Für die Quantifizierung der Proben auf dem *BioAnalyzer 2100* (Agilent Technologies Santa Clara, Kalifornien, USA) wurden 3µl an das BMFZ-GTL der Universität Düsseldorf gegeben. Dort wurden die Proben mit einem DNA 1000 Chip analysiert, die Daten konnten mit der *Agilent 2100 Bioanalyzer Expert Software* (Agilent Technologies Santa Clara, Kalifornien, USA) betrachtet werden.

### 2.6.2 ... mit dem Qubit 2.0

Für die Quantifizierung der *Libraries* mit dem Qubit 2.0 wurde das *dsDNA HS-Assay Kit* genutzt. Nach Anweisung des Herstellers wurde pro Probe ein Mastermix mit 199µl HS-Puffer und 1µl HS-Reagenz pro Probe hergestellt. Jeweils 190µl Mastermix und 10µl HS Standard 1 bzw. 2 wurden in den dafür vorgesehenen Reaktionsgefäßen des Herstellers gemischt, mit einem Vortexmischer verwirbelt, 2min inkubiert und mit dem Qubit 2.0 gemessen. Für die Proben wurden zweimal 199µl Mastermix mit 1µl *Library* wie bereits beschrieben gemischt und inkubiert. Nach Kalibrierung des Geräts mit den vorbereiteten Standardlösungen wurden beide

Aliquote einer Probe gemessen und der Mittelwert für die anschließenden Berechnungen verwendet.

### 2.6.3 *Pooling* der TZR-Libraries

Zielwert war eine Konzentration von 2nM bzw. 4nM. Den Berechnungen lagen eine Amplikonlänge von 678bp und ein durchschnittliches Molekulargewicht eines Basenpaares von 660g/mol zugrunde. Alle Proben wurden mit sterilem Wasser auf die Zielmolarität verdünnt, sodass von jeder Probe mindestens 30µl vorlagen. Beim *Pooling* der *Library* wurde die größte Zellzahl der präparierten Proben als Referenz genommen. Bei den Proben, deren Zellen durch das FACS isoliert wurden, variierte die Zellzahl je nach Population und Zeitpunkt stark (zwischen 23.500-880.000 Zellen). Bei gängigen Präparationen wurden die einzelnen Proben equimolar gemischt, sodass die gleiche Menge *Reads* für jede Probe zu erwarten war. In diesem Fall würde das (bei den verschiedenen Zellzahlen) zu stark unterschiedlichen Abdeckungen der einzelnen Proben führen. Dabei würde, würden beispielsweise für jede Probe 100.000 *Reads* generiert werden, die Abdeckung zwischen dem vierfachen und einem Achtel der ursprünglichen Zellzahl liegen, was eine Interpretation der Daten erschweren könnte. Dementsprechend wurde jede einzelne Probe zunächst auf dieselbe Konzentration gebracht (2 bzw. 4nM) und so gemischt, dass für jede Probe ein Volumen von mindestens 30µl vorhanden war. Nun wurde die größte Zellzahl als Referenz genommen und mit dem Faktor 1 gleichgesetzt. Alle anderen Proben wurden im Verhältnis zu dieser größten Zellzahl gesetzt. Als Beispiel: Gab es eine Probe A, die aus 400.000 Zellen generiert worden ist und die größte darstellte, wurde diese mit dem Faktor 1 belegt. War eine weitere Probe B aus 40.000 Zellen generiert, wurde ihr der Faktor 0,1 zugewiesen, da sie nur ein Zehntel Größe der Referenzprobe besaß. Dieser Faktor wurde dann mit dem Volumen der größten Probe multipliziert und die Proben nach dieser Weise gemischt. So würden in diesem Fall bei einem Volumen von 30µl pro Probe 30µl der Probe A mit 3µl der Probe B gemischt, um den fertigen gemischten *Library-Pool* zu erhalten. Dabei wurde die Molarität der fertigen *Libraries* nicht verändert, die Proben aber dennoch an die jeweiligen Zellzahlen angepasst.

## 2.7 Sequenzierung auf Illumina Miseq

Die Sequenzierung der *Libraries* erfolgte extern. Die hier verwendeten Daten wurden in den Forschungslaboren der Frauenklinik im *Life-Science-Center* Düsseldorf von den Mitarbeitern des Instituts denaturiert, auf die *Flow cell* geladen und sequenziert.

### **2.7.1 Erste Sequenzierungen ohne Anpassung an die Zellzahl**

Die ersten, nicht an die Zellzahl angepassten Sequenzierungen der *Libraries* wurden in Kombination mit diversen, nicht Rezeptor*libraries* anderen Ursprungs sequenziert. Dabei wurde eine 2nM Rezeptor*library* denaturiert und bei einer Konzentration von 8-10pM den anderen *Libraries* hinzugegeben und sequenziert. Dies geschah mit dem Miseq *Reagent Kit V2* (Illumina), bei dem jeder *Read* 250 Basen lang sequenziert wurde.

### **2.7.2 Sequenzierung von T-Zell-Rezeptoren mit Anpassung an die Zellzahl**

Die an die Zellzahl angepassten TZR-Rezeptor*libraries* wurden ohne *Libraries* anderen Ursprungs sequenziert. So wurde zunächst ein 2nM *Library-Pool* mit einer Konzentration von 8pM auf der *Flow cell* sequenziert. Dabei wurden 40% PhiX-*Control V3* der *Library* hinzugefügt. Daraufhin erfolgte die nächste Sequenzierung mit einem 4nM *Library-Pool* und einer Konzentration von 13pM auf der *Flow cell*, ebenfalls mit 40% PhiX-*Control V3*. Dies geschah mit dem Miseq *Reagent Kit V2 (500-cycles)* (Illumina), bei dem jeder *Read* 250 Basen lang sequenziert wurde.

### **2.7.3 Variationen während der Etablierung**

Die verwendeten BZR-Sequenzen und das PCR-Produkt der unspezifischen Region im 1000bp Bereich wurden mit dem Miseq *Reagent Kit V2 (300-cycles)* (Illumina) 150 Basen von beiden Seiten in Kombination mit fremden, nicht Rezeptor*libraries* sequenziert.

## **2.8 Datenanalyse der NGS-Daten, Darstellungen, Abbildungen und Formeln**

Die Analysen der Daten erfolgte mit MiXCR (Version 2.1.3 von Bolotin et al. 2015). Dabei konnten sowohl BZR- als auch TZR-Sequenzen analysiert werden. Für das *Alignment* wurde die VTranscript-Einstellung verwendet, die von den Programmierern für 5'RACE-*Libraries* empfohlen wurde. Beide *Reads* wurden dabei in die Analyse miteinbezogen. Danach erfolgten die Identifikation und die Zuordnung der Klone auf Basis der CDR3. Für jeden Schritt wurden

Report-Dateien angelegt. Einige standardmäßig eingestellte Algorithmen des Programms dienen der Fehlerkorrektur, z.B. von PCR-Fehlern. Dies konnte jedoch nicht verhindern, dass ein minimaler Anteil an veränderten Sequenzen nicht korrekt identifiziert wurde (TZR- $\beta$ -Sequenzen wurden so fälschlicherweise TZR- $\alpha$  oder IgL- $\kappa$  zugeordnet). Damit diese Sequenzen nicht in der späteren Analyse auftauchen, wurden nur die wirklich in der PCR amplifizierten Ketten exportiert (nur TZR- $\beta$  oder IgGH). Zudem wurden auch Sequenzen mit *Frameshift* oder *Stopcodon* von der späteren Analyse ausgeschlossen. Die in Abb. 2.2 (Abschnitt 2.5.1) verwendete Form der Sequenzen wurde durch die Option „*AlignmentPretty*“ erstellt.

Die exportierten Daten wurden daraufhin mit dem Tool VDJTools (Version 1.1.4 von Shugay et al. 2015) formatiert, analysiert und visualisiert. Mit diesem Programm wurden die Daten für die CDR3-Längenverteilungen, die V-J-Genverteilungen und der Anteil der Klone am Repertoire erstellt bzw. visualisiert. Dabei wurden die analysierten Daten der V-J-Genverteilung, erstellt durch VDJTools, nochmal mit R-Studio (<https://www.rstudio.com/>) durch ein *R-Script*, geschrieben von Pina Krell (Universität Bielefeld), visualisiert (siehe ähnliche Visualisierungen z.B. bei Krell et al. 2013). Die Daten der vergleichenden Analysen zweier Repertoires wurden mit VDJTools erstellt und mit Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) visualisiert. Für die Funktionalität von VDJTools war ebenfalls die Installation von R (<https://www.r-project.org/>) bzw. R-Studio (<https://www.rstudio.com/>) (Open Source) notwendig.

Einzelne Sequenzen wurden mit dem TZR-Tool des Web-Tools IgBlast (Ye et al. 2013; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) analysiert. Weitere Analysen wurden innerhalb des Terminals des Betriebssystems Ubuntu (*Open Source*) erledigt, zudem wurde das Programm Notepad ++ (Microsoft, Redmond, Washington, USA) für einige Anwendungen verwendet. Die Abbildungen wurden mit Powerpoint und einige Tabellen mit Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) erstellt oder verarbeitet.

Für die Berechnung der Diversität der verschiedenen Populationen wurden folgende Diversitätsindices verwendet, der (1) inverse Simpson Index (Simpson 1949) und der (2) Shannon-Index (Shannon 1948, 1997), die nach folgenden Formeln berechnet worden sind:

$$(1) \quad SI = 1 / \sum_i (n_i / N)^2$$

wobei  $i$  den jeweiligen Klon im Repertoire,  $n_i$  die Anzahl der Sequenzen, die dieser Klon im Repertoire besitzt und  $N$  die Anzahl aller Sequenzen im Repertoire beschreiben.

$$(2) \quad SA = - \sum_i (n_i/N) \log(n_i/N)$$

wobei  $i$  den jeweiligen Klon im Repertoire und  $n_i$  die Anzahl der Sequenzen, die dieser Klon im Repertoire besitzt, beschreiben. Für diese Formel wurde der natürliche Logarithmus verwendet.

Im Zuge des Shannon-Indexes wurde die sogenannte Äquität oder *Evenness* (Pielou 1966) bestimmt:

$$E = SA/H_{max}$$

Dabei gilt:

$$H_{max} = -\log(1/i)$$

wobei  $i$  die Anzahl der Klone im Repertoire angibt. Für die Berechnung wurde der natürliche Logarithmus verwendet.

Die Berechnungen erfolgten mittels R (<https://www.r-project.org/>) bzw. R-Studio (<https://www.rstudio.com/>). Das *R-Script* wurde programmiert von Jale Basten (Technische Universität Dortmund).

## 2.9 Materialliste

### Laborgeräte und Materialien aus eigenem Bestand

Autoclave Systec V-150	Systec, Linden, Deutschland
Cell culture sterile bench	SKAN, Allschwill, Schweiz
Cell culture sterile bench, Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DynaMag-2TM Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Electrophoresis System	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Eppendorf Biopur® Safe-Lock Tubes; 0,5mL, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf LoBind microcentrifuge tubes; 0,5ml; 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes; 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank (-20°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank (-80°C)	Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan
Freezing container, CoolCell™	Menlo Park, California, USA
Gel Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Heizblock, Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop, Leica DMIL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Stickstofftank	tec-lab, Taunusstein, Deutschland
Mastercycler®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mechanischer Schüttler	Bibby Scientific Limited, Stone, Großbritannien
Mechanischer Schüttler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Nanodrop® 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Surgical Scalpel Blade No.15	Swann-Morton, Sheffield, England, UK
TipOne® Filter Tips	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries Inc, Bohemia, New York, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Waage	Kern, Balingen, Deutschland
Zentrifuge, Galaxy MiniStar silverline	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Minispin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## Reagenzien und Kits aus eigenem Bestand

Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Agentcourt Ampure XP Beads	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x), without Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNA-ExitusPlus™	PanReac AppliChem, AppliChem GmbH , Darmstadt, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNase/RNase free H <sub>2</sub> O (distilled)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol (absolute for analysis)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fetal calf serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glycogen	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gibco™ Recovery Cell Culture Freezing Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Miseq Reagent Kit V2 (300, 500 cycles)	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
dNTP Mix (10μM)	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PhiX Control V3	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNase AWAY™ Surface Decontaminant Molecular BioProducts™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SMARTer® RACE 5'/3' Kit	Clontech (Takara), Mountain View, California, USA
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tris-EDTA (TE)-Puffer	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TRIzol®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypan Blau	Bio-Rad, Hercules, California, USA

#### **Genutzte Laborgeräte aus anderen Instituten**

MoFlo XDP	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Santa Clara, Kalifornien, USA
Illumina Miseq	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA

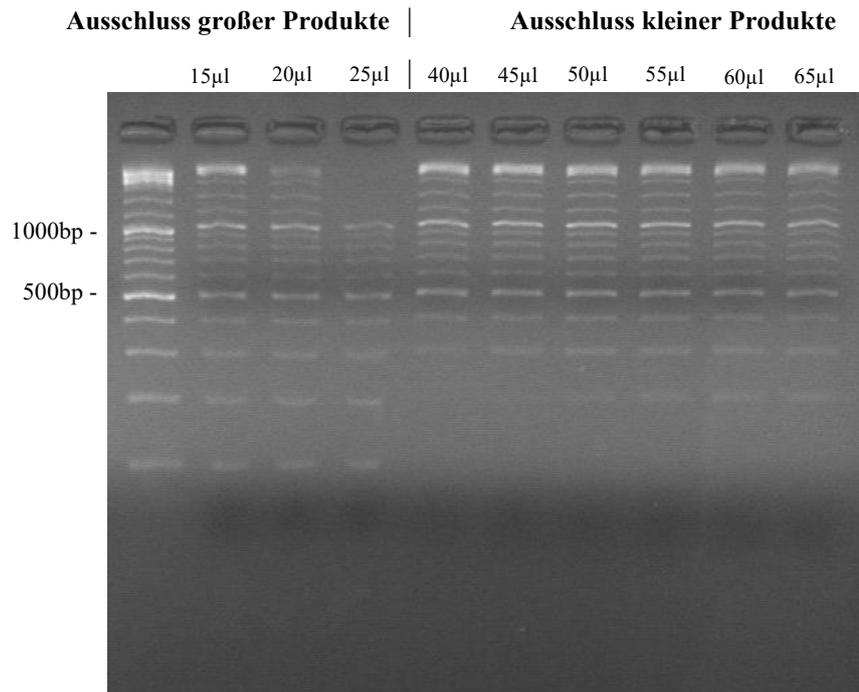
## 3 Ergebnisse:

### 3.1 Etablierung einer PCR-basierten *Library*präparation zur Erfassung des Immunrepertoires von IgG-exprimierenden (bzw. sezernierenden) B-Zellen und von T-Zellen, welche die $\beta$ -Kette des TZR exprimieren

#### 3.1.1 Etablierung einer Aufreinigungsmethode zur Entfernung von langen *Primern* aus PCR-Produkten

Um die *Primer* aus der ersten PCR zu entfernen, eignete sich die *Bead*-Aufreinigung, da die Größe der zu entfernenden Produkte verändert werden konnte. Für die großen *Primer* (56-71bp) musste zunächst das richtige Verhältnis zwischen PCR-Produkt und *Beads* ermittelt werden. Durch eine Erhöhung der Konzentration der *Beads* wurde die Bindungsaffinität der *Beads* zu kleineren DNA-Fragmenten ebenfalls erhöht. Dafür wurde ein Marker (*DNA-Ladder-Mix*, Thermo Fisher Scientific) für die Einordnung der Größe von PCR-Fragmenten bei der Gelelektrophorese genutzt. Durch die normierte Länge des *DNA Ladder Mix* eignete sich dieser dazu, das richtige Verhältnis zwischen Produkt und *Beads* zu ermitteln. Die Veränderung der *Bead*konzentration konnte somit direkt anhand des Fehlens der DNA-Fragmente des Markers nach der Aufreinigung anschaulich gemacht werden. Dafür wurde ein Reaktionsvolumen von 50 $\mu$ l gewählt. Für die Entfernung großer Fragmente wurden die DNA Fragmente, die die *Beads* binden, verworfen und der Überstand direkt auf einem mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel analysiert. Für die Entfernung kurzer Fragmente wurden die von den *Beads* gebundenen Fragmente wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben aufgereinigt und daraufhin auf einem Gel analysiert.

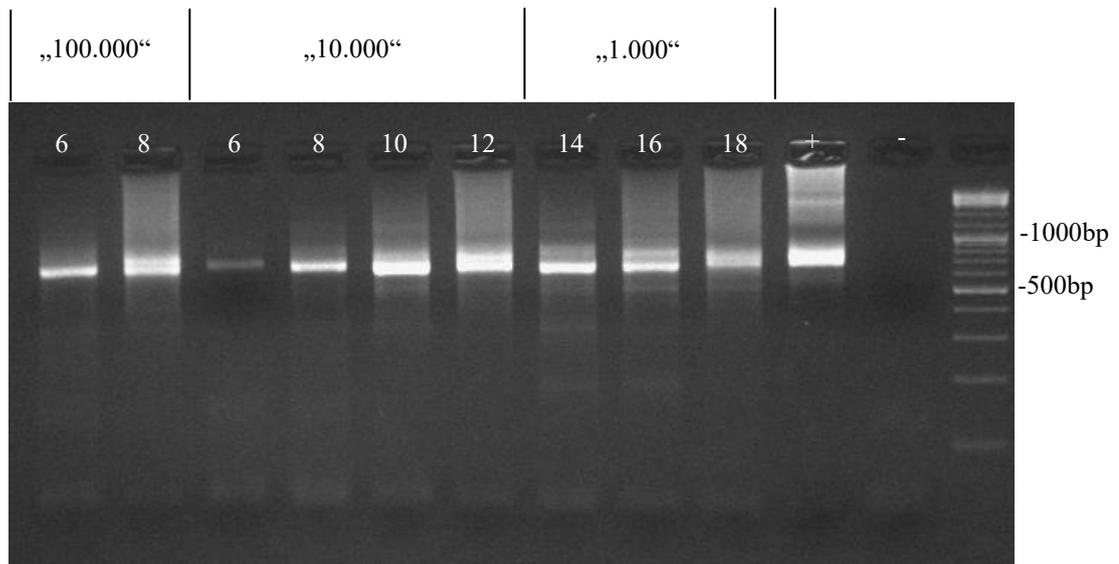
Abb. 3.1 zeigt deutlich, dass bei einem Verhältnis von 40 $\mu$ l *Beads* zu 50 $\mu$ l Volumen des PCR-Produkts DNA-Fragmente des Markers unterhalb einer Größe von 300bp nicht mehr auf dem Gel sichtbar sind. Auf die Aufreinigung großer Produkte wurde aufgrund möglicher Verluste durch die Aufreinigung selbst verzichtet.



**Abb. 3.1: Gelelektrophorese eines durch *Beads* aufgereinigten Markers.** Einem 50µl Volumen wurden jeweils die oben angegebene Menge an *Beads* hinzugefügt. Für die Selektion langer Fragmente wurde der Überstand, für die Selektion kurzer Fragmente wurde die von den *Beads* gebundene DNA aufgereinigt und analysiert. Bei einem Verhältnis von *Beads* zu DNA von 4:5 (40µl) zeigten sich gute Ergebnisse und keine sichtbaren DNA-Fragmente unterhalb von 300bp.

### 3.1.2 Für die Generierung von *Rezeptorlibraries* mussten das Protokoll der PCR an die Zellzahl der jeweiligen Probe angepasst und unspezifische PCR-Produkte von der Analyse ausgeschlossen werden

Es wurde versucht, die Zyklenzahl der PCR und damit die PCR-Artefakte so gering wie möglich zu halten. In Versuchen mit verdünnten Proben zeigte sich, dass die Zellzahl und die genutzten Zyklen Einfluss auf das generierte Produkt hatten. So fiel auf, dass zum einen bei geringeren Konzentrationen 6 Zyklen der ersten PCR nicht immer ausreichend waren, um nach Abschluss der *Library*-Präparation ein sichtbares PCR-Produkt in der Gelelektrophorese zu erhalten. Zum anderen wurden mit erhöhter Zyklenzahl der Rezeptor-PCR, abhängig von der eingesetzten cDNA-Konzentration, weitere Produkte im Bereich der Länge der spezifischen TZR-β-*Library* (ca. 700bp) generiert. In Abb. 3.2 ist dies in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte zu erkennen. Dabei wurde aus einer cDNA eine Verdünnungsreihe erstellt, die eine Zellzahl von



**Abb. 3.2: Gelelektrophorese von TZR-Libraries.** Von einer auf 400.000 Zellen sortierte T-Zell-Subpopulation wurde die cDNA nach dem 5'RACE Verfahren generiert und diese 1:4, 1:40 und 1:400 mit Wasser verdünnt, um die cDNA Menge aus 100.000, 10.000 und 1.000 T-Zellen zu suggerieren. Während die zweite PCR mit 30 Zyklen nicht verändert wurde, variierte nur Zyklenzahl der ersten PCR vor der *Bead*-Aufreinigung (siehe weiße Zahlen). Deutlich erkennbar sind zusätzliche Produkte in der Zielregion um ca. 700bp, die durch die erhöhte Zyklenzahl der ersten PCR auftraten. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe, als Positivkontrolle ein aus einem Gel extrahiertes PCR-Produkt der ersten PCR, welches 1:50 mit Wasser verdünnt und durch die 30 Zyklen der zweiten PCR mit den restlichen Adaptoren versehen wurde. Durch teilweise leichte Unterschiede in der Höhe der Produkte ist nicht immer klar zu identifizieren, ob das obere oder das untere Produkt das „eigentliche“ Zielprodukt ist.

100.000, 10.000 und 1000 entsprach. Danach wurden mehrere PCR Ansätze mit 25µl PCR Volumen gemischt (siehe Abschnitt 2.5.2). Die Zyklenzahl der ersten PCR wurde hierbei variiert bis zu einer maximalen Anzahl von insgesamt 18 Zyklen. Diese Anpassung ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst:

Kondition	Zyklenzahl
(einmalig 94°C 1min); 94°C 30sek; 72°C 2min	2
94°C 30sek, 70°C 1min, 72°C 1min	2
94°C 30sek, 68°C 1min, 72°C 1min	2-14

**Tabelle 3.1: Anpassung der Zyklenzahl der ersten PCR.** Lediglich der letzte Zyklus wurde bei der Anpassung verändert.

Die zweite PCR wurde stabil bei 30 Zyklen gehalten (siehe Abschnitt 2.5.2). Sichtbar wurde zum einen, dass eine Erhöhung der Zyklenzahl bei geringeren Konzentrationen für das Erscheinen von klaren Produkten in der Zielregion notwendig war, jedoch bei weiterer Erhöhung auch ein zusätzliches, abgrenzbares Produkt hinzutrat (Abb. 3.2).

Schlussfolgernd muss bei einer geringen Zellzahl die Anzahl der Zyklen erhöht werden. Dabei darf die Zyklusanzahl nicht zu hoch gewählt werden, da zusätzliche, unspezifische PCR Produkte entstehen. Wie in Tabelle 3.2 zusammengefasst, eignen sich eine Zykluszahl von 8 für <50.000 Zellen, eine Zykluszahl von 10 für <10.000 Zellen und eine Zykluszahl von 12 für weniger als 1000 Zellen.

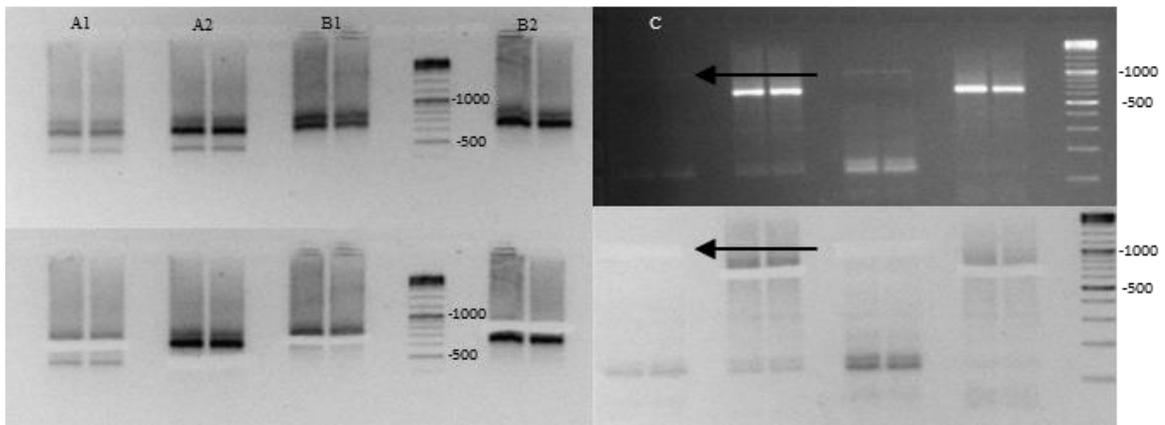
Zellzahl	Zykluszahl 1. PCR
<50.000	8
<10.000	10
<1.000	12

**Tabelle 3.2: Zykluszahl zur Anpassung der Rezeptor-PCR an die Zellzahl.**

Dennoch waren nicht nur PCR-Produkte in der Zielregion, sondern teilweise auch in nicht spezifischen Bereichen zu finden. Bei *Library*-Präparationen verschiedener T-Zell-Subpopulationen (präpariert wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben) fanden sich (neben dem bereits erwähnten Produkt in der Zielregion im Bereich zwischen 700 und 800bp) Produkte im Bereich von 500bp oder 1000bp. Zur tiefergehenden Analyse wurden drei Proben ausgewählt, die jeweils eine der drei erwähnten Produkte generierten. Die Präparation erfolgte für jede Probe wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, nur wurden für die Barcode-PCR jeweils zwei Reaktionsansätze pro Probe mit einem Reaktionsvolumen von 50µl generiert. Die beiden Reaktionsansätze besaßen eine unterschiedliche Barcode-Kombination, als *Template* diente aber für beide Ansätze dasselbe aufgereinigte PCR-Produkt der Rezeptor-PCR. Somit konnten durch die verschiedenen Barcodes die unterschiedlichen PCR-Produkte, die nach der Barcode-PCR aus demselben Rezeptor-PCR-Produkt generiert worden sind, gleichzeitig sequenziert werden.

Abb. 3.3 zeigt die PCR-Produkte in der Gelelektrophorese, die ausgeschnitten, aufgereinigt, quantifiziert, sequenziert und deren Rezeptorrepertoires analysiert wurden (siehe Abschnitt 2.5.2.3, 2.6.2, 2.7 und 2.8). Das Produkt der spezifischen Region A1 wurde mit A2, einem PCR-Produkt im Bereich von 500bp verglichen. Wiederum wurde das Produkt in der spezifischen Region B1 mit B2, einem zusätzlichen Produkt im noch spezifischen Bereich verglichen. Bei

einer Probe trat lediglich das Produkt C im Bereich von 1000bp auf, welches deshalb nur allein sequenziert wurde:



**Abb. 3.3 Gelelektrophorese von TZR-Libraries.** Die Proben A1 und A2 bzw. B1 und B2 sind aus derselben cDNA bzw. aus demselben, aufgereinigten ersten PCR-Produkt generiert, jedoch mit einer unterschiedlichen Barcodekombination in der zweiten PCR versehen worden, um eine gleichzeitige Sequenzierung zu ermöglichen. Ausgeschnitten wurden bei A1 das PCR-Produkt im spezifischen und bei A2 das im unspezifischen Bereich bei ca. 500bp, bei B1 wiederum das Produkt im spezifischen und bei B2 das etwas höher gelegene Produkt, noch im spezifischen Bereich. In C wurde nur ein sehr schwach sichtbares Produkt im unspezifischen Bereich bei ca. 1000bp ausgeschnitten, da bei dieser Probe kein Produkt im spezifischen Bereich generiert wurde.

Das größte PCR-Produkt C lag in einem Bereich von 1.000bp. Dieses wurde mit 150 Basen von beiden Seiten sequenziert (vgl. Abschnitt 2.7.3). Ein erster Versuch des *Alignments* mit MiXCR (s.u.) ergab 42.708 Sequenzen, wobei lediglich 1048 Sequenzen TZR- $\beta$ -Rezeptoren darstellten. Nach Ausschluss von nicht funktionellen Rezeptoren (Rezeptorsequenzen mit einem *Frameshift* und/oder einem Stopcodon) wurden lediglich 629 TZR- $\beta$ -Rezeptoren identifiziert, die zu nur 8 Klonen gehörten. Daraufhin wurden einzelne, zufällig ausgewählte *Reads* der Rohdaten mit dem Web-Tools IgBlast (Ye et al. 2013; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) nochmals näher betrachtet. Die Analysen der Stichprobe, sequenziert von der konstanten Region aus, zeigten häufig V-Gen-Sequenzen, teilweise der  $\alpha$ -Kette, in der eigentlich die CDR3 zu erwarten gewesen wäre. VD $\beta$ -Kombinationen im Bereich der FR2 ohne CDR3 oder Kombinationen aus Genen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette waren ebenfalls zu finden. Ebenso waren in den Stichproben der *Reads*, die von der TS-Oligo-Sequenz aus sequenziert wurden, teilweise V-D-Kombinationen, nur V-Gene oder FR2- und FR3-Regionen oder Kombinationen aus  $\alpha$ -Genen zu sehen.

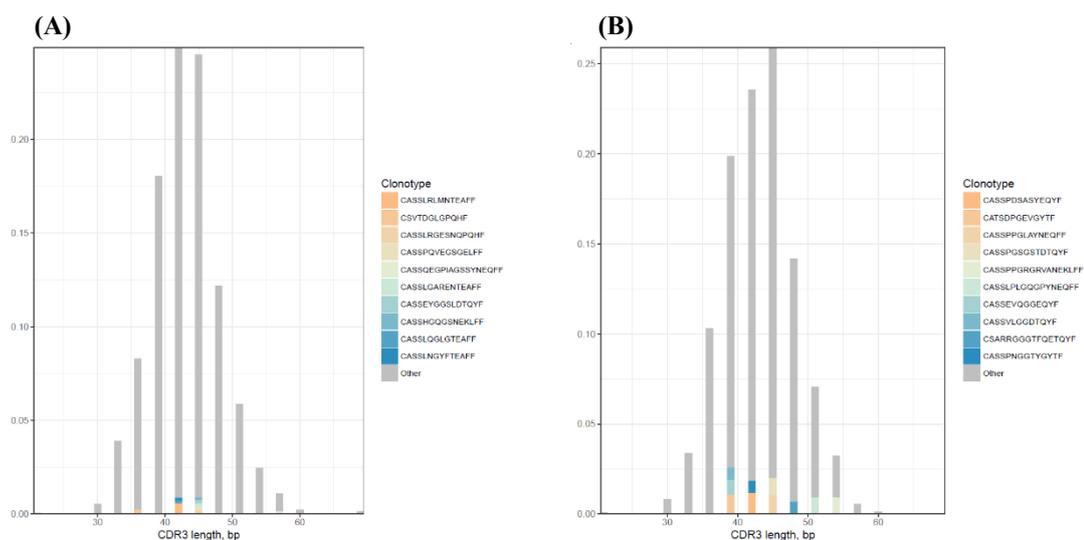
Ähnlich verhielt es sich bei dem sequenzierten Produkt mit einer Länge von ca. 500bp. Dieses wurde mit 250bp von beiden Seiten sequenziert. In den analysierten Stichproben, sequenziert von der konstanten Region aus, erschienen teilweise V-J-Rearrangements von TZR- $\alpha$ -Genen oder

Kombinationen aus Genen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, ohne erkennbare CDR3. In den Stichproben der *Reads*, die von der TS-Oligo-Sequenz aus sequenziert wurden, zeigten sich einzelne  $V\alpha$ -Gene,  $VJ\alpha$ - oder Kombinationen aus Genen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Bei 9% der 95.983 *Reads* war ein *Alignment* mit MiXCR möglich.

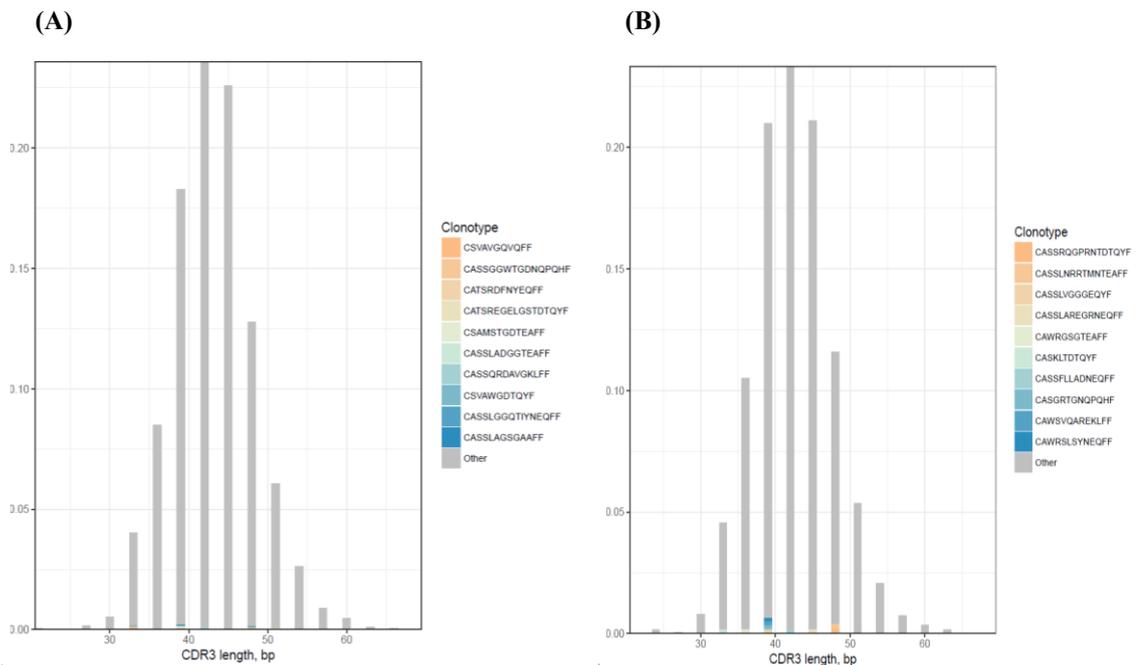
Die Analyse der Sequenzen, generiert aus dem zusätzlichen PCR-Produkt im Bereich der Zielgröße (700-800bp), zeigte in den Stichproben ebenfalls fragmentierte Gene in beiden *Reads*, die  $\alpha$ -,  $\beta$ -, teilweise auch Kombinationen aus  $\delta$ - und  $\gamma$ -Genen enthielten, wieder mit fehlender Identifizierung der CDR3 im Bereich der konstanten Region oder fragmentierter V-Gene in dem Bereich, der von der TS-Oligo-Sequenz aus sequenziert wurde. Dennoch waren in der Stichprobe auch häufig funktionelle TZR-Sequenzen vorhanden. Das bestätigte auch das *Alignment* mit MiXCR, da bei der Auswertung im Vergleich zu den analysierten Sequenzen der anderen Produkte mehr Rezeptorsequenzen identifiziert werden konnten. Es konnten ca. 53,5% der 48.399 Sequenzen TZR- $\beta$ -Rezeptoren zugeordnet werden.

Um den optimalen Bereich für die Analyse festzulegen, wurden bestimmte Bereiche durch die folgenden Kriterien ausgeschlossen:

Das ca. 1000bp große PCR-Produkt wurde durch den geringen Anteil identifizierbarer Sequenzen, die hohe Fehlerrate in den Stichproben und das seltene Auftreten dieses Produkts ignoriert. Das Produkt bei 500bp zeigte ebenfalls eine hohe Rate nicht von der Software identifizierbaren Sequenzen (nur ca. 9% der *Reads*, s.o. im selben Abschnitt). Dabei glich die CDR3-Längenverteilung der identifizierten Sequenzen einer Gaußschen Verteilung. Vergleich man zusätzlich die Top 10 Klone, generiert aus dem PCR-Produkt im TZR- $\beta$  spezifischen Bereich, waren diese auch verschieden (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: CDR3-Längenverteilung des Immunrepertoires aus dem spezifischen (A) und eines unspezifischen Produkts im Bereich von 500bp (B).** Die häufigsten 10 Klone stimmen nicht überein, das Repertoire ist einer Gauß-Verteilung sehr ähnlich.

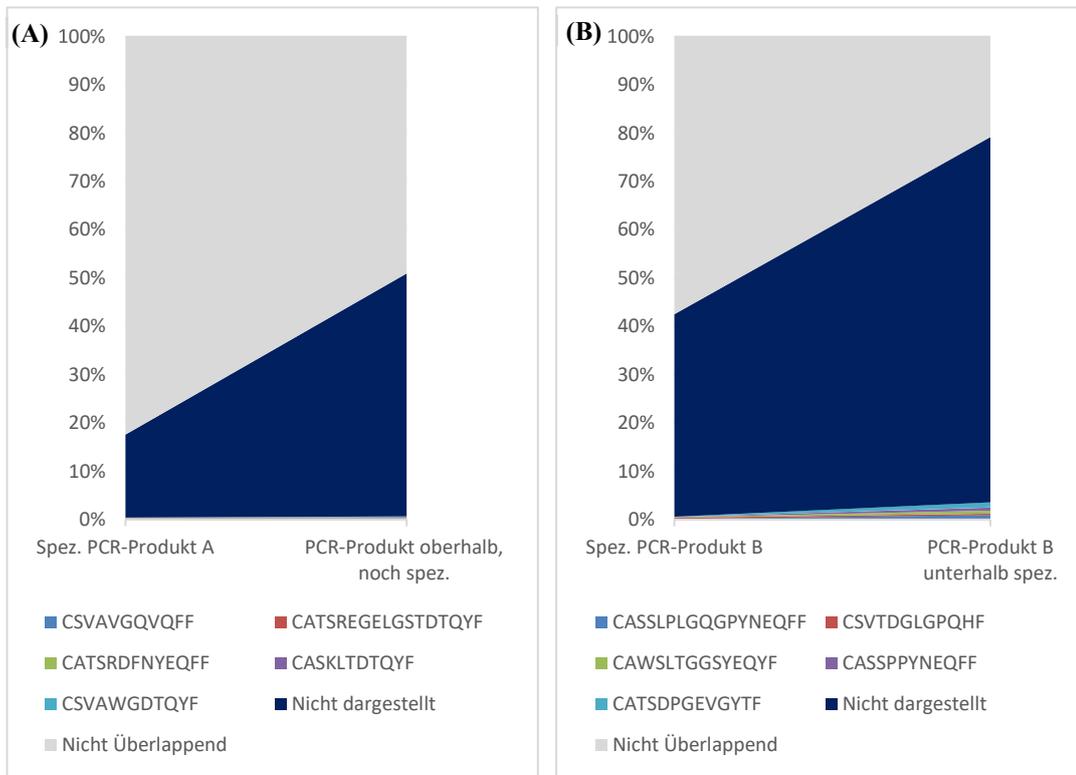


**Abb. 3.5:** CDR3-Längenverteilung des Immunrepertoires aus dem spezifischen (A) und dem leicht größeren PCR-Produkt im noch TZR- $\beta$ -Library-spezifischen Bereich (700-800bp) (B). Die häufigsten 10 Klone beider Produkte stimmen nicht überein und das Repertoire sieht einer Gauß-Verteilung ähnlich.

Bei dem Vergleich des Gesamtrepertoires des Produkts aus der 500bp-Region mit dem aus der spezifischen Region fiel jedoch auf, dass ca. 80% des Repertoires aus dem unspezifischen Produkt mit dem Repertoire aus der spezifischen Region identisch und lediglich 20% unterschiedlich waren (Abb. 3.6, (A)). Somit konnte man daraus vermuten, dass die identifizierten Rezeptorsequenzen vorwiegend fragmentierte Sequenzen darstellen, die auch im spezifischen PCR-Produkt zu finden sind.

Das manchmal schwer differenzierbare, mehrfache Produkt in der Zielregion mit einer Länge von 700-800bp wurde jedoch in die Analyse mit aufgenommen, da trotz fehlerhafter und fragmentierter Sequenzen noch ein relativ gutes *Alignment* möglich war (ca. 53,5%, s.o. im selben Abschnitt). Die Darstellung der CDR3-Längenverteilung ergab keine Übereinstimmung in den Top-Klonen und eine normalverteilt wirkende Längenverteilung (Abb. 3.5). Der Vergleich der kompletten Repertoires der zwei PCR-Produkte aus der spezifischen Region zeigte, dass ca. 50% der Sequenzen in beiden Repertoires zu finden waren. Dies bedeutet aber auch, dass ca. 50% des Repertoires nicht übereinstimmten (Abb. 3.6). Somit schien der Verlust an Sequenzen, die ein potentiell funktionsfähigen Rezeptor bilden und einen großen Teil des Rezeptorrepertoires ausmachen könnten, sehr hoch, wenn dieses Produkt ignoriert worden wäre.

Dementsprechend wurden zusätzliche PCR-Produkte in der Zielregion mit einer Größe von 700-800bp in die Analyse eingeschlossen, während unspezifische Produkte mit einer Größe von 500bp und 1000bp ausgeschlossen wurden.



(C) PCR-Produkt	Sequenzen	TZR-β	Ohne <i>Frameshift</i> / Stopcodon	Clonotypes
Spez. PCR-Produkt A	95678	57585	42477	13249
PCR-Produkt oberhalb, noch spez.	48399	23658	7145	3551
Spez. PCR-Produkt B	38162	20585	16082	3321
PCR-Produkt B unterhalb spez.	95983	8299	4775	1457

**Abb. 3.6: Relative Überlappungen der Repertoires, generiert aus den jeweiligen PCR-Produkten.**

Angegeben ist, wie viel Prozent des Gesamtrepertoires jeweils im Repertoire des zum Vergleich herangezogenen PCR-Produkts zu finden war. Dabei wird in (A) das Produkt im spezifischen mit dem Produkt etwas oberhalb, jedoch noch im spezifischen Bereich (vgl. Abb. 3.3 (A1 und A2)), in (B) das spezifische Produkt mit dem im unspezifischen Bereich bei einer Länge von ca. 500bp verglichen (vgl. Abb. 3.3 (B1 und B2)). Das PCR-Produkt oberhalb (A) zeigt eine Überlappung von ca. 50% mit dem spezifischen Produkt, sodass ca. 50% unbekannte Sequenzen in diesem PCR-Produkt zu finden sind. (B) zeigt, dass das Produkt in der unspezifischen Region beinahe zu 80% aus bekannten, im spezifischen Produkt vorkommende Sequenzen besteht, sodass nur ungefähr 20% unbekannte Sequenzen des Repertoires in dem unspezifischen Produkt vorhanden sind. In (C) sind die generierte Menge an Sequenzen, die daraus resultierende Menge an TZR-β-Sequenzen und die Anzahl der Sequenzen, die auch einen produktiven Rezeptor ergeben würde (nach Ausschluss der Sequenzen mit *Frameshift* und/oder einem Stopcodon), zusammengefasst. *Clonotypes* gibt die Anzahl unterschiedlicher Klone an, die insgesamt in dem jeweiligen analysierten Repertoire vorkommen.

### **3.1.3 Eine Erhöhung der Molarität auf der *Flow cell* führte nur zu einer leichten Erhöhung generierter Sequenzen**

Nach einigen Einstellungstests erfolgte letztlich die Sequenzierung ausschließlich mit Rezeptorlibraries auf der *Flow cell*. Dabei wurden zunächst die präparierten Libraries auf 2nM gebracht und mit einer finalen Konzentration von 8pM auf der *Flow cell* sequenziert. Dabei wurden 250 Basen beider Reads gelesen. Zur Erhöhung der Diversität wurde die Probe mit 40% PhiX-Control versetzt. So wurde allerdings nur eine geringere Clusterdichte von 500k/mm<sup>2</sup> erreicht und ca.  $3,217 \cdot 10^6$  Rezeptorsequenzen generiert werden, was eine geringere Menge ist, die eigentlich technisch möglich wäre. Um höhere Konzentrationen auf der *Flow cell* zu erreichen und somit die Menge an Reads zu erhöhen, wurde die Library auf eine Konzentration von 4nM und die finale Konzentration auf 13pM gebracht. Nun lag die Clusterdichte bei 736K/mm<sup>2</sup>. Dies entsprach ca.  $3,627 \cdot 10^6$  Rezeptorsequenzen.

### **3.1.4 Die Anzahl identifizierter Klone veränderten das Erscheinungsbild eines Repertoires, ohne dass eine erhöhte Anzahl an Sequenzen zwangsläufig zu einer erhöhten Anzahl identifizierter Klone führte**

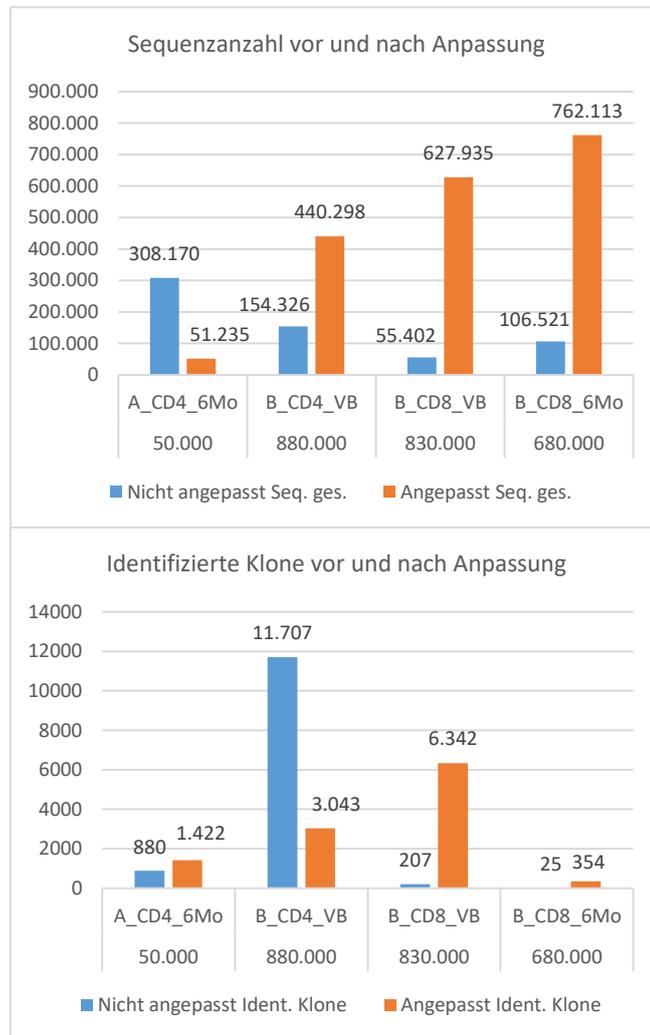
Die TZR-Libraries des folgenden Abschnitts wurden zweimal sequenziert. Das erste Mal wurde die Rezeptor-PCR mit einem genspezifischen UID-TZR-Primer gestartet und die fertigen Libraries zusammen mit Libraries anderer Genese ohne Anpassung der Zellzahl sequenziert. Das zweite Mal wurde ein TZR-Primer ohne UID verwendet, die Konzentration und die Zyklenzahl der ersten PCR anhand der Zellzahl angepasst und lediglich TZR-Libraries auf einer *Flow cell* sequenziert (Tabelle 3.3). Dabei wurden bei der ersten Sequenzierung 5µl cDNA und 50µl PCR Volumen für die Rezeptor-PCR verwendet. Bei der zweiten angepassten Sequenzierung wurde das Ausgangsmaterial und das PCR Volumen halbiert (2,5µl cDNA und 25µl PCR-Volumen).

		nicht angepasst				
Probe	Zellen	Zyklen Rezeptor- PCR	Gesamt	TZR- $\beta$	Ohne <i>Frameshift</i> / <i>Stopcodon</i>	<i>Clonotypes</i>
A_CD4_VB	740.000	6	274.453	113.285	78.893	11.678
A_CD4_6Mo	50.000	6	308.170	244.453	185.564	880
A_CD8_VB	380.000	6	336.584	241.652	202.781	5.330
A_CD8_6Mo	66.000	6	461.708	304.199	233.035	1.428
B_CD4_VB	880.000	6	154.326	95.558	71.968	11.707
B_CD4_6Mo	23.500	6	37.366	30.428	19.411	267
B_CD8_VB	830.000	6	55.402	44.293	18.975	207
B_CD8_6Mo	680.000	6	106.521	85.303	36.952	25
		angepasst				
A_CD4_VB	740.000	6	345.121	223.436	176.729	26.308
A_CD4_6Mo	50.000	6	51.235	37.519	29.734	1.422
A_CD8_VB	380.000	6	143.743	102.207	75.010	7.616
A_CD8_6Mo	66.000	6	98.542	73.532	52.493	2.949
B_CD4_VB	880.000	6	440.298	348.113	39.296	3.043
B_CD4_6Mo	23.500	8	29.788	21.591	16.704	587
B_CD8_VB	830.000	6	627.935	481.132	367.114	6.342
B_CD8_6Mo	680.000	6	762.113	538.665	340.813	354

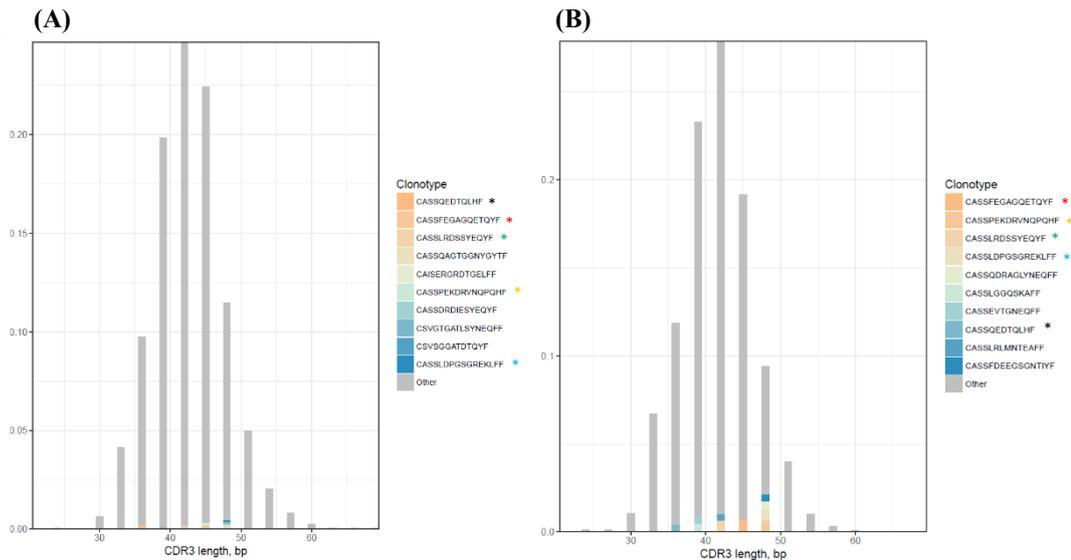
**Tabelle 3.3: Menge generierter Sequenzen vor und nach Anpassung an die ursprüngliche Zellzahl der einzelnen Proben.** Die Probenbezeichnung setzt sich aus dem Buchstaben der Patientin (A oder B), der Population (CD4 oder CD8 positive T-Zellen) und dem Zeitpunkt (vor Behandlung (VB) oder nach 6 Monaten Therapie (6Mo)) zusammen. Dabei wurde einmal die Sequenzierungstiefe an die Zellzahl angepasst, einmal wurde diese Anpassung nicht vorgenommen. Angegeben werden zudem die Anpassung der Zyklen der Rezeptor-PCR, die identifizierten TZR- $\beta$  Sequenzen aus der Gesamtanzahl generierter Sequenzen, die Anzahl der Sequenzen, aus denen auch ein funktionierender Rezeptor generiert werden kann (ohne *Frameshift* / *Stopcodon*), und die daraus resultierenden unterschiedlichen Klone (*Clonotypes*). Nicht immer gelang es, die Sequenzanzahl exakt an die Zellzahl anzupassen (ausgewertet mit MiXCR und VDJTools).

Von Interesse war die Frage, ob und in welchem Ausmaß die unterschiedlichen Abdeckungen die Analyse der Daten und somit auch die Interpretation veränderten. Betrachtet man Abb. 3.7, kam es bei der Erhöhung der Sequenzanzahl auch zu einer erwarteten, erhöhten Identifikation von unterschiedlichen Klonen, die bei der geringeren Abdeckung nicht identifiziert wurden (B\_CD8\_VB oder B\_CD8\_6Mo). Bemerkenswert war aber, dass trotz erhöhter Anzahl an

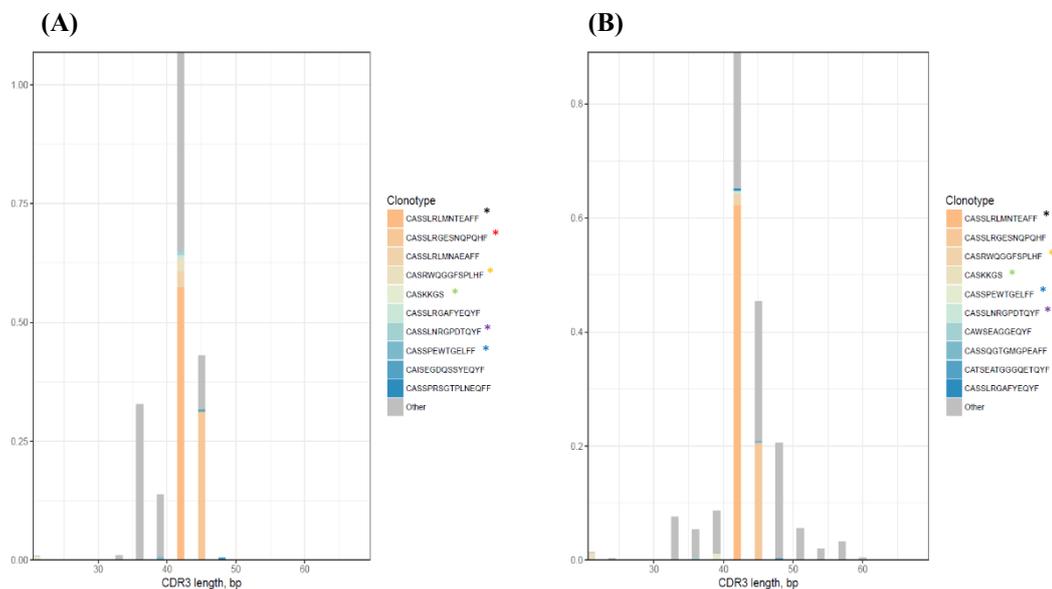
Sequenzen es teilweise zur Reduktion identifizierter Klone kam (B\_CD4\_VB) oder umgekehrt bei einer geringeren Sequenzanzahl zu einem Anstieg von identifizierten Klonen (A\_CD4\_6Mo).



**Abb. 3.7: Säulendiagramme der Sequenzmenge (Seq. ges.) und die jeweiligen identifizierten Klone (Ident. Klone) vor und nach der Anpassung.** Angegeben ist neben der Probenbezeichnung zusätzlich die Zellzahl der Probe. Bei A\_CD4\_6Mo konnten nach Reduktion der Sequenzanzahl mehr Klone identifiziert werden, während bei B\_CD4\_VB die Erhöhung der Sequenzanzahl zu einer verringerten Identifizierung von Klonen führte. In beiden anderen Proben (B\_CD8\_VB und B\_CD8\_6Mo) fanden sich durch die erhöhte Sequenzanzahl auch mehr identifizierter Klone.



**Abb. 3.8: Darstellung der CDR3-Längenverteilung des Repertoires von B\_CD4\_VB.** Die häufigsten zehn Klone sind farblich dargestellt. **(A)** stellt das nicht adaptierte, **(B)** das adaptierte Repertoire derselben Probe dar. Dabei wurden trotz erhöhter Sequenzanzahl weniger Klone identifiziert **(B)** (vgl. Abb. 3.7). Die häufigsten Klone nehmen in **(B)** einen größeren Anteil im Repertoire ein. Zudem sind nicht alle Top-Klone in beiden Varianten zu finden, auch die Reihenfolge der gleichen Klone (mit einem farbigen Sternchen markiert) ist unterschiedlich.



**Abb. 3.9: Darstellung der CDR3-Längenverteilung des Repertoires von B\_CD8\_6Mo.** Die häufigsten zehn Klone sind farblich dargestellt. **(A)** stellt das nicht adaptierte, **(B)** das adaptierte Repertoire derselben Probe dar. Dabei wurden bei erhöhter Sequenzanzahl auch mehr Klone identifiziert **(B)** (vgl. Abb.3.7). Das auch in **(A)** schon sehr oligoklonal wirkende Repertoire scheint in **(B)** einer Gaußschen Verteilung näher zu kommen, dennoch sind die expandiert wirkenden Klone in beiden Versionen sehr prominent. Nicht alle Klone sind in beiden Varianten unter den häufigsten zehn zu finden (gleiche Klone sind mit einem farbigen Sternchen markiert), die Reihenfolge der zwei dominierenden Klone bleibt aber erhalten.

Weder die Menge des eingesetzten Ausgangsmaterials noch die Angleichung der Abdeckung an die Zellzahl schien in einem offensichtlichen Zusammenhang zur Erhöhung identifizierter Klone zu stehen. Weder mehr eingesetztes Ausgangsmaterial in Form von cDNA noch die Erhöhung der Sequenzanzahl einer Probe ergaben zwangsläufig mehr Klone oder umgekehrt. Außer bei B\_CD4\_6Mo wurden auch keine Zyklusanpassungen aufgrund geringer Zellzahl vorgenommen, die diese Schwankungen der identifizierten Klone erklären würde.

Welche Auswirkungen das auf die Auswertung des Repertoires bzw. auf die Verteilung der häufigsten Klone hatte, zeigen die Abb. 3.8 und Abb. 3.9. Die Probe B\_CD4\_VB (Abb. 3.8) ist ein Beispiel für ein eher diverses Repertoire, dessen adaptierte Version trotz erhöhter Sequenzen eine reduzierte Anzahl an Klone zeigte. Die Darstellung der Längenverteilung variiert untereinander leicht, zudem waren die dominanten Klone prominenter anzutreffen. Deren Art und deren Reihenfolge hatte sich teilweise verändert. Dabei lagen die ersten vier Klone mit ihrem relativen Anteil am Repertoire (%) und ihrer absoluten Sequenzanzahl (x) nah beieinander, wie Tabelle 3.4 zeigt:

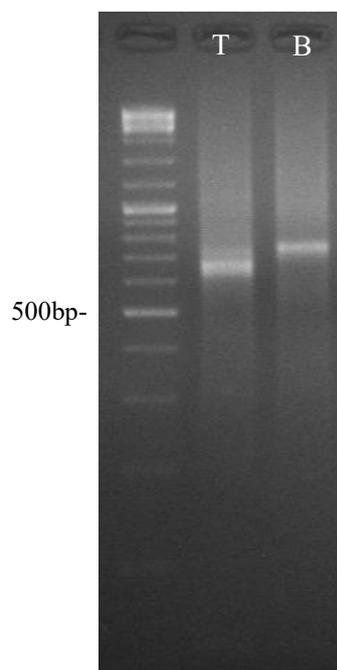
	<b>B_CD4_VB</b>		<b>B_CD8_6Mo</b>	
	<b>Anteil des Klons am Repertoire</b>		<b>Anteil des Klons am Repertoire</b>	
<b>Klon</b>	<b>nicht adaptiert</b>	<b>adaptiert</b>	<b>nicht adaptiert</b>	<b>adaptiert</b>
1	0,2% (147)	0,68% (267)	57,5% (21.253)	62,3% (212.389)
2	0,19% (136)	0,654% (257)	31,2% (11.433)	20,6% (70.249)
3	0,17% (119)	0,646% (254)	3,3% (1.219)	2% (6.747)
4	0,13% (95)	0,059% (233)	2,6% (973)	1,3% (4.519)

**Tabelle 3.4: Anteil der ersten vier Klone am Repertoire und ihre absolute Sequenzanzahl (in Klammern) vor und nach Adaption an die Zellzahl.**

Bei Probe B\_CD8\_6Mo (Abb. 3.9), als Beispiel für ein weniger diverses Repertoire, wurden durch die Erhöhung der Sequenzen auch mehr Klone gefunden. Dabei zeigte sich, dass sich das Repertoire breiter aufstellt und die CDR3-Verteilung einer Gauß-Verteilung näherkam als vor der Adaption. Die zwei sehr dominanten Sequenzen änderten sich zwar in ihrem relativen Verhältnis, deren Rangfolge blieb jedoch gleich. Der relative Anteil am Repertoire und die absoluten Sequenzzahlen waren bei Klon 1 und 2 in beiden Varianten deutlich größer als bei den restlichen Klonen (Tab. 3.4).

### 3.1.5 Etablierung eines Protokolls für die Generierung von *Libraries* mit B-Zell-Rezeptoren vom Typ IgG

Das Protokoll war durch kleine Veränderungen auch für die Generierung von B-Zell-Rezeptor-*Libraries* nutzbar. Die cDNA-Synthese nach dem 5'RACE Verfahren war für RNA mit B-Zell-Rezeptoren identisch, sodass in der generierten cDNA ebenfalls die TS-Oligo-Sequenz inkorporiert vorlag. Durch den Austausch des genspezifischen *Primers* durch einen Isotyp-spezifischen *Primer*, der die konstante Region des Immunglobulin G bindet (vgl. Abschnitt 2.5.1), kombiniert mit einem Teil des Illumina-Adapters (vgl. Abschnitt 2.5.2.1), war eine Amplifikation von B-Zell-Rezeptoren zur Generierung einer BZR-*Library* möglich. Die Zyklenzahl der ersten PCR musste angepasst und auf insgesamt 12 Zyklen erhöht werden (vgl. Abschnitt 2.5.3). Da die Illumina-Adaptersequenzen nicht verändert werden mussten, um eine Bindung an die *Flow cell* bzw. die Bindung eines Sequenzierungsprimers zu ermöglichen, wurde somit auch die Barcode-PCR nicht verändert. Sie diente lediglich der Vervollständigung der Adaptersequenz und war dadurch unabhängig von der Art des vorher generierten Amplikons bzw. der Rezeptorsequenz (vgl. Abschnitt 2.5.2, insbesondere Abb. 2.3). Damit war es z.B. möglich, aus der gleichen cDNA, generiert aus einer PBMC-Probe nach dem 5'RACE-Verfahren (vgl. Abschnitt 2.4), in der sowohl B- als auch T-Zellen gemeinsam vorliegen, auch *Libraries* für beide Rezeptoren zu präparieren. Eine Gelelektrophorese solcher PCR-Produkte bzw. der fertigen *Libraries* zeigt Abb. 3.10:



**Abb. 3.10: Gelelektrophorese einer fertigen TZR- (T) und BZR-*Library* (B) aus derselben PBMC-cDNA.** Nachdem 6 Zyklen die T-Zell bzw. 12 die B-Zell-Rezeptoren in der ersten PCR amplifiziert wurden, wurden beide Produkte mittels DNA-bindender *Beads* aufgereinigt. Das jeweilige PCR-Produkt diente in beiden Fällen als *Template* für die nachfolgende Barcode-PCR. Sichtbar ist das Produkt dieser Barcode-PCR. Dabei ist zum einen ein spezifisches TZR-*Library* Produkt zwischen 600 und 700bp (T) und eine etwas größeres PCR-Produkt einer BZR-*Library* (B) bei ca. 700-750bp zu sehen.

## 3.2 Multiple Sklerose und Fingolimod

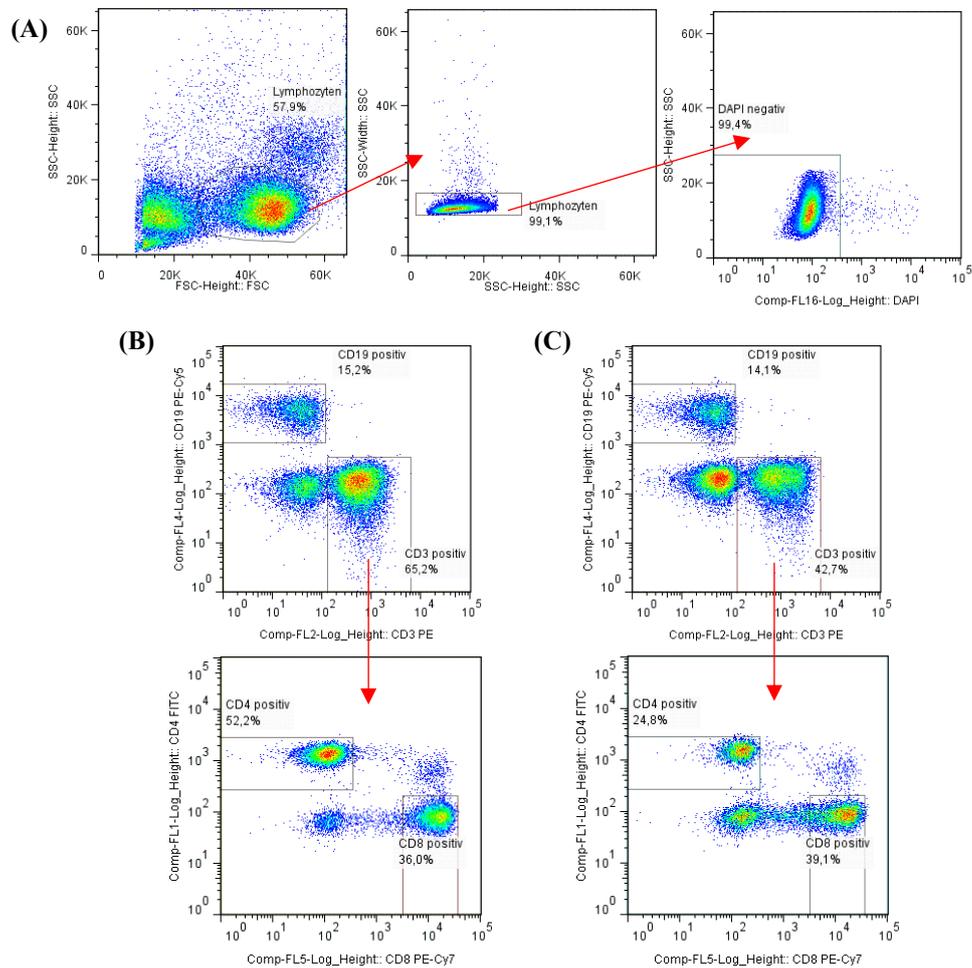
Wie in 3.1.4 erläutert, wurden die Proben mehrmals sequenziert, sowohl mit fremden *Libraries* als auch nur mit *Rezeptorlibraries* und angepasst an die ursprüngliche Zellzahl der Probe. In den folgenden Abschnitten wurden die NGS-Daten der Proben analysiert, die nur mit *Rezeptorlibraries* sequenziert und an die Zellzahl angepasst worden sind.

### 3.2.1 Fingolimod bewirkte eine Reduktion und eine veränderte Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation

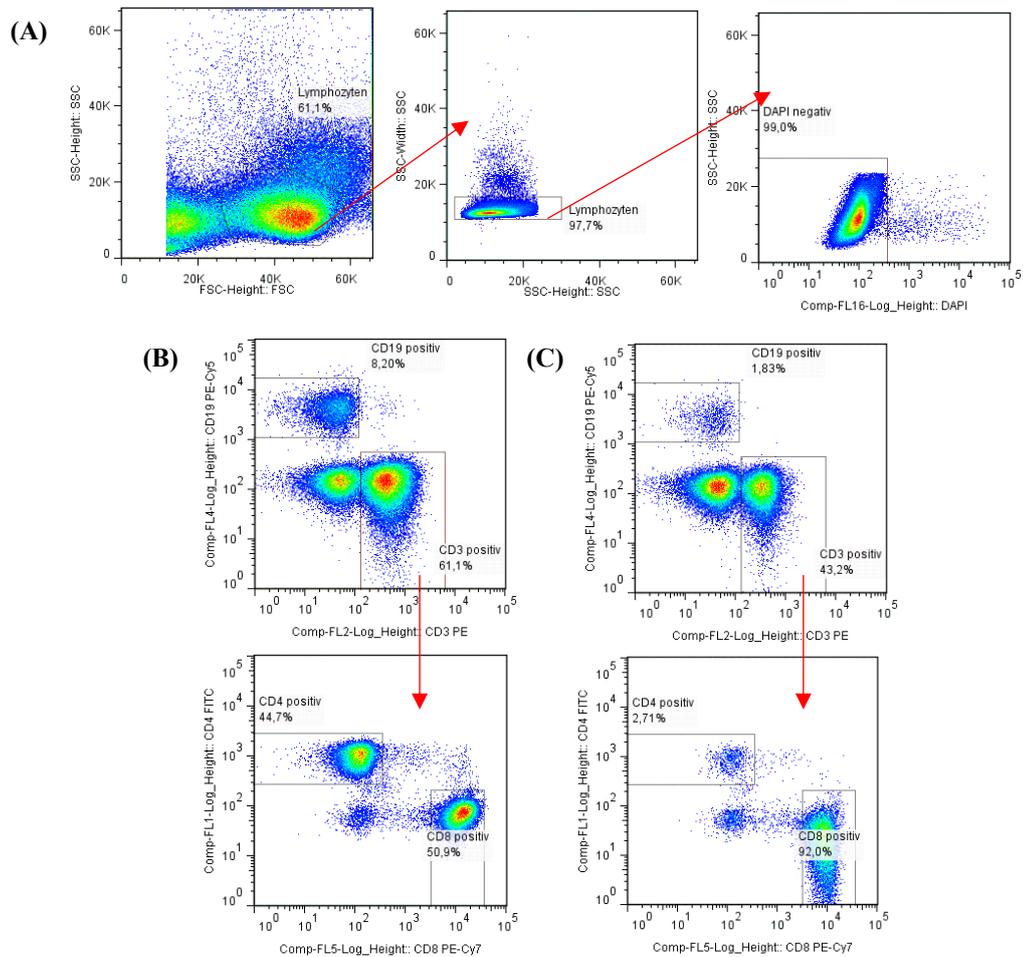
Zu Beginn wurden die PBMC-Proben beider Patientinnen mithilfe des MoFlo XDP einer FACS-Analyse unterzogen. Gefärbt wurden die Antigene CD3, CD4, CD8, CD19, CD27 und CD138, zusätzlich wurde DAPI für die Färbung toter Zellen hinzugegeben. Detaillierter betrachtet wurde nach dem Ausschluss DAPI-positiver Zellen die Verteilung der Lymphozyten in CD3(+)- und CD19(+)-Zellen bzw. zur weiteren Differenzierung von CD3(+)-T-Zellen zusätzlich die CD4(+)- und CD8(+)-Fraktion zu beiden Zeitpunkten. Die restlichen Färbungen wurden hier nicht weiter berücksichtigt.

Bei beiden Patientinnen war ein Rückgang der Lymphozytenpopulation zu beobachten. Bei Patientin A sank die Lymphozytenpopulation unter Behandlung von 57,9% auf 50,3%, die CD3(+)-T-Zell-Population von 65,2% auf 42,7%. Dabei blieb die CD19(+)-Lymphozytenpopulation annähernd konstant (15,2% auf 14,1%). Bei den CD3(+)-Subpopulationen sank die CD4(+)-Fraktion um ca. die Hälfte von 52,2% auf 24,8%, der CD8(+)-Anteil veränderte sich kaum (Anstieg von 36,1% auf 39%) (Abb. 3.11). Die CD4/CD8-Ratio sank von 1,45 auf 0,634.

Bei Patientin B waren die Veränderungen drastischer. Die Lymphozytenpopulation sank unter Behandlung von 61,1% auf 43,2%, der Anteil der CD3(+)-T-Zellen von 61,1% auf 43,2%. Dabei reduzierte sich die CD3(+)/CD4(+)-Subpopulation sehr deutlich (44,7% auf 2,71%), wodurch die CD3(+)/CD8(+)-Fraktion von 50,9% auf 92% anstieg. Somit sank die CD4/CD8-Ratio von 0,878 auf 0,0295. Auch die CD19(+)-B-Zellen verzeichneten eine Reduktion ihres Anteils an der Lymphozytenpopulation von 8,2% auf 1,83% (Abb. 3.12).



**Abb. 3.11: FACS-Analyse von Patientin A.** (A) zeigt die *Gating*-Strategie für die Lymphozytenpopulation und die Selektion lebender, DAPI-negativer Zellen. (B) zeigt die Lymphozytenverteilung in CD19 und CD3 positive bzw. CD4 und CD8 positive Zellen vor Behandlung, (C) die gleichen Populationen nach 6 Monaten. Erkennbar ist neben einer deutlichen Reduktion der CD3(+)/CD4(+)-Population unter Behandlung auch ein Rückgang von CD19(+)-Lymphozyten. (Diese Daten wurden für die Analyse der einzelnen Fraktionen aus den Rohdaten erstellt. Originale Bilder der Sortierung siehe Anhang.)



**Abb. 3.12: FACS-Analyse von Patientin B.** (A) zeigt die *Gating*-Strategie für die Lymphozytenpopulation und die Selektion lebender, DAPI-negativer Zellen. In (B) wird die Lymphozytenverteilung in CD19 und CD3 positive bzw. CD4 und CD8 positive Zellen vor Behandlung dargestellt, (C) zeigt die gleichen Populationen nach 6 Monaten Behandlung mit Fingolimod. Erkennbar ist neben einer deutlichen Reduktion der CD3(+)/CD4(+)- und eines Anstiegs der CD3(+)/CD8(+)-Population nach 6 Monaten auch ein Rückgang der CD19(+)-Lymphozytenfraktion. (Diese Daten wurden für die Analyse der einzelnen Fraktionen aus den Rohdaten erstellt. Originale Bilder der Sortierung siehe Anhang.)

Durch den MoFlo XDP konnten neben der Analyse zusätzlich die verschiedenen T-Zell-Populationen gesammelt werden, aus denen Sequenzen mithilfe des Illumina Miseqs generiert wurden und die in die spätere Analyse einfließen (Tabelle 3.5):

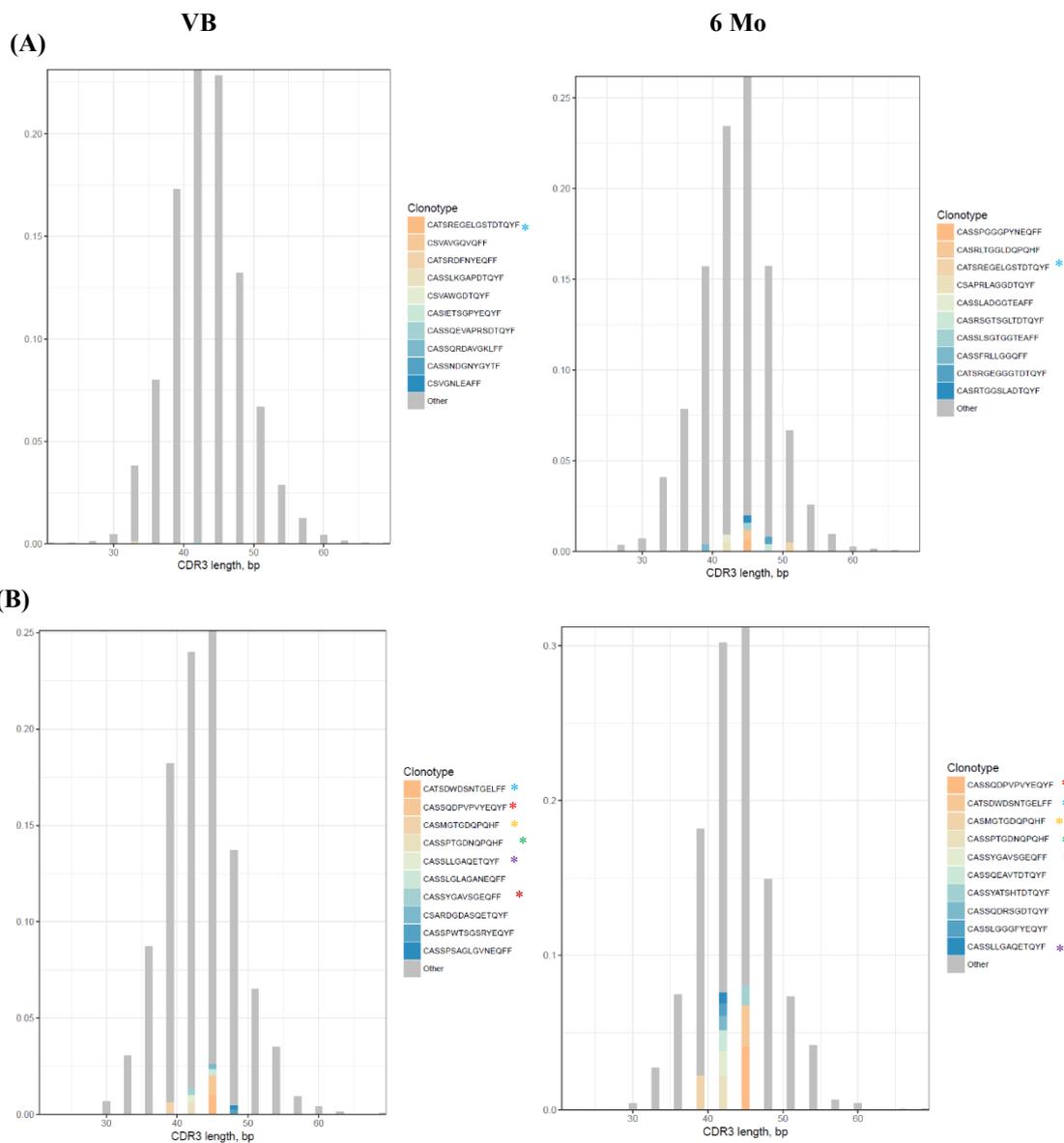
Patientin	Zeitpunkt	Population	Zellen
A	Vor Behandlung (VB) / erster Zeitpunkt	CD3(+)/CD4(+)	740.000
A	Nach 6 Monaten (6Mo) / zweiter Zeitpunkt	CD3(+)/CD4(+)	50.000
A	Vor Behandlung (VB) / erster Zeitpunkt	CD3(+)/CD8(+)	380.000
A	Nach 6 Monaten (6Mo) / zweiter Zeitpunkt	CD3(+)/CD8(+)	66.000

B	Vor Behandlung (VB) / erster Zeitpunkt	CD3(+)/CD4(+)	880.000
B	Nach 6 Monaten (6Mo) / zweiter Zeitpunkt	CD3(+)/CD4(+)	23.500
B	Vor Behandlung (VB) / erster Zeitpunkt	CD3(+)/CD8(+)	830.000
B	Nach 6 Monaten (6Mo) / zweiter Zeitpunkt	CD3(+)/CD8(+)	680.000

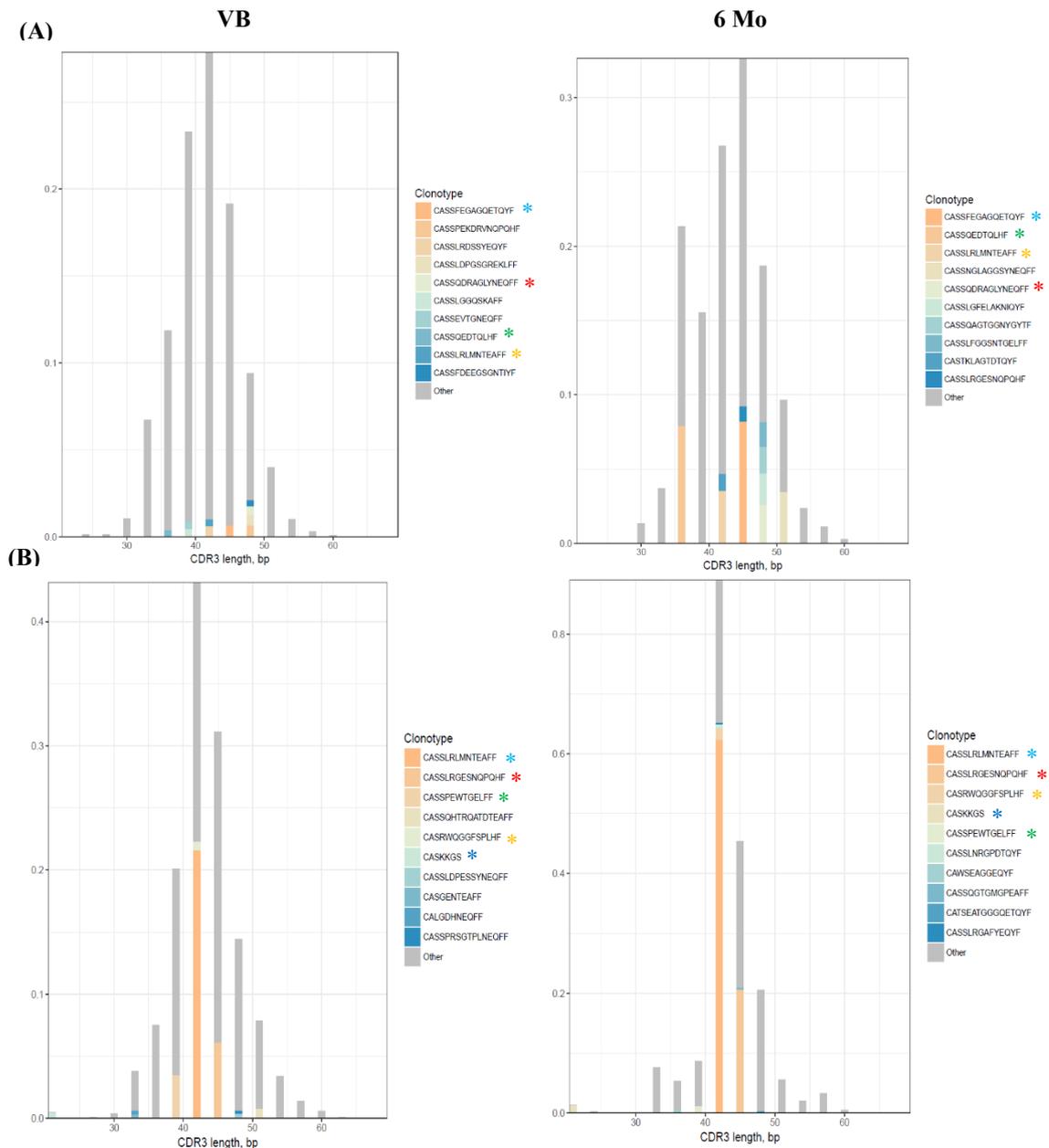
**Tabelle 3.5: Anzahl sortierter Zellen verschiedener T-Zell-Populationen beider Patientinnen zu beiden Zeitpunkten.**

### **3.2.2 Unter der Behandlung mit Fingolimod zeigte sich eine funktionelle Konstanz des Immunrepertoires**

Vor und nach Behandlung wurden die Längenverteilungen der CDR3 und die häufigsten 10 Klone verglichen. Die Verteilung der CDR3-Längen von Patientin A war bei beiden Populationen und zu beiden Zeitpunkten einer Gauß-Verteilung sehr ähnlich (Abb. 3.13). Bei Patientin B wirkten diese Verteilungen vor Behandlung ebenfalls einer Gauß-Verteilung ähnlich. Nach 6 Monaten Behandlung wurde die Verteilung jedoch unregelmäßig und nahm teilweise oligoklonalem Charakter an. Zudem nahm der Anteil der Top-Klone in beiden Populationen und Patientinnen zu. Dabei äußerte sich die deutlichere Reduktion der CD4-Population von Patientin B auch in der Einflussnahme der Top-Klone. Auch die CD8-Population dieser Patientin war trotz relativer Zunahme und großer Zellzahl beim FACS nach 6 Monaten Behandlung geprägt von wenigen unterschiedlichen Klonen (354) (siehe Abschnitt 3.1.4, Tabelle 3.3), von denen einige wenige in dieser Verteilung herausstachen (Abb. 3.14). Dabei zeigten sich sowohl vor als auch nach Behandlung Übereinstimmungen der CDR3-Sequenzen innerhalb dieser 10 Klone. Dies war sowohl in der CD4- als auch in der CD8-Population zu beobachten. Bei der CD4-Population fanden sich bei Patientin A ein, bei Patientin B vier Klone zu beiden Zeitpunkten wieder. Auch der Anteil der häufigen Klone nahm bei beiden Patientinnen in beiden Populationen sichtbar zu. In der CD8-Population waren bei Patientin A sechs, bei Patientin B fünf Klone zu beiden Zeitpunkten zu finden.



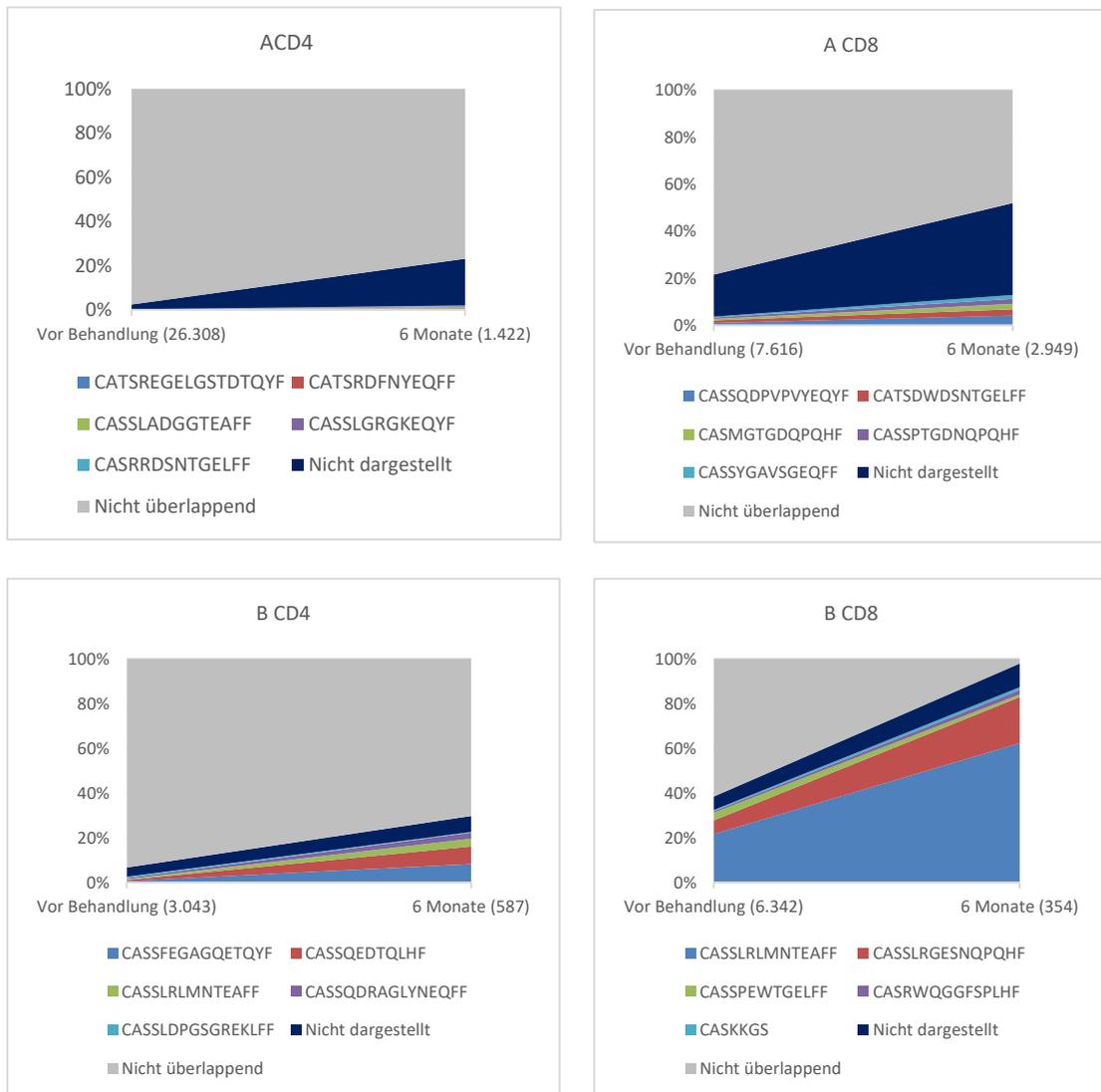
**Abb. 3.13: CDR3-Längenverteilung des TZR-Repertoires der CD4- (A) und CD8- (B) Population vor (VB) und nach 6 Monaten Behandlung (6 Mo) mit Fingolimod von Patientin A. Die häufigsten 10 Klone sind bei ihrer jeweiligen Länge mit ihrem Anteil an allen Klone mit dieser CDR3-Länge dargestellt. Es lassen sich gleiche Klone in beiden Populationen vor und nach 6 Monaten Behandlung wiederfinden, ein Klon in der CD4- und sechs in der CD8-Population. Diese sind farbig mit (\*) gekennzeichnet. Zudem haben die Top-Klone zum zweiten Zeitpunkt einen größeren Anteil am Repertoire.**



**Abb. 3.14: CDR3-Längenverteilung des TZR-Repertoires der CD4- (A) und CD8- (B) Population vor (VB) und nach 6 Monaten Behandlung (6 Mo) mit Fingolimod von Patientin B.** Es lassen sich gleiche Klone in beiden Populationen vor und nach 6 Monaten Behandlung wiederfinden, vier Klone in der CD4- und fünf in der CD8-Population. Diese sind farbig mit (\*) gekennzeichnet. Die Top-Klone zum zweiten Zeitpunkt haben einen deutlich größeren Anteil am Repertoire. Zudem besitzen die Längenverteilungen nach 6 Monaten eher oligoklonalen Charakter, darunter im Besonderen die CD8-Population.

Zudem wurden die Überschneidungen des kompletten TZR- $\beta$ -Rezeptorrepertoires vor und nach 6 Monaten Behandlung betrachtet. Dabei zeigte sich, dass sich zwar die Zahl identifizierte Klone verringerte, jedoch ein Teil des Repertoires bestehen blieb. Bei der CD4-Population setzte sich das jeweilige Repertoire nach 6 Monaten zu ca. 20% bei Patientin A und zu ca. 30% bei Patientin

B aus bekannten Sequenzen des Repertoires vor Behandlung zusammen. In der CD8-Population bestanden die Repertoires von Patientin A zu ca. 50% und von Patientin B zu über 90% aus Anteilen des Repertoires vor Behandlung. Das Repertoire von Patientin B wurde nach 6 Monaten fast vollständig aus zwei bekannten Klonen dominiert (Abb. 3.15). So zeigte sich hier, dass trotz



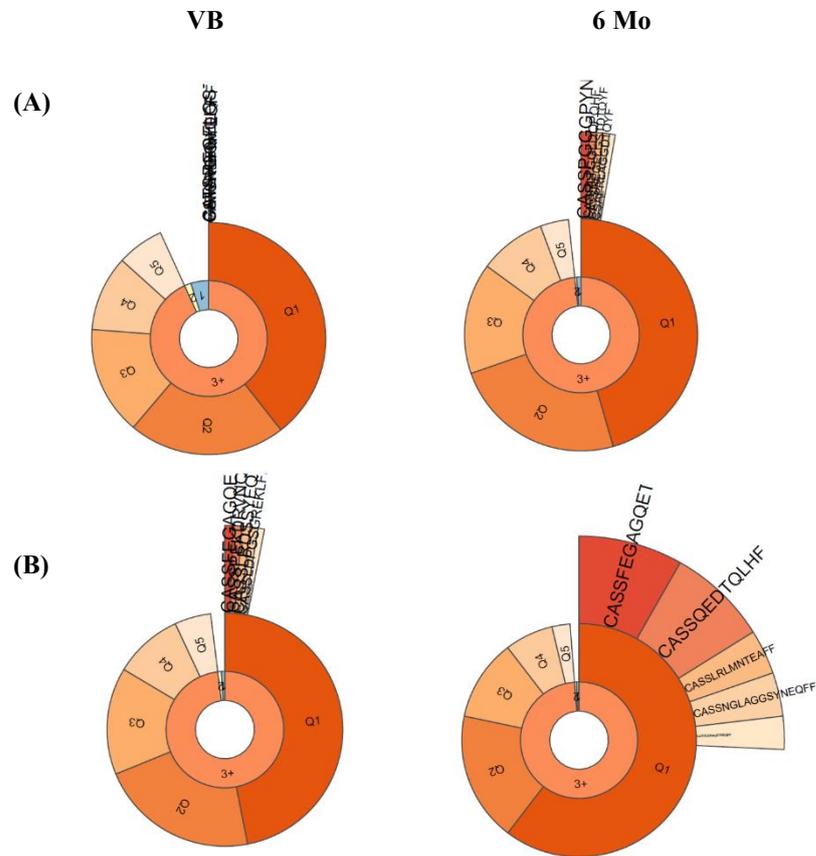
**Abb. 3.15: Analyse überlappender Sequenzen vor Behandlung und nach 6 Monaten.** Die fünf häufigsten CDR3-Sequenzen sind einzeln aufgelistet und visualisiert, während die restlichen überlappenden Sequenzen unter „Nicht dargestellt“ zusammengefasst werden. Die Zahl in Klammern zeigt die Anzahl der unterschiedlichen Klone des Repertoires zum jeweiligen Zeitpunkt, die nach 6 Monaten bei beiden Patientinnen in beiden Populationen geringer ist als vor Behandlung. Dabei bestehen die Repertoires der CD4-Population nach 6 Monaten zu ca. 20% bei Patientin A und zu ca. 30% bei Patientin B aus dem jeweiligen Repertoire vor Behandlung. Bei der CD8-Population besteht das Repertoire nach 6 Monaten von Patientin A zu ca. 50% und bei Patientin B zu über 90% aus Sequenzen, die schon vor Behandlung identifiziert wurden. Bei Patientin B machen in der CD8-Population vor allem die ersten beiden Klone nach 6 Monaten einen Großteil des gesamten Repertoires aus, unbekannte Sequenzen wurden kaum identifiziert.

der veränderten lymphozytären Zusammensetzung zugunsten der CD8-Population (siehe Abschnitt 3.2.1) und trotz der reduzierten Anzahl identifizierter (unterschiedlicher) Klone sowohl in der CD4- als auch in der CD8-Population ein funktionell konstantes, von der Behandlung nicht beeinflusstes Immunrepertoire existierte.

### **3.2.3 Die Diversität des Immunrepertoires nahm unter sechsmonatiger Behandlung mit Fingolimod ab, während der Anteil der Top-Klone sich erhöhte**

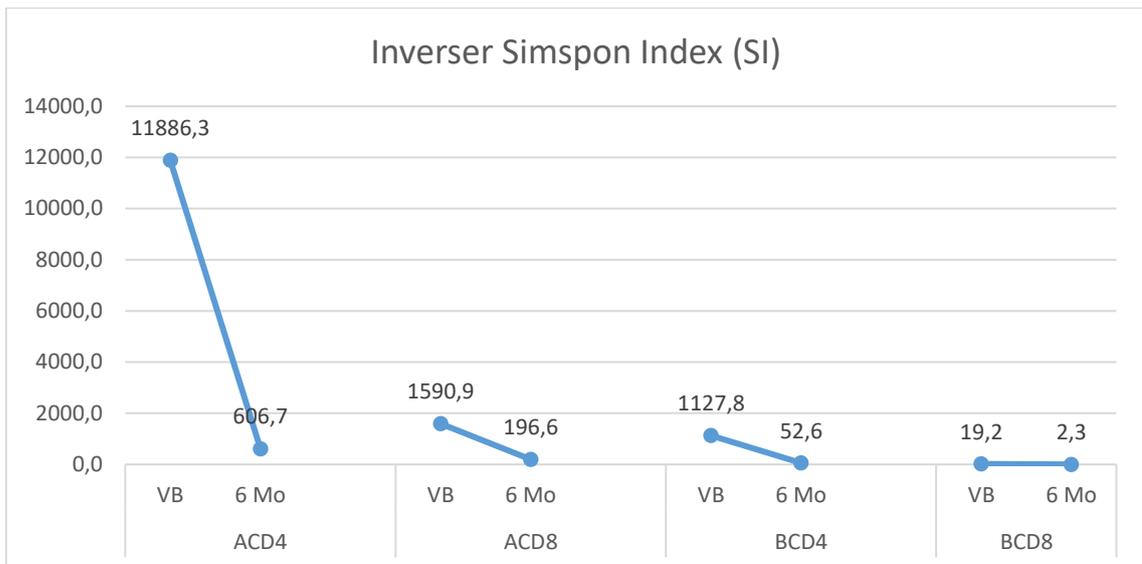
Der Einfluss der Top Klone sollte genauer betrachtet werden. Dabei wurde von jedem Repertoire eine Abbildung erstellt, welche die häufigsten Sequenzen im Verhältnis zum Gesamtrepertoire setzte. Zunächst wurden alle Sequenzen nach ihrer Häufigkeit im Repertoire unterteilt (nur einmal (1), zweimal (2) oder dreimal und mehr (3+) vorkommend). Alle Sequenzen, die mindestens 3fach im Repertoire zu finden waren, wurden wiederum in fünf Quantile unterteilt (Q1-Q5) und deren relativer Anteil visualisiert. Würden beispielhaft in einem Repertoire 100 Klone vorkommen, die mit mehr als drei Sequenzen im Repertoire repräsentiert werden, wären in jedem dieser Quantile 20 Klone zu finden. Würde beispielsweise jeder dieser Klone mit fünf Sequenzen im Repertoire repräsentiert sein, wären alle Quantile, also Q1 bis Q5, gleich groß. Würden jedoch die ersten zwanzig Klone jeweils mit zehn Sequenzen, die restlichen Klone jedoch nur mit fünf Sequenzen im Repertoire repräsentiert werden, würde sich so der Anteil des ersten Quantils am Gesamtrepertoire erhöhen. Zudem visualisiert der äußere Ring den Anteil der ersten fünf Klone am ersten Quantil. Die Abb. 3.16 und 3.17 zeigen diese Darstellungen der verschiedenen Repertoires beider Patientinnen. Bei der CD4-Population beider Patientinnen zeigte sich, dass sowohl der relative Anteil der Top 5 Klone am ersten Quantil als auch der Anteil des ersten Quantils am Repertoire nach einem halben Jahr Behandlung zunahm (Abb. 3.16). In der CD8-Population zeigten sich noch deutlichere Veränderungen. Neben dem relativen Anteil der Klone nahm auch der Anteil des ersten Quantils am Repertoire bei beiden Patientinnen nach einem halben Jahr Behandlung zu. Sehr deutliche Veränderungen zeigte Patientin B. Deren Repertoire bestand nach 6 Monaten zum größten Teil aus den ersten beiden Klonen, dabei dominierte das erste Quantil das Repertoire fast vollständig (Abb.3.17).

Zu erwähnen wäre, dass der dominante Klon der CD8-Population von Patientin B (CASSLRMLNTEAFF) auch in der CD4-Population zu beiden Zeitpunkten zu finden war (Position 9 vor Behandlung, Position 3 nach 6 Monaten).

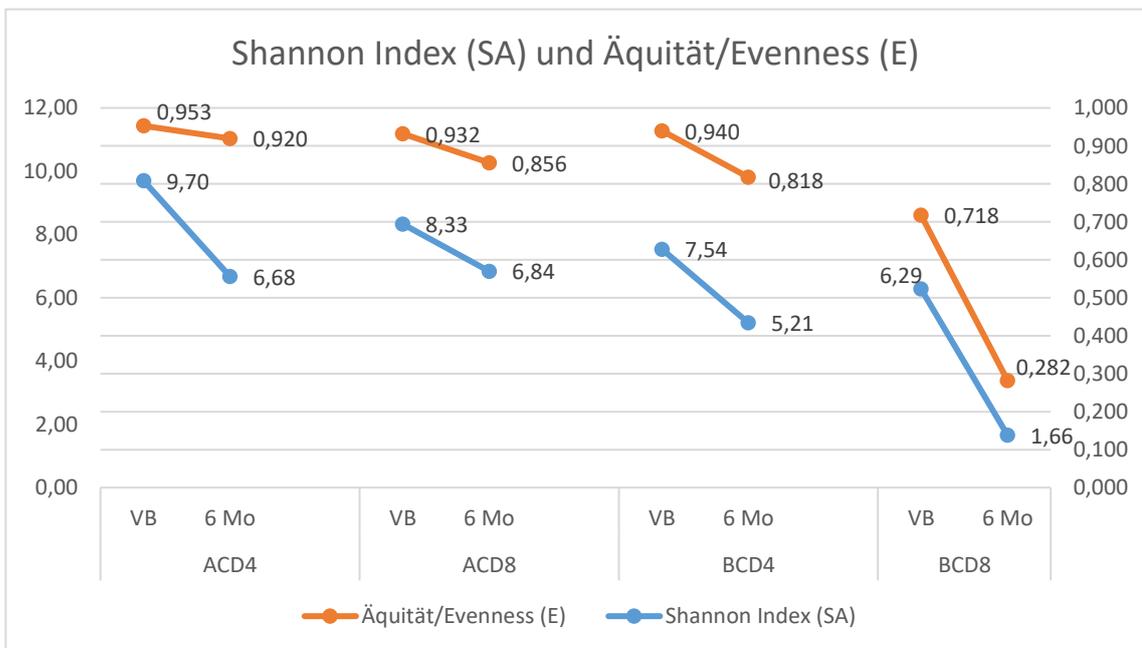


**Abb. 3.16: Anteil der CD4-Klone am Gesamtrepertoire von Patientin A (A) und B (B) vor Behandlung (VB) und nach 6 Monaten (6 Mo) Therapie mit Fingolimod.** Der innere Kreis beschreibt, ob ein Klon lediglich mit einer (1), mit zwei (2) oder mit drei und mehr (3+) Sequenzen im Repertoire vorkommt. Der mittlere Kreis teilt die Anzahl der (3+)-Sequenzen nochmals in 5 Quantile und gibt deren relativen Anteil untereinander an. Der äußere Ring zeigt Ausschnitte der CDR3 Sequenz der fünf häufigsten Klone. In (A) zeigt sich unter Behandlung ein leicht vergrößerter Anteil der Klone am ersten Quantil sowie des ganzen ersten Quantils im Vergleich zum ersten Zeitpunkt. (B) zeigt dabei sowohl eine viel deutlichere Zunahme der häufigsten 5 Klone am ersten Quantil als auch eine Zunahme des ersten Quantils selbst unter Behandlung.





**Abb. 3.18: Inverser Simpson Index aller Repertoires beider Patientinnen vor Behandlung (VB) und nach 6 Monaten Behandlung (6 Mo).**



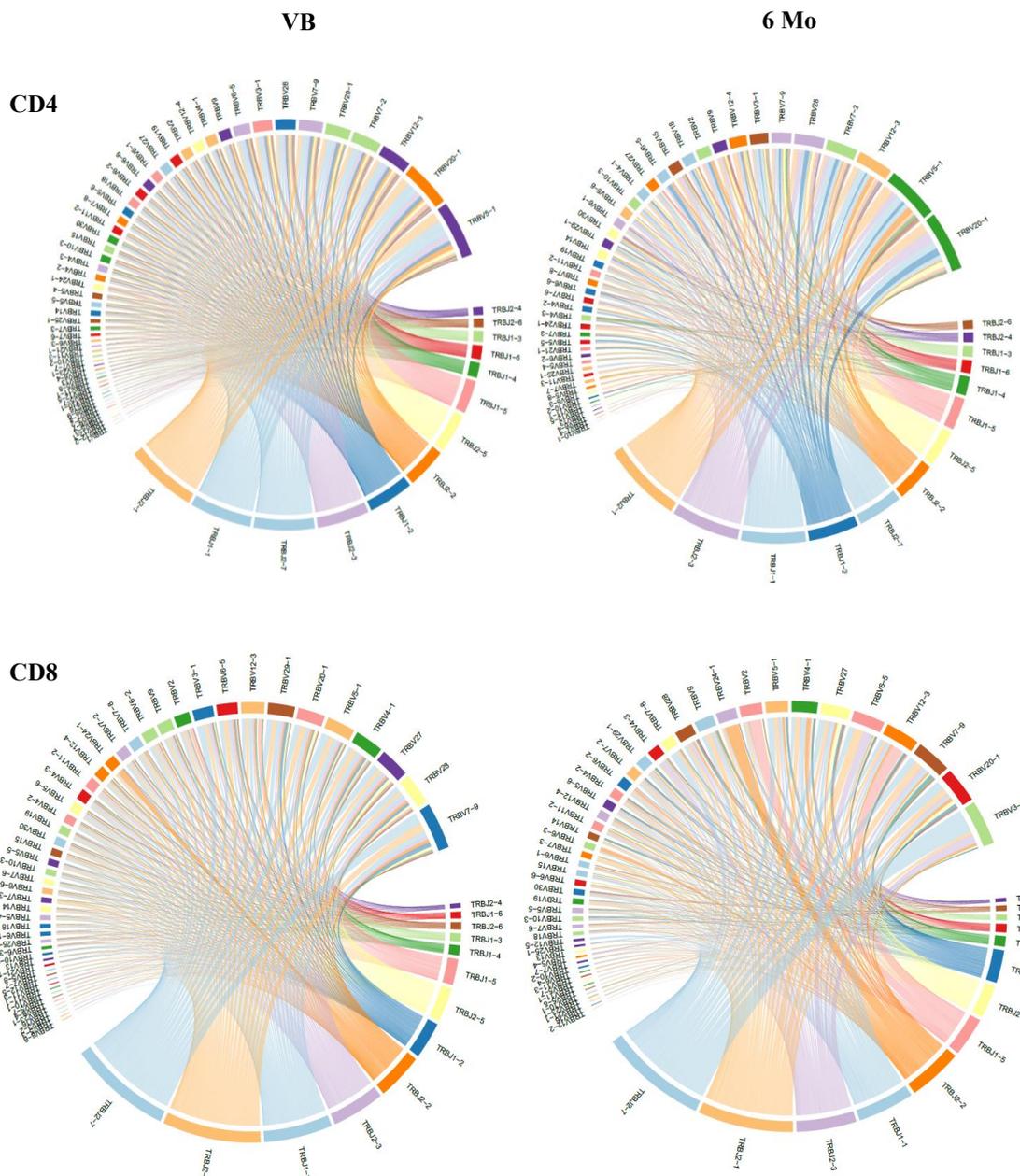
**Diagramm 3.19: Shannon Index und Äquitätsmaß aller Repertoires beider Patientinnen vor (VB) und nach 6 Monaten Behandlung (6 Mo).**

Sowohl die Daten des inversen Simpson (Abb. 3.18) als auch des Shannon Index (Dia. 3.19) zeigten eine Abnahme der Diversität der Repertoires nach 6 Monaten Behandlung. Um weitere Informationen zu erhalten, wurde zusätzlich aus dem Shannon Index die Äquität berechnet, um die Verteilung bzw. Ungleichverteilung im Repertoire zu bestimmen.  $E=1$  würde für eine vollkommene Gleichverteilung aller Klone im Repertoire sprechen. Dabei würde jeder Klon mit derselben Anzahl an Sequenzen vorkommen. Ein Abfall des Wertes spricht für eine ungleichmäßigere Verteilung. In allen Repertoires ist nach 6 Monaten Behandlung ein Abfall dieses Wertes zu verzeichnen (Abb. 3.19).

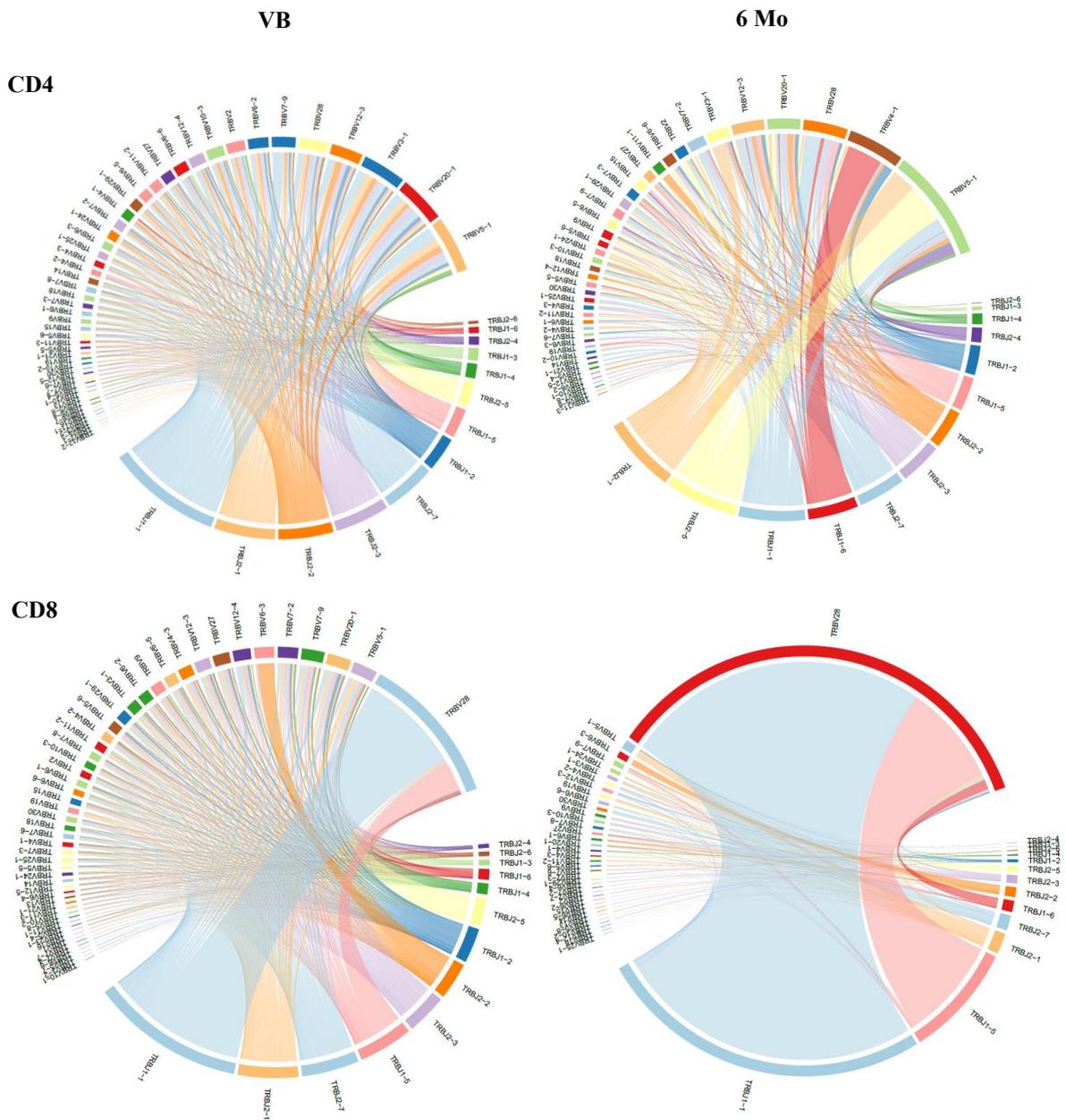
### **3.2.4 Unter Behandlung schränkte sich die Vielfalt unterschiedlicher V-J-Gen-Kombinationen tendenziell ein, vor allem in den Populationen von Patientin B bestimmten die Kombinationen der Top Klone das Repertoire.**

Die Immunrepertoires beider Patientinnen wurden im Hinblick auf ihre V-J-Verteilungen bzw. ihrer Veränderungen unter Behandlung analysiert. Dafür wurden die Matrizen der relativen V-J-Verteilungen visualisiert und nach auffälligen Kombinationen untersucht. Patientin A zeigte in beiden Populationen augenscheinlich gleichmäßig verteilte Kombinationen. Nach 6 Monaten Behandlung schienen in der CD4-Population tendenziell weniger V-J-Kombinationen zu existieren, eine Präferenz zu einer Kombination war nicht zu identifizieren. In der CD8-Population wurde vor Behandlung die Kombination TRBV24-1:TRBJ2-2 etwas häufiger verwendet. Nach 6 Monaten traten diese und die Kombination TRBV3-1:TRBJ2-7 leicht deutlicher zu Tage (Abb. 3.20). Bei Patientin B waren die Einschränkungen der verwendeten V-J Gene deutlicher sichtbar. Die CD4-Population zeigte vor Behandlung eher divers verteilte V-J-Kombinationen. Nach 6 Monaten Behandlung stachen drei Kombinationen deutlich hervor: TRBV4-1:TRBJ1-6, TRBV5-1:TRBJ2-5 und TRBV5-1:TRBJ2-1. Das CD8-Repertoire zeigte schon zu Beginn eine Bevorzugung der Kombination TRBV28:TRBJ1-1 und TRBV28:TRBJ1-5, nach 6 Monaten bestand das Repertoire fast ausschließlich aus diesen Kombinationen (Abb. 3.21).

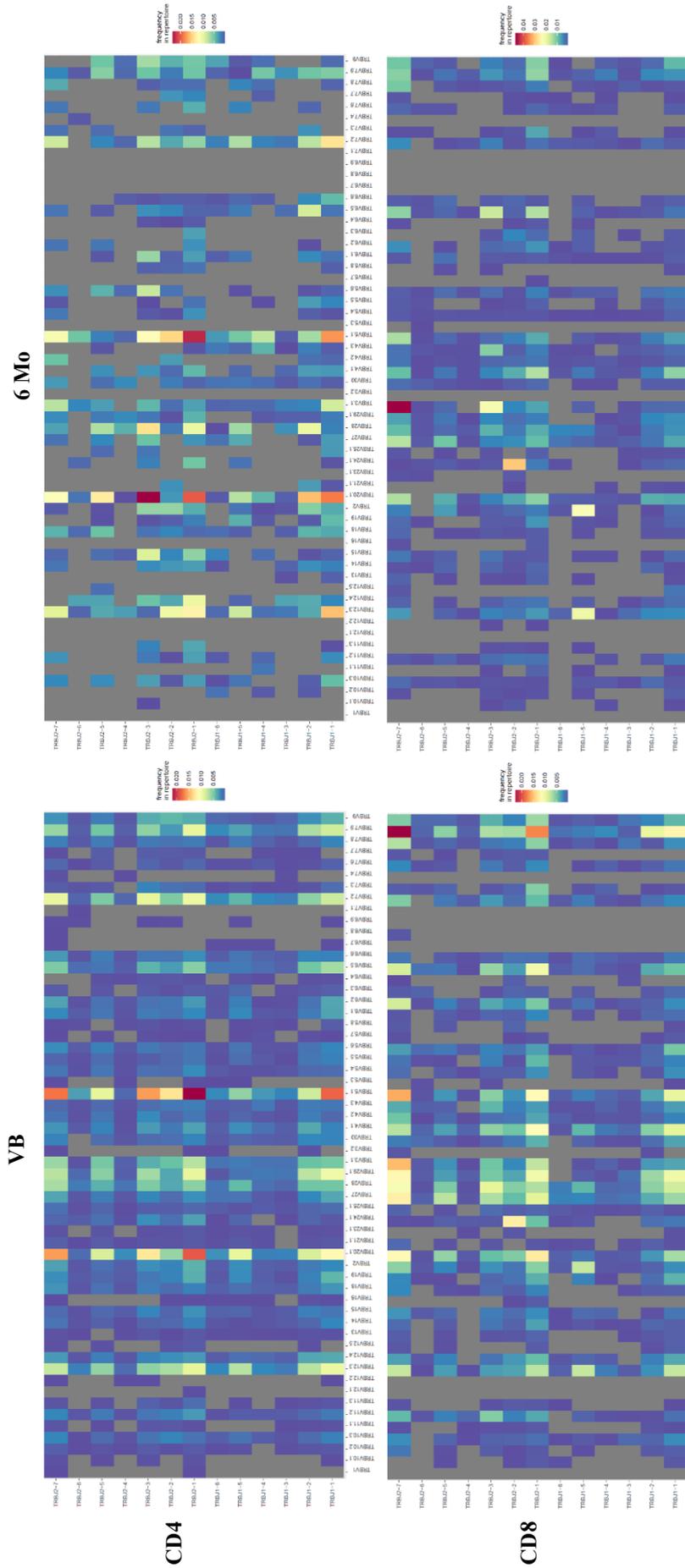
Dieselben Daten wurden nochmals in einer sogenannten *Heatmap* dargestellt (Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Dabei werden häufig auftretende V-J Genkombinationen des Repertoires rot, weniger häufige blau und das Nicht-Auftreten der angegebenen Kombination grau dargestellt. In diesen Darstellungen wurde die Reduktion der genutzten Kombinationen nach 6 Monaten, die in den Abb. 3.20 und Abb. 3.21 durch die geringere Anzahl an Fächern angedeutet wurde, deutlicher visualisiert. Auch wurde offensichtlich, dass die dominanten Kombinationen des Repertoires in den *Heatmaps* eindrücklicher zu erkennen waren (wie die Kombinationen TRBV5-1:TRBJ2-1 und TRBV20-1:TRBJ2-3 der CD4-Population vor bzw. nach 6 Monaten in Abb. 3.22, die in Abb. 3.20 nicht zu erkennen waren), während die Fächerform der Abb. 3.20 bzw. Abb. 3.21 vor allem eine diverse bzw. weniger diverse Verteilung hervorheben konnte.



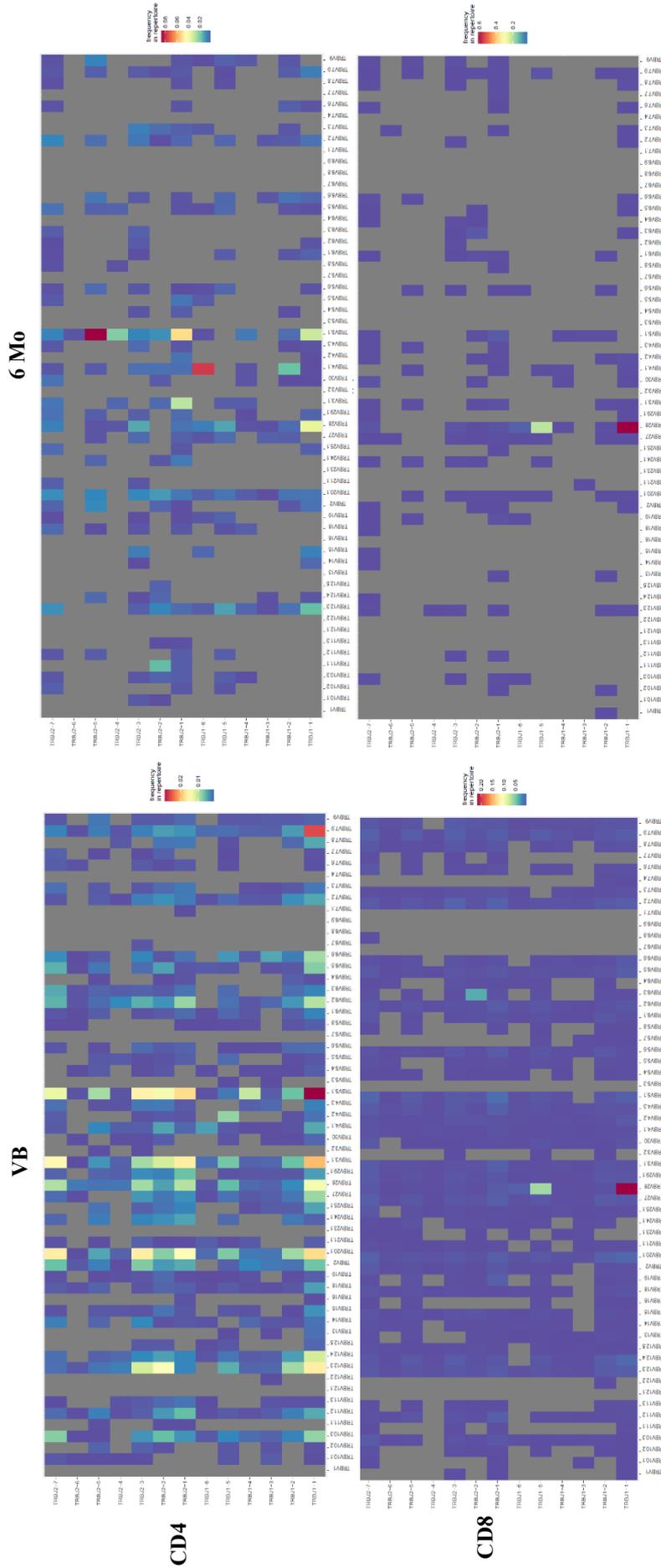
**Abb. 3.20: V-J-Verteilung der CD4- und CD8-Population von Patientin A vor (VB) und nach 6 Monaten Behandlung (6 Mo).** Die CD4-Population wirkt nach 6 Monaten leicht größer gefächert im Vergleich zu Beginn. Trotzdem scheinen viele Kombinationen im Repertoire vorzuherrschen, ohne dass augenscheinlich eine Präferenz zu erkennen wäre. Bei der CD8 Population wirkt vor Behandlung lediglich die Kombination TRBV24-1:TRBJ2-2 etwas hervorgehoben, sonst scheinen die anderen Kombinationen in ähnlicher Verteilung vorzuliegen. Nach 6 Monaten Behandlung wirkt die Verteilung etwas größer gefächert und wieder tritt die Kombination TRBV24-1:TRBJ2-2 sowie nun auch die Kombination TRBV3-1:TRBJ2-7 deutlicher hervor.



**Abb. 3.21: V-J-Verteilung der CD4- und CD8-Population von Patientin B vor (VB) und nach 6 Monaten Behandlung (6 Mo).** Die CD4-Population wirkt nach 6 Monaten Behandlung deutlich größer gefächert als zu Beginn, Kombinationen aus TRBV4-1:TRBJ1-6, TRBV5-1:TRBJ2-5 und TRBV5-1:TRBJ2-1 treten deutlich hervor. Bei der CD8-Population waren schon zu Beginn einige Gene deutlich häufiger genutzt, darunter die Genkombinationen TRBV28:TRBJ1-1 und TRBV28:TRBJ1-5. Nach 6 Monaten Behandlung dominieren diese beiden Kombinationen fast vollkommen das Repertoire.



**Abb. 3.22: Heatmap der relativen Verwendung bestimmter V-J-Genkombinationen in der CD4- und CD8-Population vor (VB) und nach 6 Monaten (6 Mo) Behandlung mit Fingolimod von Patientin A.** In dieser Darstellung ist eine klare Reduktion der Kombinationsvielfalt unter der Behandlung in beiden Populationen zu erkennen. In der CD4-Population sind vor Behandlung mehrere Kombinationen häufig genutzt, am deutlichsten ist die Kombination TRBV5-1:TRBJ2-1 zu erkennen. Nach 6 Monaten Behandlung sind die Kombinationen TRBV5-1:TRBJ2-1 und TRBV20-1:TRBJ2-3 prominenter. In der CD8-Population treten vor Behandlung die Kombinationen TRBV7-9:TRBJ1-6 und TRBV7-9:TRBJ2-7, nach Behandlung die Kombination TRBV3-1:TRBJ2-7 und TRBV24-1:TRBJ2-2 deutlicher hervor (blau bis rot: wenig bis häufig vorkommend, grau: fehlend).



**Abb. 3.23: Heatmap der relativen Verwendung bestimmter V-J-Genkombinationen in der CD4- und CD8-Population vor (VB) und nach 6 Monaten (6 Mo) Behandlung mit Fingolimod von Patientin B.** In dieser Darstellung ist eine klare Reduktion der Kombinationsvielfalt unter der Behandlung in beiden Populationen zu erkennen. In der CD4-Population sind die Kombinationen vor Behandlung divers verteilt, dabei treten aber die Kombinationen TRBV5-1:TRBJ1-1 und TRBV7-9:TRBJ1-1 deutlicher hervor. Nach Behandlung ist das Repertoire auf weniger Kombinationen fokussiert, dabei treten die Kombinationen TRBV4-1:TRBJ1-6, TRBV5-1:TRBJ2-5 und TRBV5-1:TRBJ2-1 deutlich hervor. In der CD8-Population wurden schon zu Beginn einige Gene deutlich häufiger kombiniert, darunter die Genkombinationen TRBV28:TRBJ1-1 und TRBV28:TRBJ1-5. Nach 6 Monaten Behandlung dominieren diese beiden Kombinationen fast vollkommen das Repertoire, während andere Kombinationen deutlich reduziert vorliegen (blau bis rot: wenig bis häufig vorkommend, grau: fehlend).

Die aus der visualisierten V-J-Verteilung entnommenen, häufiger vorkommenden V-J-Kombinationen wurden mit den Top 5 Klonen der jeweiligen Population verglichen (Tabelle 3.6). Dabei sollte gezeigt werden, inwieweit die V-J-Kombinationen der Top-Klone auch das Repertoire bestimmten. In der CD4-Population von Patientin A fanden sich kaum deutlich dominierende V-J-Kombinationen, lediglich die Kombination TRBV20-1:TRBJ2-1 war nach 6 Monaten Behandlung in den Top 5 Klonen zu finden. Bei Patientin B waren die deutlich hervorstechenden V-J-Kombinationen der CD4-Population nach 6 Monaten Behandlung in den Top 5 Klonen wiederzufinden. In den CD8-Populationen beider Patientinnen waren die herausstechenden Kombinationen sowohl vor als auch nach einem halben Jahr Behandlung in den Klonen wiederzufinden.

	CDR3 Aminosäuren-Sequenz	V-Gen	J-Gen		CDR3 Aminosäuren-Sequenz	V-Gen	J-Gen
A_CD4_VB	CATSREGELGSTDQYF	TRBV15	TRBJ2-3	B_CD4_VB	CASSFEGAGQETQYF	TRBV5-1	TRBJ2-5
	CSVAVGQVQFF	TRBV29-1	TRBJ2-1		CASSPEKDRVNQPQHF	TRBV4-2	TRBJ1-5
	CATSRDFNYEQFF	TRBV15	TRBJ2-1		CASSLRDSSYEQYF	TRBV5-1	TRBJ2-7
	CASSLKGPDTQYF	TRBV5-1	TRBJ2-3		CASSLDPGSGREKLFF	TRBV5-1	TRBJ1-4
	CSVAWGDTQYF	TRBV29-1	TRBJ2-3		CASSQDRAGLYNEQFF	TRBV3-1	TRBJ2-1
A_CD4_6Mo	CASSPGGGPYNEQFF	TRBV12-4	TRBJ2-1	B_CD4_6Mo	CASSFEGAGQETQYF	TRBV5-1	TRBJ2-5
	CASRLTGGLDQPQHF	TRBV5-1	TRBJ1-5		CASSQEDTQLHF	TRBV4-1	TRBJ1-6
	CATSREGELGSTDQYF	TRBV15	TRBJ2-3		CASSLRLMNTAEFF	TRBV28	TRBJ1-1
	CSAPRLAGGDTQYF	TRBV20-1	TRBJ2-3		CASSNGLAGGSYNEQFF	TRBV5-1	TRBJ2-1
	CASSLADGTEAFF	TRBV7-2	TRBJ1-1		CASSQDRAGLYNEQFF	TRBV3-1	TRBJ2-1
A_CD8_VB	CATSDWDSNTGELFF	TRBV24-1	TRBJ2-2	B_CD8_VB	CASSLRLMNTAEFF	TRBV28	TRBJ1-1
	CASSQDPVPVYEQYF	TRBV3-1	TRBJ2-7		CASSLRGESNQPQHF	TRBV28	TRBJ1-5
	CASMGTDGDPQHF	TRBV2	TRBJ1-5		CASSPEWTGELFF	TRBV6-3	TRBJ2-2
	CASSPTGDNQPQHF	TRBV12-3	TRBJ1-5		CASSQHTRQATDTEAFF	TRBV12-4	TRBJ1-1
	CASSLLGAQETQYF	TRBV27	TRBJ2-5		CASRWQGGFSPHF	TRBV28	TRBJ1-6
A_CD8_6Mo	CASSQDPVPVYEQYF	TRBV3-1	TRBJ2-7	B_CD8_6Mo	CASSLRLMNTAEFF	TRBV28	TRBJ1-1
	CATSDWDSNTGELFF	TRBV24-1	TRBJ2-2		CASSLRGESNQPQHF	TRBV28	TRBJ1-5
	CASMGTDGDPQHF	TRBV2	TRBJ1-5		CASRWQGGFSPHF	TRBV28	TRBJ1-6
	CASSPTGDNQPQHF	TRBV12-3	TRBJ1-5		CASKKGS	TRBV5-1	TRBJ2-1
	CASSQEAVTDTQYF	TRBV3-1	TRBJ2-3		CASSPEWTGELFF	TRBV6-3	TRBJ2-2

**Tabelle 3.6: Top 5 Klone der CD4- und CD8-Population beider Patientinnen vor und nach 6 Monaten Behandlung mit Fingolimod.** Angegeben sind die Aminosäuresequenz der CDR3 und die dazugehörige V-J-Genkombination. Farblich sind die Kombinationen markiert, die in den V-J-Verteilungen (Abb. 3.20-3.23) sichtbar häufigere Verwendung im Repertoire gefunden haben.

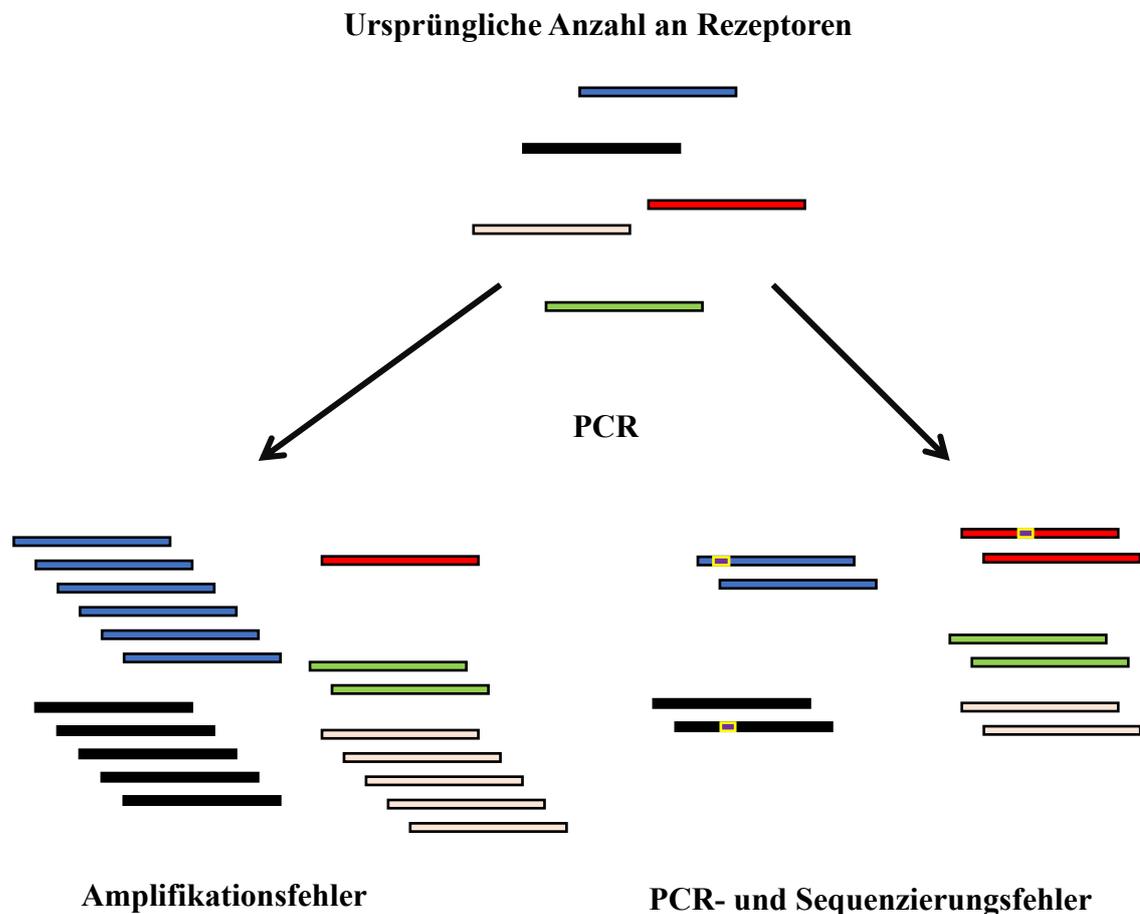
## 4 Diskussion:

### 4.1 Etablierung des experimentellen Ablaufs der Immunrepertoireanalyse von T- und B-Lymphozyten

#### 4.1.1 Wahl eines RNA-basierten Ansatz mit 5'RACE und einer PCR-basierten *Library*-Präparation

Aktuell existieren unterschiedlichste Herangehensweisen für die Generierung eines Rezeptorrepertoires. Zunächst musste für diese Arbeit entschieden werden, ob das Repertoire auf Sequenzen von DNA oder mRNA als Ausgangsmaterial basieren sollte. Erste Experimente wurden mit verschiedenen *Primern*, unter anderem des BIOMED-2 Konsortium (van Dongen et al. 2003) durchgeführt, um auf Basis der genomischen DNA Rezeptorsequenzen zu generieren. Trotz Nutzung des vorgeschlagenen PCR-Protokolls und nach Durchführung verschiedener Gradienten-PCRs blieben unspezifische Nebenprodukte erhalten. Auch wird im Zuge der Rezeptorentwicklung auf beiden Allelen ein Rearrangement durchgeführt (bialelisches Rearrangement), die Expression des Rezeptors erfolgt jedoch nur von einem Allel. So kommt es bei der PCR der Rezeptor-DNA zur Amplifikation zweier Rezeptorsequenzen, sowohl des stummen, nicht exprimierten als auch des exprimierten Rezeptors (Langerak et al. 2012). Zudem ist das Problem der präferenziellen Amplifikation seit langem bekannt (Mutter und Boynton 1995), bei dem ein Gen bevorzugt in der PCR behandelt wird und dieses Produkt nach der Amplifikation im Verhältnis häufiger vorliegt, als es biologisch der Fall gewesen ist (Abb. 4.1). Bei der Amplifikation von Genfamilien wurden dafür verschiedene Mechanismen identifiziert, darunter die „*PCR-Selection*“, die Bevorzugung eines *Templates* in der PCR-Reaktion und den „*PCR-Drift*“, worunter die Autoren zufällige Ereignisse innerhalb der ersten PCR-Zyklen zusammenfassten (Wagner et al. 1994). Im Jahr 2002 wurden in einer Übersichtsarbeit häufige Probleme und der Einfluss der einzelnen Komponenten einer Multiplex-PCR beschrieben (Markoulatos et al. 2002). Weitere Verbesserung für Multiplex-PCRs wurden unternommen. Außerhalb von immunologischen Fragestellungen diente bei Sint et al. (2012) eine standardisierte DNA-Menge als Grundlage, Amplifikationsfehler zu minimieren. In ihrem Fall verwendeten sie eine standardisierte Menge an PCR-Produkten, um u.a. das geeignete Mischungsverhältnis und die *Annealing*-Temperatur/Zeit der einzelnen *Primer* zu bestimmen. Carlson et al. (2013) entwickelten ein künstliches, standardisiertes Immunrepertoire als Referenz und analysierten daran das Verhalten jedes einzelnen *Primers*. So konnten sie unter anderem exakter die

notwendige Konzentration der einzelnen *Primer* und deren *Annealing*-Kinetik bei der Bindung an den  $\gamma$ -Rezeptor von T-Zellen ermitteln.



**Abb. 4.1: Visualisierung der Entstehung von Fehlern durch präferenzielle Amplifikation (ungleich verteilte Mengen an Amplikons) z.B. bei einer Multiplex-PCR und Fehler in der Sequenz durch die PCR oder die Sequenzierung selbst.** Beide Phänomene können die Interpretation des sequenzierten Rezeptorrepertoires beeinflussen.

Ein Rezeptorrepertoire auf Basis von mRNA, also die bereits exprimierte Version der Rezeptorsequenz, führte zu anderen Schwierigkeiten. Während eine Zelle nur eine Kern-DNA besitzt, ist die mRNA-Menge der Zellen unterschiedlich. So kann die Menge an Rezeptor-mRNA in T-Zellen bei Veränderung ihres Aktivitätsgrads variieren (Paillard et al. 1988). Auch zeigen die verschiedenen Entwicklungsstufen der B-Zell-Reihe unterschiedliche mRNA Niveaus. Dabei sollen hier vor allem antikörpersezernierende Zellen erwähnt werden (Jäck und Wabl 1988). Dies kann wiederum zu einer Veränderung des Immunrepertoires führen und so beispielsweise eine Klonalität nur vorgeben. Diese Probleme wurden in einigen Übersichtsarbeiten angesprochen und wie beschrieben erläutert (Benichou et al. 2012; Lossius et al. 2016). Dabei scheint die Quantität der Sequenzen von T-Zellen eher bei genomischer DNA als Ausgangsmaterial mit der wirklichen Zellzahl zu korrelieren als bei RNA (Dziubianau et al. 2013). Bei B-Zellen wurden in einem

aktuellen Protokoll für B-Zell-Rezeptoren diesbezüglich Hinweise erteilt, wie die unterschiedliche mRNA-Menge der einzelnen Subpopulationen berücksichtigt werden soll. Dabei wurde für das cDNA-Äquivalent von ~50.000 naiven, ~20.000 Gedächtnis oder ~200 Plasmazellen eine ähnliche Abdeckung empfohlen (Turchaninova et al. 2016).

In dieser Arbeit wurde RNA als Ausgangsmaterial verwendet, da das Problem der Multiplex-PCR durch das sogenannte 5'RACE-Verfahren umgangen werden konnte. Dabei wird mithilfe einer reversen Transkriptase eine bekannte Oligonukleotid-Sequenz an das 5'-Ende der mRNA angehängt und während der reversen Transkription mit umgeschrieben, auch als „*Template-Switch*“-Effekt bezeichnet (Matz et al. 1999; Zhu et al. 2001). Die cDNA hat dadurch nach der reversen Transkription eine bekannte Sequenz an ihrem 3'-Ende, sodass von dort aus die Amplifikation mit nur einem *Primer* gestartet werden kann. Somit kann auf eine Multiplex-PCR mit mehreren Familien-*Primern*, die für die Abdeckung aller V-Gene nötig wäre, verzichtet werden. Normalerweise beinhaltet dieses Verfahren das Prinzip der *Suppression-PCR* (Siebert et al. 1995) bzw. der *Step-Out-PCR* (Matz et al. 1999). Dabei wird die adaptierte Oligonukleotid-Sequenz mit einer inversen Region versehen und die PCR mithilfe eines langen und kurzen *Primer* gestartet, die unterschiedliche Konzentrationen besitzen. Der niedriger konzentrierte lange *Primer* bindet an die Oligonukleotid-Sequenz und hat einen Überhang. An diesen Überhang bindet der kurze *Primer*, wodurch erst eine effektive PCR gestartet werden kann. Kommt es bei der reversen Transkription fälschlicherweise zur doppelten Bindung des Oligonukleotids am 5'-Ende und nochmals weiter in Richtung des 3'-Endes der RNA, sodass die Oligonukleotid-Sequenz an beiden Enden der synthetisierten cDNA vorkommt, wird die PCR nach dem Einbau der Sequenz des langen *Primers* gestoppt. Wenn dieser lange *Primer* zweimal in einem Amplikon vorkommt (und zwar durch die doppelte Bindung des TS-Oligos), binden die eingebauten Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende durch die inverse Region sich selbst, was als sogenannte „Pfannenstiel“-Form bezeichnet wird. Die Bindung des kurzen *Primers*, notwendig für eine weitere effektive Amplifikation, wird so verhindert und die weitere Amplifikation dieses Produkts unterbunden (vgl. Siebert et al. 1995; Matz et al. 1999).

Die *Primer* für diese Arbeit wurden, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, aus genspezifischen *Primern* bzw. der TS-Oligo-Sequenz und Anteilen der Illumina-Adapter zusammengesetzt. Damit waren die erwähnten Mechanismen der *Suppression*- und *Step-Out-PCR* nicht mehr gewährleistet. Dennoch schien dies vor allem bei größeren Zellzahlen keinen größeren Einfluss auf die Produkte zu haben. Ob dies teilweise jedoch ein Grund für die Entstehung von zusätzlichen Produkten im spezifischen und unspezifischen Bereich war (vgl. Abschnitt 3.1.2), bleibt fraglich.

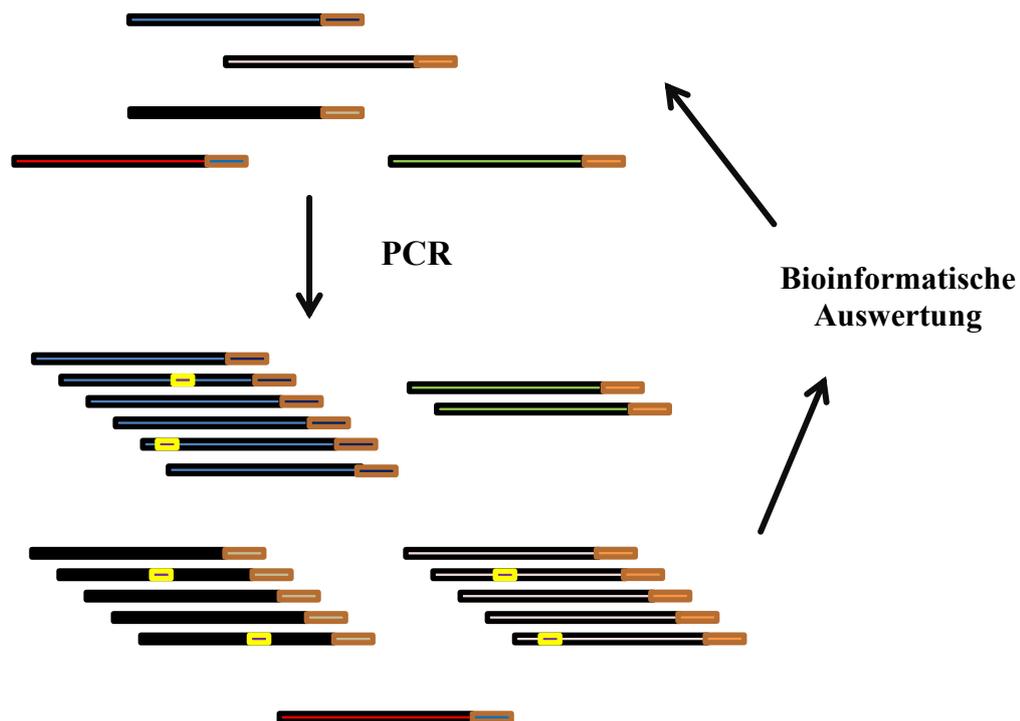
In der Übersichtsarbeit von Benichou et al. (2012) wird auf einen Vorteil des RACE-Ansatzes gegenüber der Multiplex PCR bei der präferentiellen Amplifikation verwiesen. Artefakte innerhalb der Sequenz, die während der reversen Transkription, der PCR oder der Sequenzierung entstehen, sind dadurch aber nicht behoben. Auch ist nicht ersichtlich, wenn beispielsweise eine Sequenz 100mal im Repertoire vorkommt, ob diese Anzahl (abgesehen vom bereits erwähnten Expressionslevel) durch das Vorhandensein von 100 Zellen derselben Rezeptorsequenz oder es durch z.B. 100fache Amplifikation einer mRNA-Sequenz zustande gekommen ist.

Auch können die PCR, die Sequenzanzahl und die Menge an identifizierten Klonen leichte Veränderungen des Repertoires hervorrufen und so eine quantitative Aussage erschweren. Ein Austausch und die Veränderungen der Position der einzelnen Klone waren nach den hier erhobenen Daten unter bestimmten Konditionen möglich (vgl. Abschnitt 3.1.4). Vor allem wenn das Repertoire divers und der Anteil der einzelnen Klone am Repertoire untereinander sehr ähnlich waren, schien eine erneute Sequenzierung mit veränderter Sequenzanzahl die Position der Top-Klone zu verändern (vgl. Abb. 3.8 (B\_CD4\_VB)). Bei dem Beispiel des stärker ungleich verteilten Repertoires (vgl. Abb. 3.9. (B\_CD8\_6Mo)) schien die erhöhte Abdeckung vorher nicht identifizierte Klone zu erkennen, die Reihenfolge deutlich dominanter Klone blieb aber gleich. Dabei war offensichtlich, dass zwei Klone das Repertoire von B\_CD8\_6Mo dominierten. Die Dominanz dieser Klone scheint eindeutig, dabei sollte dennoch zurückhaltend eine klonale Expansion anhand der Quantität der Rezeptorsequenzen abgeleitet werden, da sie durch die erwähnten Gründe fehlerbehaftet sein kann. Da sich aber trotz dieser möglichen Fehler innerhalb der Top-Klone zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, also in zwei biologisch verschiedenen Proben, Übereinstimmungen finden ließen (siehe Abschnitt 3.2.2), weist dies zumindest auf dominante Klone im Repertoire hin. Zudem scheint eine Expansion dieser Klone, vor allem nach 6 Monaten Behandlung, dennoch wahrscheinlich, da der cDNA Synthese RNA aus 680.000 Zellen als Grundlage diente, und dennoch nur wenige unterschiedliche Klone (354) identifiziert wurden (vgl. Tabelle 3.3).

Zudem bestehen weitere Ursachen für Fehler während der PCR bzw. *Library*-Präparation und Sequenzierung (Aird et al. 2011). Auch muss eine durchschnittliche Fehlerrate bei der Sequenzierung berücksichtigt werden (Nguyen et al. 2011). Zusammen könnten diese Fehler bei der Analyse der CDR3 als biologische Mutation fehlinterpretiert werden, besonders in den hypervariablen Bereichen des B-Zell-Rezeptors.

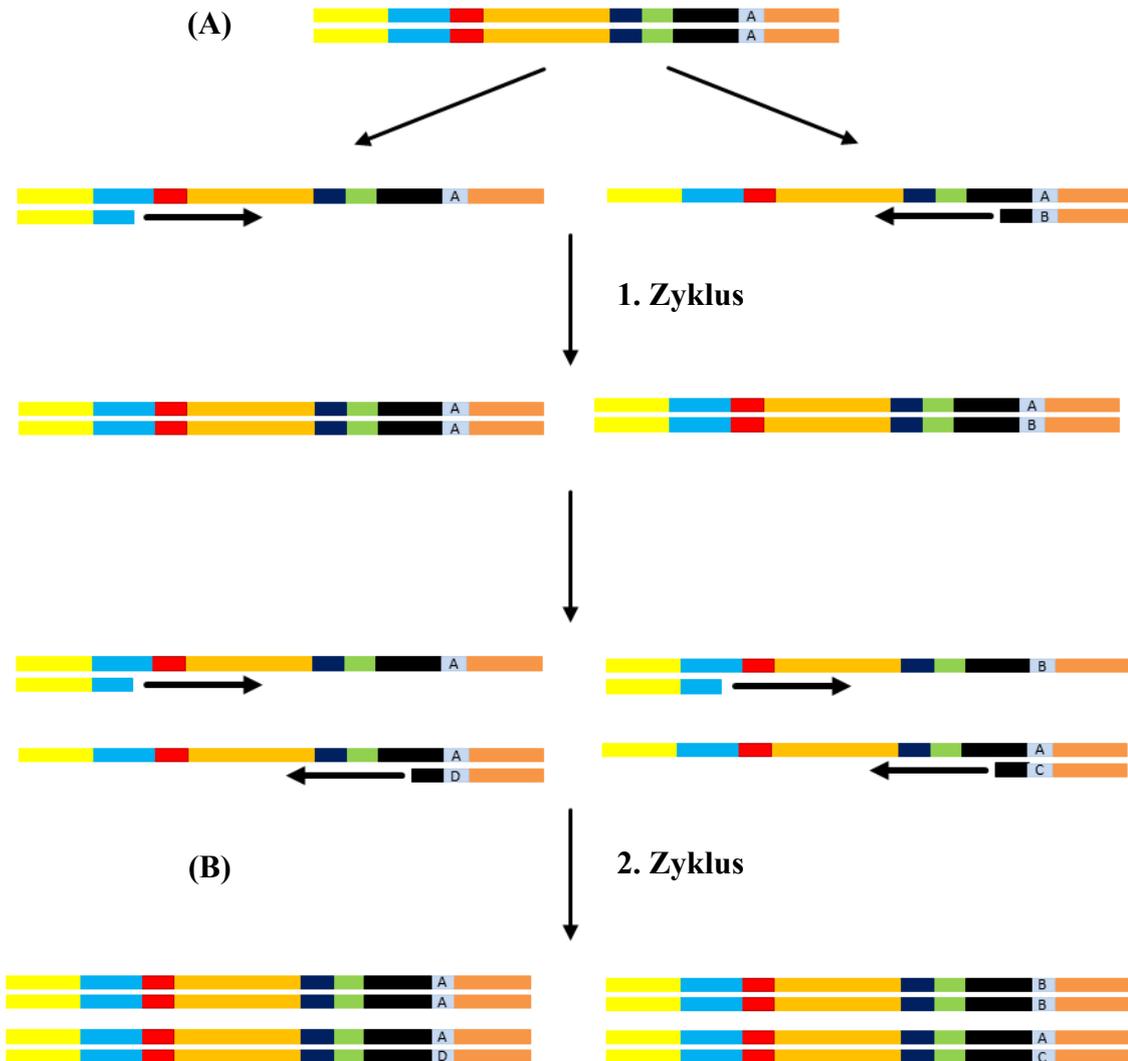
Ein immer besser etablierter Lösungsansatz ist die Markierung aller mRNA-Sequenzen bereits auf molekularer Ebene. Auch vor der Anwendung solcher Methoden beim *Next-Generation Sequencing* gab es Überlegungen und Experimente für die Markierung von DNA, um u.a. Rückschlüsse auf die Redundanz ziehen zu können (Miner et al. 2004; McCloskey et al. 2007).

Fu et al. (2011) versuchten durch ihre Methode des „*stochastic labelling*“ auf die absolute Anzahl an Molekülen zu schließen. Kinde et al. (2011) beschrieben ihre Methode des „Safe-SeqS“, bei der durch exogene und endogene „*unique identifiers/UID*“ die Möglichkeit bestünde, nun geringe genetische Mutationen bzw. PCR-Fehler des Ausgangsmaterials (DNA) zu bestimmen und Rückschlüsse auf die ursprüngliche DNA-Menge zu ziehen. Eine allgemeine Anleitung, wie molekulare Marker an einzelne DNA und mRNA-Moleküle angebracht werden können, zeigten Kivioja et al. (2011) und nannten diese Marker „*unique molecular identifiers/UMI*“. Prinzipiell wird die DNA bzw. mRNA/cDNA markiert, z.B. durch das Anbringen einer kurzen Sequenz mit einer zufälligen Nukleotidkombination. Wird dieses *Template* mit einer solchen UID/UMI-Sequenz in einer PCR amplifiziert, bleiben diese UID/UMI-Nukleotide im Amplikon vorhanden. Dadurch können nachträglich Gruppen von Amplikons mit derselben UID/UMI gebildet und diese untereinander verglichen werden. So können PCR-Artefakte identifiziert und es könnte auf die ursprüngliche Molekülmenge geschlossen werden, da theoretisch alle Sequenzen mit derselben UID/UMI vom selben Molekül abstammen. Die Auswirkung von UID/UMI-Sequenzen auf die PCR bzw. die Auswertung ist schematisch in Abb. 4.2 dargestellt.



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von UID/UMI-Sequenzen.** Wurde der Rezeptorsequenz während des 5'RACE oder den ersten Zyklen der PCR eine UID/UMI-Sequenz angehängen, können die Amplikons mit gleicher UID/UMI nach Beendigung der PCR und der Sequenzierung zu Gruppen zusammengefasst werden. Treten mehrere Amplikons mit derselben UID/UMI-Sequenz auf, können diese auf eine Ursprungssequenz bzw. -molekül zurückgeführt werden. Sind zudem Mutationen in der Rezeptorsequenz innerhalb einer Gruppe mit der gleichen UID/UMI vorhanden, können diese korrigiert werden (stark modifiziert nach Kivioja et al. 2011 und Turchaninova et al. 2016).

Daraufhin folgten verschiedene Anwendungen, so wie z.B. Vollmers et al. (2013) für die Generierung eines BZR-Immunrepertoires für die Sequenzierungstechnologie von Illumina. Teile des Protokolls wurden für diese Arbeit adaptiert, indem u.a. die *Primer*, eigentlich für eine normale cDNA-Synthese ausgelegt, für bereits bestehende 5'RACE-cDNA verändert wurden. Dadurch entstanden 2 PCR-Protokolle nach der eigentlich 5'RACE-cDNA Synthese.



**Abb. 4.3: Theoretische Darstellung der UID/UMI Vermischung während der ersten PCR.** (A) stellt ein mit einer UID-Sequenz A korrekt markiertes Amplikon dar. Wird die PCR weiterhin mit UID-Primern fortgeführt, obwohl bereits eine Sequenz in das Amplikon integriert wurde, kann dies zu Folgendem führen: Da die *Primer* größtenteils um die UID „herum“ binden, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese trotz unterschiedlicher UID wieder an einem Amplikon binden. Ist die UID Sequenz des bindenden *Primers* der Sequenz im integrierten Amplikon sehr ähnlich, ist diese Wahrscheinlichkeit noch höher. In diesem theoretisch-schematischen Schaubild lägen nach zwei PCR-Zyklen (B) zwei Amplikons mit unterschiedlichen UIDs und zwei mit jeweils zwei verschiedenen UIDs im Amplikon selbst vor. Eine korrekte Zuordnung nach bioinformatischer Auswertung wie in Abb. 4.2 beschrieben erscheint so nicht möglich.

Versucht wurde zudem, in den bestehenden cDNA-Produkten durch eine UID-Sequenz im T-Zell-*Primer* diese molekulare Markierung „nachzuholen“. Das Protokoll gestaltete sich in einigen Punkten als schwierig. Ziel war es, nach 2 Zyklen ein PCR-Produkt generiert zu haben, welches beide ersten Teile des Illumina-Adapters und eine UID-Sequenz besitzt. Weitere Zyklen könnten nämlich die UID verändern, z.B. durch die Anlagerung eines *Primers* mit einer anderen UID. Dieser *Primer* könnte trotzdem an die genspezifische Region binden und somit eine eindeutige Identifizierung nicht mehr möglich machen, indem dieselbe Sequenz, eigentlich nur von einer mRNA-Sequenz stammend, nun mehrere UID besitzt. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass dieser Sequenz weitere mRNA-Moleküle als Ursprung dienen und somit das Repertoire verändern (Abb. 4.3). Im Rahmen dieser Arbeit war es bei der *Library*-Präparation der TZR-Sequenzen lediglich möglich, nach 6 Zyklen der ersten PCR genug Produkt zu erhalten, um eine *Library* zu erstellen. Bei den BZR-Sequenzen geschah dies sogar erst nach 12 Zyklen. Wie in Abschnitt 3.1.2 erläutert, waren bei geringerer cDNA-Konzentration sogar Erhöhungen der Zyklen der ersten PCR notwendig. Zwar wurden UID-Sequenzen zunächst mit integriert, ihre Auswertung wurde aufgrund der auftretenden Fehler jedoch vernachlässigt. Eine simple Methode, in bereits vorhandene 5'RACE-cDNA UID-Sequenzen zu integrieren, schien so zumindest nicht sinnvoll möglich.

Die wohl sinnvollste Methode wäre die Adaption der UID direkt während der reversen Transkription. Die aktuelle Literatur bietet hierfür durchaus Lösungsansätze. Für eine T-Zell-Rezeptor*library* konnte komplett auf lange *Primer* verzichtet werden (Britanova et al. 2014; Egorov et al. 2015). Unter Zuhilfenahme der 5'RACE-Methode kombinierten sie die bekannte Sequenz des *Template-Switch*-Oligonukleotids mit einer UMI-Sequenz. Bei der reversen Transkription wurden zudem genspezifische *Primer* für die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette genutzt. Die PCR erfolgte mit reversen, komplementären GSP und einem *Primer*, der das TS-Oligo bindet. Daraufhin erfolgte eine weitere PCR, um beide Ketten getrennt voneinander zu analysieren. Dabei wurden eigene Barcodes der Verfasser eingesetzt, um später die Proben wieder identifizieren zu können. Zudem nutzten die Autoren einen *Primermix* für die zweite PCR. An die Enden der *Primer* wurden zwei bis vier zusätzliche Nukleotide angefügt, was zu einer variablen Rasterverschiebungen während der Sequenzierung führte und so die Diversität auf der *Flow cell* erhöhte. Die Adapter für die Sequenzierung wurden durch Ligation angebracht, sodass diese zusätzlichen Nukleotide auch als Schutz für das *Template* dienten. Hierbei konnte der komplizierte Einbau der Illumina-Adapter in die PCR-*Primer* umgangen und dennoch UMI zur Quantifizierung der ursprünglichen Molekülanzahl genutzt werden.

Für die Präparation einer BZR-*Library* wählten Khan et al. (2016) eine andere Vorgehensweise. Sie versuchten, durch eine Multiplex-PCR (mit RNA als Ausgangsmaterial) schrittweise die molekulare Markierung (*Molecular amplification fingerprint/MAF*) vorzunehmen und nannten

diese für die reverse Transkription *reverse-UID/RID* und bei der Amplifikation *Forward-UID/FID*. Sie verzichteten auf die 5'RACE-Methode. Neben anderen Schwierigkeiten beschrieben sie, dass durch die Anwendung einer 5'RACE-Methode zu lange PCR-Produkte generiert werden, da auch der untranslatierte Bereich am 5'-Ende mit amplifiziert werde. Dies führe bei der Sequenzierung dazu, dass die CDR3-Region von dieser Seite aus nicht voll abgedeckt werde. Für die reverse Transkription bzw. *First-Strand-Synthese* verwendeten sie einen GSP mit RID mit einem Teil des Illumina-Adapters. Darauf folgte eine PCR mit einem Familien-*Primer-Mix* für die V-Region, welche alle einen FID und einen Teil des Illumina-Adapters besaßen. Eine zweite PCR komplettierte die Illumina-Adapter-Sequenz. Hierbei konnten sie molekulare Identifikation genutzt werden, jedoch zu Lasten eines möglichen Fehlers der präferentiellen Amplifikation (s.o.).

Ein aktuelles BZR-Protokoll (mit RNA als Ausgangsmaterial) integriert eine UMI-Sequenz in das TS-Oligo. Genspezifische *Primer* dienen als Grundlage der cDNA Synthese. Über mehrere PCR Schritte werden eigene Barcodes und Rasterverschiebungen in die Amplikons integriert und über eine Adapterligation die *Library* sequenzierungsfähig gemacht (Turchaninova et al. 2016).

Auch wenn die Methode der UMI/UID die Sequenzierungs- und Amplifikationsfehler reduzieren kann, ist es immer noch möglich, dass PCR-Artefakte in der UID-Sequenz selbst wiederum zu einer fehlerhaften Interpretation führen (Brodin et al. 2015).

#### **4.1.2 Auftreten zusätzlicher PCR-Produkte in der Gelelektrophorese am Ende der TZR-*Library*-Präparation**

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, sind während dieser Arbeit bei unterschiedlichen Proben Produkte mit ähnlicher und abweichender Größe zum erwarteten Produkt in Erscheinung getreten. Zunächst waren in diesem Zusammenhang natürliche Längenvariationen im Rahmen unterschiedlicher  $\beta$ -Rezeptorarrangements als eine mögliche Ursache anzunehmen, deren PCR-Produkte erst bei erhöhter Amplifikation sichtbar wurden. Betrachtet man die Dissertation von Holger Babbe (2001) und dessen Etablierung einer 5'RACE Methode, sind auf Einzelzellebene auch in seiner Arbeit Produkte mit unterschiedlicher Längen zu sehen, deren Sequenzierung funktionale  $\beta$ -Rezeptorketten offenbarten. Wurden mehrere Zellen zusammen amplifiziert, waren ebenfalls mehrere Produkte in der Gelelektrophorese zu erkennen. Dabei beschrieb der Autor die reverse Transkription und die Amplifikation von fragmentierter mRNA als eine Ursache der Längenvariation. Zudem waren auch das Auftreten von Keimbahn-Amplifikationen sowie unspezifische Produkte anderen Ursprungs zu beobachten (vgl. S. 50-53).

Die in dieser Arbeit aufgetretenen PCR-Produkte konnten nur zu einem kleinen Prozentsatz einer Rezeptorsequenz zugeordnet werden. Das Produkt im Bereich der 1000bp wurde ignoriert, da die Länge eher auf Keimbahnampifikationen als auf Sequenzen von potentiell funktionstüchtigen Rezeptoren hindeutete. Bei dem anderen untersuchten zusätzlichen Produkt im Bereich von 500bp erkannte die vergleichende Analyse mit dem Produkt der Zielregion einen großen Anteil an Sequenzen, die auch in dem Produkt der Zielregion zu finden waren (siehe Abschnitt 3.1.2). Daher wurden sie von der Analyse ausgeschlossen. Ein kleiner möglicher Verlust von fragmentierten, aber funktionstüchtigen Rezeptorsequenzen im Bereich von 500bp wurde somit in Kauf genommen. Lediglich mehrfache PCR-Produkte in der Zielregion wurden analysiert.

#### **4.1.3 Kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Sequenzierungstiefe und Anzahl identifizierter Klone**

Zudem soll hier nochmals auf die unterschiedliche Menge der identifizierten Klone aufmerksam gemacht werden. Bei dem Versuch, die unterschiedliche Zellzahl der verschiedenen Proben durch eine Anpassung der Konzentration auf der *Flow cell* zu kompensieren, um somit zu niedrige oder zu hohe Abdeckungen zu umgehen, ergab es sich überraschenderweise nicht zwangsläufig, dass eine höhere Abdeckung mehr Klone hervorbringt (vgl. Abschnitt 3.1.4). Dabei schien aber, dass weder die Menge des Ausgangsmaterials (cDNA) noch die Anzahl generierten Sequenzen ausschlaggebend für die Identifikation von Klonen waren. Ein Grund dafür ist den Daten nicht zu entnehmen.

Mögliche Ursachen dafür wären beispielsweise unterschiedlich hohe Verluste während der Aufreinigung nach der ersten bzw. Rezeptor-PCR oder eine unterschiedliche Effektivität in den wenigen Zyklen der Rezeptor-PCR. Wenn UID-Sequenzen in den cDNA-Molekülen integriert wären, wäre eine Erhöhung der Zyklenzahl zu erwägen. Das erhöhte Material an PCR-Produkt könnte dadurch mögliche Verluste während der Aufreinigung kompensieren. Ohne UID-Sequenz könnte dies jedoch wiederum zu einer erhöhten Fehlerrate durch die PCR führen, ohne eine Möglichkeit der Korrektur zu haben.

#### **4.1.4 Auftreten von gleichen Klonen in der CD4- und der CD8-Population**

Bei Patientin B zeigte sich ein Klon zu beiden Zeitpunkten in beiden untersuchten Subpopulationen (vgl. Abschnitt 3.2.3). Ursache könnte z.B. eine fehlerhafte Sortierung während des FACS sein. Da der Klon aber zu beiden Zeitpunkten zu finden ist, scheint eine biologische

Ursache wahrscheinlicher. Dies wird auch in der Literatur bestätigt. So zeigten Untersuchungen von CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen, dass ein kleiner Teil der Klone durchaus gleiche Aminosäuresequenzen der CDR3 der  $\beta$ -Kette besitzen kann (Li et al. 2016).

#### 4.1.5 Verbesserungsoptionen dieses Protokolls einer *Library*-Präparation

Es wird deutlich an der Vielzahl der Probleme, die sich aus der Wahl des Ausgangsmaterials, der PCR-Methode, der Inkorporation oder durch das Weglassen von UID ergeben, dass diese Fragen für die Etablierung eines einfach reproduzierbaren, fehlerarmen Protokolls noch nicht vollständig geklärt sind. Der Versuch, nachträglich in schon bestehende cDNA-Moleküle mit UID/UMI-Sequenzen durch die PCR zu markieren, war nicht erfolgreich. Sinnvoll erscheint deshalb, UID/UMI-Sequenzen direkt in das TS-Oligo zu integrieren, um nachträglich komplizierte PCR-Protokolle zu umgehen. Das Protokoll dieser Arbeit könnte somit durch die Ergänzung der UID-Sequenz in das TS-Oligo bestehen bleiben und damit Bedingung der molekularen Markierung und somit der Quantifizierung erfüllen. Dabei sollten jedoch die Zyklen der ersten PCR aus den in Abschnitt 4.1.3 erwähnten Gründen erhöht werden.

#### 4.1.6 Sequenzierung und Illumina Miseq

Untersuchungen mit verschiedenen Sequenzierungstechnologien von Illumina offenbarten spezielle Probleme. Eine Schwierigkeit der Systeme liegt in der adäquaten Identifizierung der Base und des *Clusters* bei der Sequenzierung, *Base-Calling* bzw. *Cluster-Calling* genannt. Das hat verschiedene Ursachen. Wird eine Base in einem Zyklus nicht eingebaut, sodass die weitere Synthese nicht synchron und diese Sequenz somit „hinter“ den restlichen Sequenzen des *Clusters* fällt, wird dieses Phänomen *Phasing* genannt. Kommt es umgekehrt während eines Zyklus zu einem fehlerhaften Einbau mehrerer Basen, sodass die Sequenz nun „vor“ den restlichen *Cluster*sequenzen liegt, wird dies als *Pre-Phasing* bezeichnet. Auch können gemischte *Cluster* auftreten, die kein klar identifizierbares Signal produzieren (vgl. Übersichtsarbeit von Ledergerber und Dessimoz 2011). Zudem bereiten ähnliche Farbspektren der fluoreszierenden Basen A und C bzw. G und T Schwierigkeiten bei der eindeutigen Identifizierung (Kircher et al. 2009). Schirmer et al. (2015) untersuchten spezifisch den Illumina MiSeq und konnten eine Substitutionsneigung insbesondere der Basen A und C beschreiben, auch zeigten sie Schwächen bei der Fehlerratenbestimmung von Illumina über die PhiX-Genom-Sequenzen (s.u.), die nicht immer adäquat die wirkliche Fehlerrate bei Amplikon-Sequenzierungen widerspiegeln kann.

Großen Einfluss hat auch die Diversität der *Library* auf der *Flow cell*, vor allem in Bezug auf die Identifizierung des *Clusters*, das *Cluster-Calling*. Speziell bei Amplikonsequenzierungen, wie in diesem Projekt, ist die Diversität sehr gering. Da hier PCR-Produkte sequenziert werden, sind die ersten Basen der Sequenzierung immer die ursprünglich eingesetzten *Primer*. In diesem Fall sind das die Sequenzen der genspezifischen TZR- bzw. BZR-*Primer* bzw. die TS-Oligo-Sequenz. Daraus resultiert eine minimale Diversität während der ersten *Zyklen*. Das erschwert immens die Differenzierung der *Cluster* und reduziert die identifizierte Menge der Sequenzen drastisch. Der Hersteller rät zur Zugabe von *PhiX Control*; einer bekannten genomischen *Library*. Sie dient als interne Kontrolle und zur Diversitätserhöhung ([https://support.illumina.com/content/dam/Illumina-support/documents/documentation/system\\_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-01.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/Illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-01.pdf)). Dadurch reduziert sich jedoch wieder die Menge der gewünschten Rezeptorsequenzen, da der Platz auf der *Flow cell* nun von der Kontroll-Genom-*Library* blockiert wird. Teilweise konnte auf einem anderen Illumina-System die geringe Diversität der Datensätze auch durch eine alternative Auswertung kompensiert werden (Krueger et al. 2011). Jedoch existieren auch Möglichkeiten, schon während der *Library*-Präparation die Diversität zu erhöhen. Für die Sequenzierung auf dem Illumina Miseq fügten Egorov et al. (2015), wie bereits in Abschnitt 4.1.1 erwähnt, zwei bis vier zufällige Nukleotide an beiden Enden hinzu, um eine Rasterverschiebung der Amplikonsequenz während der Sequenzierung zu bewirken. Zusätzlich führten die UMI-Sequenzen zu weiterer Diversität. Eine Angabe zur Zugabe oder der Konzentration von *PhiX-Control* wurde nicht gemacht. Khan et al. (2016) versetzen ihre *Flow cell* mit 5% *PhiX-Control*, dabei kam eine gewisse Diversitätserhöhung aber bereits durch die Multiplex-PCR zustande (siehe Abschnitt 4.1.1). Während die verschiedenen Präparationsmethoden ihre Vor- und Nachteile besitzen und je nach Art der *Library*-Präparation spezielle Fehler umgangen werden können, ist bei der Sequenzierung selbst der Handlungsspielraum begrenzt.

#### **4.1.7 Eine einheitliche, standardisierte Möglichkeit der Datenanalyse steht noch nicht zur Verfügung**

Es stehen allmählich Programme zur Verfügung, die sich mit der Analyse von Immunrepertoires beschäftigen. Diejenigen, die sowohl T- als auch B-Zell-Rezeptoren einer Referenzsequenz zuordnen können, sind u.a. LymAnalyzer (Yu et al. 2016) und MiXCR (Bolotin et al. 2015). LymAnalyzer lieferte in ausgewählten Test-*Libraries* mehr zugeordnete Sequenzen als MiXCR, dies jedoch nach eigenen Angaben der Arbeitsgruppe (Yu et al. 2016). Dabei greifen beide auf verschiedene Referenzdatenbanken zu, LymAnalyzer auf *ImMunoGeneTics/IMGT*

(<http://www.imgt.org/>), MiXCR auf *GenBank* (Benson et al. 2013). Teilweise können die Referenzdaten auch vom Benutzer selbst eingefügt werden. Welche Auswirkungen die unterschiedliche Programmierung und die abweichenden Referenzdatenbanken auf die Datenanalyse hat, lässt sich ohne tiefgreifende Analysen kaum sagen. Eine standardisierte Auswertung für NGS-Datensätze im Bereich der Immunrepertoireanalyse oder einheitliche Algorithmen bzw. einheitliche Referenzdatenbanken für die einzelnen Tools müssten in Zukunft entwickelt werden, um mögliche Unterschiede in der Interpretation der Daten, bedingt durch die Benutzung unterschiedlicher Programme, zu vermeiden.

#### **4.2 Multiple Sklerose und Fingolimod: Fingolimod beeinflusst sehr spezifisch einige Subpopulationen der Lymphozyten und hinterlässt eine funktionelle Konstanz im Rezeptorrepertoire**

Fingolimod/FTY720 beeinflusst die verschiedenen Lymphozyten in unterschiedlicher Art und Weise. Unter anderem scheint sich die Gesamtzahl und die Zusammensetzung von T-Zell-Subpopulationen der CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen zu verändern. Bei der Untersuchung einzelner Organe im Mausmodell offenbarte sich ein unterschiedliches Verhalten der verschiedenen T-Zell-Populationen im Zuge der Behandlung mit Fingolimod, wobei besonders die reduzierende Wirkung des Medikaments auf naive T-Zellen betont wurde (Hofmann et al. 2006).

Die Daten beider Patientinnen zeigten Veränderungen der Lymphozytenpopulation. Ein Abfall der Lymphozytenpopulation und eine verminderte CD4/CD8-Ratio im peripheren Blut waren in beiden Patientinnen zu beobachten, insbesondere bei Patientin B (vgl. Abschnitt 3.2.1). Diese Entwicklung wurde bereits in der Literatur beschrieben (Mehling et al. 2008). Um die genauen Subpopulationen zu ermitteln, die von Fingolimod beeinflusst werden und diese Veränderungen der Lymphozytenzusammensetzung hervorrufen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen weitreichende FACS-Analysen unternommen. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde dabei besonderes Augenmerk auf den CC-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) geworfen, welcher häufige Verwendung als Marker für die Definition verschiedener Subpopulationen fand. So konnte in genetisch veränderten Mäusen, in denen kein CCR7 exprimiert wurde, eine Funktion des Rezeptors für die Migration von Lymphozyten und die Organisation in sekundären lymphatischen Organen ausgemacht werden (Forster et al. 1999). Auch konnte die Abhängigkeit des CCR7 mit dem S1P-Rezeptor in einem weiteren CCR7-depletierten Mausmodell für T<sub>REG</sub>-Zellen vermutet werden, da eine Kooperation zwischen CCR7 bzw. dem TZR/CD3 die Internalisierung des S1P-Rezeptors für diese Subpopulation kontrolliert und über weitere Mechanismen die

Migrationsfunktion beeinflusst (Ishimaru et al. 2012). Zudem deutet die (fehlende) Expression von CCR7 eine Veränderung des Reifegrads von T-Zellen an. Dabei exprimieren naive und zentrale Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) CCR7, während Effektorgedächtnis- ( $T_{EM}$ ) und Effektorzellen ( $T_{EFF}$ ) dies nicht tun (vgl. Übersichtarbeit von Golubovskaya und Wu 2016). Mehling et al. bestätigten 2008 in ihrer Publikation die Wirkung von Fingolimod auf periphere, CCR7-exprimierende, im Blut zirkulierende T-Zellen. In FACS-Analysen von MS-Patienten konnte neben der bereits erwähnten Reduktion der Lymphozytenzahl und der veränderten Zusammensetzung von CD4(+)- und CD8(+)-T-Zellen mit einer verminderten CD4/CD8-Ratio eine deutliche Reduktion von naiven T-Zellen CCR7(+) $CD45RA(+)$  und  $T_{CM}$  CCR7(+) $CD45RA(-)$  beschrieben werden, während periphere Effektorzellen wie CD4  $T_{EM}$   $CD4(+)$ CCR7(-) $CD45RA(-)$  und CD8  $T_{EMRA}$   $CD8(+)$ CCR7(-) $CD45RA(+)$  verblieben. (Die Subpopulationen definierten sie mit den angegebenen Oberflächenantigenen). Bezüglich der Wirkung von FTY720 im Rahmen der Behandlung der MS diskutierten die Autoren eine Reduktion des „Nachschubs“ an zukünftigen, potentiell autoreaktiven Effektorzellen (Mehling et al. 2008). Eine Population, die innerhalb der  $T_{CM}$ -Fraktion zu finden sei, sei zudem die  $Th_{17}$ -T-Zell-Population, die somit durch Fingolimod reduziert würden (Mehling et al. 2010). Während in einer anderen kurz angelegten Studie die Patienten teilweise mit einem Anstieg von  $Th_{17}$ -Zellen reagierten (Sato et al. 2014), zeigte eine länger angelegte Studie von Song et al. (2014) nur eine transiente Erhöhung dieser Population, aber ähnliche Veränderungen der naiven, zentralen Gedächtnis- und peripheren Effektorzellen wie bei Mehling et al. Zudem zeigten die Daten dieser Arbeitsgruppe, dass während des beobachteten Zeitraums MS-Patienten mit einem MS-Schub unter einer Fingolimod-Behandlung eine größere CCR7(+) $CD45RO(+)$   $T_{CM}$ -Fraktion besaßen als die MS-Patienten ohne Schub. Die Autoren sahen mit dieser Feststellung einen Hinweis für die besondere Rolle dieser Population und einen möglichen neuen Biomarker.

Claes et al. (2014) untersuchten die Auswirkung auf unterschiedliche CD4(+)-T-Zell-Subpopulationen unter genauerer Beobachtung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{REG}$ ). Sie definierten  $T_{CON}$  (also konventionelle T-Zellen, die keine  $T_{REG}$  sind) mit den Markern  $CD4(+)$  $CD25(-)$  $CD127(+)$  und  $T_{REG}$  mit  $CD4(+)$  $CD25^{high}$  $CD127^{low}$  und unterschieden diese in naive  $CD45RA(+)$  $CD45R0(-)$ , *transitional*  $CD45RA(+)$  $CD45R0(+)$  und *memory*-Zellen  $CD45RA(-)$  $CD45R0(+)$ . Neben der Reduktion der Lymphozytenpopulation konnten sie durch die durchflusszytometrischen Analysen einen Abfall von naiven und einen Anstieg von *memory*-Zellen nachweisen. Zudem postulierten sie eine stabile Population von *transitional*-T-Zellen. Im Übrigen seien auch CD4(+) folliculäre Helferzellen  $T_{FH}$  mit den Marken  $CD4(+)$  $CD25(-)$  $CD127(+)$  $CXCR5(+)$  $PD-1(+)$  nicht von einer Veränderung betroffen und blieben innerhalb der CD4(+)-Population stabil.

Ein Anstieg von T<sub>REG</sub> CD4(+)CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> konnte in einer anderen Studie bestätigt werden. Zudem zeigten die Daten dieser Gruppe, dass es eine konstante CCR6(+)CD161(+)-Fraktion der CD4- und CD8-Population gäbe. Dabei käme es nach einmonatiger Behandlung mit FTY720 jedoch zu einer Veränderung der Zytokinproduktion und dabei zur Reduktion INF- $\gamma$  und/oder IL-17 produzierender Zellen (Serpero et al. 2013).

Hier wird klar, wie schwer die Aussagekraft einzelner Studien und ein exakter Vergleich der unterschiedlichen Publikationen wird. So nutzte z.B. eine Studie für die Identifikation von T<sub>REG</sub> den intrazellulären Marker FOXP3 anstelle von CD127 (Haas et al. 2015). Zudem wurden verschiedene Subpopulationen definiert und nicht immer eine einheitliche Nomenklatur für die einzelnen Populationen verwendet (z.B. *transitional*-Zellen bei Cleas et al., die z.B. nicht bei Mehling et al. definiert wurden). Mit dem Thema befasst sich eine Übersichtsarbeit, veröffentlicht im *European Journal of Immunology* und gibt Vorschläge für eine einheitliche Bezeichnung von Gedächtniszellen (Mahnke et al. 2013). Eine Zuordnung der in dieser Arbeit identifizierten Klone zu einer Subpopulation ist ohne die Differenzierung über Antigene, z.B. mithilfe der durchflusszytometrischen Zellsortierung, so nur spekulativ möglich.

Bei der Betrachtung der CD4(+)- bzw. CD8(+)-T-Zellen zeigte sich in dieser Arbeit eine Einschränkung der Diversität der Rezeptorrepertoires beider Patientinnen nach sechsmonatiger Behandlung mit Fingolimod. Sowohl der inverse Simpson als auch der Shannon Index zeigten eine Reduktion der Diversität der Repertoires aller T-Zell-Populationen. Mithilfe des Äquitätsmaßes wurde eine Zunahme des relativen Anteils weniger Klone bestätigt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Eine Behandlung mit Fingolimod reduzierte somit die Diversität der Repertoires, wodurch der Anteil von häufig vertretenden Klone, die schon vor Behandlung vorhanden waren, nach sechs Monaten sich weiter vergrößerte. Bei verringerter Anzahl von identifizierten Klonen im Repertoire wurde nach sechsmonatiger Behandlung ein Anstieg des Anteils der Top Klone am Gesamtrepertoire verzeichnet. Dieser Anstieg zeigte sich besonders deutlich in der CD8-Population beider Patientinnen, hier vor allem bei Patientin B. Allerdings müssen hierbei die eingeschränkten Möglichkeiten von exakten Aussagen über die Quantität berücksichtigt werden (vgl. Abschnitt 4.1.1).

Ursache dieser Einschränkung der Diversität des Rezeptorrepertoires könnte durch die in diesem Abschnitt beschriebene Reduktion der unterschiedlichen Subpopulationen der CD4(+)- bzw. CD8(+)-T-Zellen bedingt sein. Das Verschwinden und die Persistenz der unterschiedlichen Subpopulationen könnten auch bei der vergleichenden Repertoireanalyse vor und während der Behandlung eine Erklärung für den großen Anteil der bekannten Sequenzen nach Behandlung sein. 20-30% des Repertoires nach 6 Monaten Behandlung bei der CD4-Population und zwischen 50-90% bei der CD8-Population waren Klone zugehörig, die bereits vor Behandlung vorhanden waren. Dabei hatte sich die Anzahl identifizierter Klone nach sechs Monaten deutlich reduziert

(vgl. Abschnitt 3.2.2, Abb. 3.15). Ob eine kompensatorische Expansion bereits existierender Klone stattgefunden hat oder der große Anteil der Klone nur durch die Reduktion anderer Subpopulationen zustande kam, war durch die technische Einschränkung in der Bewertung einer quantitativen Aussage des Repertoires nicht sicher zu sagen (vgl. Abschnitt 4.1). Die geringe Anzahl an identifizierten, unterschiedlichen Klonen aus einem RNA-Pool aus deutlich mehr Zellen legt diese Interpretation jedoch nahe. Ebenfalls war eine Restriktion in der V-J-Genkombination, besonders bei Patientin B und hier wiederum in der CD8-Population, zu beobachten. Dabei dominierten nach Behandlung vor allem die V-J-Kombinationen der beiden Top-Klone das gesamte Repertoire (vgl. Abschnitt 3.2.4, Abb. 3.21, Abb.3.23, Tabelle 3.6).

Es scheinen also nicht nur, wie bereits im Abschnitt erläutert, phänotypisch T-Zell-Subpopulationen die Behandlung zu überdauern, sondern auch die funktionellen Eigenschaften von T-Zellen, hier charakterisiert durch die CDR3-Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors, konstant zu bleiben; und dies bei reduzierter Diversität des Gesamtrepertoires sowohl der CD4(+)- als auch der CD8(+)-T-Zell-Populationen. Bei Kindern konnte durch CDR3-*Spectratyping* im Rahmen von Stammzelltransplantationen gezeigt werden, dass für ein normales diverses Rezeptorrepertoire der Nachschub an naiven T-Zellen eine bedeutende Rolle einnimmt (Eyrich et al. 2002). Neben einer Reduktion neuer Lymphozyten gelang einer Arbeitsgruppe die Darstellung der Diversitätsabnahme des Rezeptorrepertoires unter Fingolimod-Therapie. Trotz FACS-Analyse vermochte diese Studie aber ebenfalls nicht den direkten Zusammenhang zwischen der Abnahme einer bestimmter Subpopulationen und der verringerten Diversität des Rezeptorrepertoires herzustellen (Chiarini et al. 2015). Zusammen mit den vorher im Abschnitt gefassten Überlegungen lässt dies vermuten, dass die geringere Diversität des Repertoires unter der Therapie wahrscheinlich vorwiegend durch die Reduktion peripherer naiver T-Zellen zustande kam. In einer DNA-basierten Studie waren die Rezeptorsequenzen von CD8(+)-Gedächtniszellen deutlich häufiger vertreten als die von naiven CD8(+)-T-Zellen (Robins et al. 2010). Das könnte als ein weiterer Hinweis gewertet werden, dass die dominanten Klone der in dieser Arbeit analysierten CD8-Populationen nach der Behandlung dem Gedächtnis-Kompartiment zugehörig waren.

In welchem Ausmaß nun  $T_{EM}$ ,  $T_{EMRA}$ ,  $T_{REG}$ , *transitional* oder eine andere Subpopulation für die Persistenz des CD4(+)- bzw. des CD8(+)-TZR-Repertoires verantwortlich ist, muss eine genaue und akkurate Differenzierung über Oberflächen- und intrazellulären Antigenen sowie die anschließende Sequenzierung mit einer ausreichenden Anzahl von Patienten zeigen.

Die Überlappung des Repertoires nach sechsmonatiger Behandlung, die deutlicher in der CD8-Population zu sehen war, kann Ausdruck des von vornherein weniger diversen Repertoires dieser Population sein (Li et al. 2016). Dabei scheint die Diversität des Rezeptorrepertoires im Kompartiment der Gedächtniszellen von CD8(+)-T-Zellen 5-10mal geringer zu sein als in ihrem

Äquivalent der CD4(+)-T-Zell-Population (Qi et al. 2014). Somit können die größere Diversität des peripheren Repertoires und die eingeschränkte Probengröße bei der Analyse von peripheren Blutproben Gründe für die deutlichere Überlappung der CD8-Population sein.

Dennoch kann die funktionelle Konstanz in Form von persistierenden Klonen, die hier besonders eindrücklich in der CD8-Population zu finden war, darauf hinweisen, dass ein weniger diverses Repertoire bei der MS von Vorteil sein kann. Man könnte vermuten, da die Behandlung mit Fingolimod einen Effekt auf die Entzündungsaktivität der MS hat (La Mantia et al. 2016), dass die persistierenden Klone eher geringes autoimmunes Potential besitzen. Lässt sich nachweisen, dass die Restriktion des Repertoires durch das Fehlen von naiven Zellen und die funktionelle Persistenz durch Gedächtnis- und Effektor-Zellen bedingt ist, könnte dadurch den naiven T-Zellen eine bedeutende Rolle bei der Forcierung der Entzündungsaktivität in der Multiplen Sklerose zugeschrieben werden, wie auch von Mehling et al. (2008) vermutet wurden. Dennoch werden wahrscheinlich auch autoimmune T-Zellen im konstanten Repertoire verweilen. Welche Spezifität bzw. welche CDR3-Sequenz diese autoimmunen Klone im Repertoire haben, ist nicht ohne weiteres zu ermitteln. Die bereits nachgewiesene Persistenz verschiedener MS-spezifischer Klone über Jahre in verschiedenen Kompartimenten, die vorher durch Hirnbiopsien identifiziert wurden (Skulina et al. 2004), und der Nachweis von MS-spezifischen Klonen (ebenfalls durch Hirnbiopsien identifiziert) in der Fraktion der Gedächtniszellen im peripheren Blut (Salou et al. 2015) weisen darauf hin, dass auch in den konstanten Rezeptorrepertoires, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, autoimmune Zellen verweilen können.

Diesen Überlegungen folgend, könnte möglicherweise zum einen die Einschränkungen des Immunrepertoires im Sinne des fehlenden Nachschubs autoimmuner Zellen, aber auch die Spezifität bzw. die CDR3 der verbliebenen Zellen, falls diese als autoimmun identifiziert werden können, zukünftig als Biomarker dienen, wenn es gelänge, diese potentiellen Biomarker in einen Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf zu setzen.

## 5 Weiterführende Experimente und Ausblick

Die Inkorporation einer UID/UMI-Sequenz in das TS-Oligo und somit schon bei der cDNA-Synthese wäre der einfachste Weg, um eine quantitative Aussage über die zu analysierenden Repertoires zu treffen und sollte primär umgesetzt werden. Vor allem im Rahmen zukünftiger B-Zell-Rezeptoranalysen wäre dies essenziell, um Mutationen im Rahmen der Affinitätsreifung und PCR-Artefakte unterscheiden zu können.

Zudem ist die genaue Differenzierung der einzelnen Subpopulationen der T-Zellen notwendig, um die funktionelle Konstanz der Klone des Repertoires während der Behandlung von MS-Patienten mit Fingolimod zuordnen zu können. Als erstes sollte die Unterscheidung durch die Expression des Rezeptors CCR7 getroffen werden, bei dem der Abfall dieser Subpopulation in verschiedenen Veröffentlichungen deutlich beschrieben worden ist (vgl. Abschnitt 4.2). Finden sich dieselben Klone vorwiegend in einer Population und können die Veränderungen bzw. Konstanz des Repertoires mit der klinischen Ausprägung in Zusammenhang gebracht werden, können wertvolle Hinweise auf die Akteure der Multiplen Sklerose oder Hinweise auf neue Biomarker gewonnen werden. Zudem sollten Kontrollen von gesunden Spendern ergänzt werden. Ebenfalls wäre eine Analyse spezieller B-Zell-Subpopulationen und die Veränderung deren Repertoires von Interesse, da Fingolimod eine Wirkung auch auf B-Zellen (Miyazaki et al. 2014; Nakamura et al. 2014) zu haben scheint.

## 6 Bekanntmachung und potenzielle Interessenskonflikte

Die Firma Novartis hat die Arbeit teilweise mit Geldmitteln für Labormaterialien etc. unterstützt. Einflussnahmen auf den experimentellen Aufbau, den Ablauf oder auf die Interpretation der Daten fanden zu keinem Zeitpunkt statt.

Von der Firma Novartis wurde im Rahmen eines *Advisory Board* eines anderen Themengebiets ein Honorar ausgezahlt, zudem erfolgte eine Kongresseinladung von der Firma Teva. Beide Zuwendungen erfolgten nach offizieller Einreichung der Dissertation. Es kam zu keiner inhaltlichen oder sonstigen Einflussnahme auf die Arbeit. Es besteht eine Mitgliedschaft in der Deutschen Migräne- und Kopfschmerzgesellschaft (DMKG), für die gleichfalls gilt, dass sie in keinem finanziellen oder inhaltlichen Zusammenhang mit dieser Dissertation steht. Es bestehen somit keinerlei Interessenskonflikte.

## 7 Literaturverzeichnis

Adachi, Kunitomo; Chiba, Kenji (2007): FTY720 story. Its discovery and the following accelerated development of sphingosine 1-phosphate receptor agonists as immunomodulators based on reverse pharmacology. In: *Perspectives in medicinal chemistry* 1, S. 11–23.

Adachi, Kunitomo; Kohara, Toshiyuki; Nakao, Noriyoshi; Arita, Masafumi; Chiba, Kenji; Mishina, Tadashi et al. (1995): Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2-substituted-2-amino-1,3-propanediols. Discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5 (8), S. 853–856. DOI: 10.1016/0960-894X(95)00127-F.

Agius, Mark; Meng, Xiangyi; Chin, Peter; Grinspan, Augusto; Hashmonay, Ronny (2014): Fingolimod therapy in early multiple sclerosis: an efficacy analysis of the TRANSFORMS and FREEDOMS studies by time since first symptom. In: *CNS neuroscience & therapeutics* 20 (5), S. 446–451. DOI: 10.1111/cns.12235.

Aird, Daniel; Ross, Michael G.; Chen, Wei-Sheng; Danielsson, Maxwell; Fennell, Timothy; Russ, Carsten et al. (2011): Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. In: *Genome biology* 12 (2), R18. DOI: 10.1186/gb-2011-12-2-r18.

Arnaout, Ramy; Lee, William; Cahill, Patrick; Honan, Tracey; Sparrow, Todd; Weiland, Michael et al. (2011): High-resolution description of antibody heavy-chain repertoires in humans. In: *PLoS one* 6 (8), e22365. DOI: 10.1371/journal.pone.0022365.

Arstila, T. P.; Casrouge, A.; Baron, V.; Even, J.; Kanellopoulos, J.; Kourilsky, P. (1999): A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. In: *Science* 286 (5441), S. 958–961.

Babbe, H.; Roers, A.; Waisman, A.; Lassmann, H.; Goebels, N.; Hohlfeld, R. et al. (2000): Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (3), S. 393–404.

Babbe, Holger (2001): Infiltrierende T-Lymphozyten bei Multipler Sklerose: Analyse von Rezeptorrepertoire und Antigenpezifitäten auf dem Niveau einzelner Zellen. Dissertation. Universität zu Köln. Institut für Genetik.

Bahbouhi, Bouchaïb; Berthelot, Laureline; Pettré, Ségolène; Michel, Laure; Wiertlewski, Sandrine; Weksler, Babette et al. (2009): Peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line. In: *Journal of leukocyte biology* 86 (5), S. 1049–1063. DOI: 10.1189/jlb.1008666.

Batty, Elizabeth M.; Wong, T. H. Nicholas; Trebes, Amy; Argoud, Karène; Attar, Moustafa; Buck, David et al. (2013): A modified RNA-Seq approach for whole genome sequencing of RNA viruses from faecal and blood samples. In: *PLoS one* 8 (6), e66129. DOI: 10.1371/journal.pone.0066129.

Benichou, Jennifer; Ben-Hamo, Rotem; Louzoun, Yoram; Efroni, Sol (2012): Rep-Seq: uncovering the immunological repertoire through next-generation sequencing. In: *Immunology* 135 (3), S. 183–191. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03527.x.

Benson, Dennis A.; Cavanaugh, Mark; Clark, Karen; Karsch-Mizrachi, Ilene; Lipman, David J.; Ostell, James; Sayers, Eric W. (2013): GenBank. In: *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D36–42. DOI: 10.1093/nar/gks1195.

- Bentley, David R.; Balasubramanian, Shankar; Swerdlow, Harold P.; Smith, Geoffrey P.; Milton, John; Brown, Clive G. et al. (2008): Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. In: *Nature* 456 (7218), S. 53–59. DOI: 10.1038/nature07517.
- Beutler, Bruce (2004): Innate immunity. An overview. In: *Molecular immunology* 40 (12), S. 845–859.
- Bolotin, Dmitriy A.; Poslavsky, Stanislav; Mitrophanov, Igor; Shugay, Mikhail; Mamedov, Ilgar Z.; Putintseva, Ekaterina V.; Chudakov, Dmitriy M. (2015): MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. In: *Nature methods* 12 (5), S. 380–381. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
- Briney, Bryan S.; Willis, Jordan R.; Hicar, Mark D.; Thomas, James W.; Crowe, James E. (2012): Frequency and genetic characterization of V(DD)J recombinants in the human peripheral blood antibody repertoire. In: *Immunology* 137 (1), S. 56–64. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2012.03605.x.
- Brinkmann, V.; Chen, S.; Feng, L.; Pinschewer, D.; Nikolova, Z.; Hof, R. (2001): FTY720 alters lymphocyte homing and protects allografts without inducing general immunosuppression. In: *Transplantation proceedings* 33 (1-2), S. 530–531.
- Brinkmann, Volker (2009): FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis. Therapeutic effects in the immune and the central nervous system. In: *British journal of pharmacology* 158 (5), S. 1173–1182. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00451.x.
- Brinkmann, Volker; Billich, Andreas; Baumruker, Thomas; Heining, Peter; Schmouder, Robert; Francis, Gordon et al. (2010): Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. In: *Nature reviews. Drug discovery* 9 (11), S. 883–897. DOI: 10.1038/nrd3248.
- Brinkmann, Volker; Cyster, Jason G.; Hla, Timothy (2004): FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (7), S. 1019–1025. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00476.x.
- Brinkmann, Volker; Davis, Michael D.; Heise, Christopher E.; Albert, Rainer; Cottens, Sylvain; Hof, Robert et al. (2002): The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (24), S. 21453–21457. DOI: 10.1074/jbc.C200176200.
- Britanova, Olga V.; Putintseva, Ekaterina V.; Shugay, Mikhail; Merzlyak, Ekaterina M.; Turchaninova, Maria A.; Staroverov, Dmitriy B. et al. (2014): Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. In: *The Journal of Immunology* 192 (6), S. 2689–2698. DOI: 10.4049/jimmunol.1302064.
- Brodin, Johanna; Hedskog, Charlotte; Heddini, Alexander; Benard, Emmanuel; Neher, Richard A.; Mild, Mattias; Albert, Jan (2015): Challenges with using primer IDs to improve accuracy of next generation sequencing. In: *PloS one* 10 (3), e0119123. DOI: 10.1371/journal.pone.0119123.
- Büdingen, H-Christian von; Kuo, Tracy C.; Sirota, Marina; van Belle, Christopher J.; Apeltsin, Leonard; Glanville, Jacob et al. (2012): B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (12), S. 4533–4543. DOI: 10.1172/JCI63842.
- Carlson, Christopher S.; Emerson, Ryan O.; Sherwood, Anna M.; Desmarais, Cindy; Chung, Moon-Wook; Parsons, Joseph M. et al. (2013): Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. In: *Nature communications* 4, S. 2680. DOI: 10.1038/ncomms3680.

- Chiarini, M.; Sottini, A.; Bertoli, D.; Serana, F.; Caimi, L.; Rasia, S. et al. (2015): Newly produced T and B lymphocytes and T-cell receptor repertoire diversity are reduced in peripheral blood of fingolimod-treated multiple sclerosis patients. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 21 (6), S. 726–734. DOI: 10.1177/1352458514551456.
- Chou, Y. K.; Bourdette, D. N.; Offner, H.; Whitham, R.; Wang, R. Y.; Hashim, G. A.; Vandenberg, A. A. (1992): Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 38 (1-2), S. 105–113.
- Chun, Jerold; Brinkmann, Volker (2011): A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis. The development of fingolimod (FTY720, Gilenya). In: *Discovery medicine* 12 (64), S. 213–228.
- Chun, Jerold; Hartung, Hans-Peter (2010): Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. In: *Clinical neuropharmacology* 33 (2), S. 91–101. DOI: 10.1097/WNF.0b013e3181cbf825.
- Claes, Nele; Dhaeze, Tessa; Fraussen, Judith; Broux, Bieke; van Wijmeersch, Bart; Stinissen, Piet et al. (2014): Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: a 12-month follow-up study. In: *PloS one* 9 (10), e111115. DOI: 10.1371/journal.pone.0111115.
- Cohen, Jeffrey A.; Barkhof, Frederik; Comi, Giancarlo; Hartung, Hans-Peter; Khatri, Bhupendra O.; Montalban, Xavier et al. (2010): Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. In: *The New England journal of medicine* 362 (5), S. 402–415. DOI: 10.1056/NEJMoa0907839.
- Cohen, Jeffrey A.; Khatri, Bhupendra; Barkhof, Frederik; Comi, Giancarlo; Hartung, Hans-Peter; Montalban, Xavier et al. (2016): Long-term (up to 4.5 years) treatment with fingolimod in multiple sclerosis: results from the extension of the randomised TRANSFORMS study. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 87 (5), S. 468–475. DOI: 10.1136/jnnp-2015-310597.
- Compston, Alastair; Coles, Alasdair (2008): Multiple sclerosis. In: *The Lancet* 372 (9648), S. 1502–1517. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Costa, José Luis; Sousa, Sónia; Justino, Ana; Kay, Teresa; Fernandes, Susana; Cirnes, Luis et al. (2013): Nonoptical massive parallel DNA sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in a diagnostic setting. In: *Human mutation* 34 (4), S. 629–635. DOI: 10.1002/humu.22272.
- Craig, David W.; Pearson, John V.; Szelinger, Szabolcs; Sekar, Aswin; Redman, Margot; Corneveaux, Jason J. et al. (2008): Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing. In: *Nature methods* 5 (10), S. 887–893. DOI: 10.1038/nmeth.1251.
- Davis, M. M.; Bjorkman, P. J. (1988): T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. In: *Nature* 334 (6181), S. 395–402. DOI: 10.1038/334395a0.
- Dziubianau, M.; Hecht, J.; Kuchenbecker, L.; Sattler, A.; Stervbo, U.; Rodelsperger, C. et al. (2013): TCR repertoire analysis by next generation sequencing allows complex differential diagnosis of T cell-related pathology. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (11), S. 2842–2854. DOI: 10.1111/ajt.12431.
- Egorov, Evgeny S.; Merzlyak, Ekaterina M.; Shelenkov, Andrew A.; Britanova, Olga V.; Sharonov, George V.; Staroverov, Dmitriy B. et al. (2015): Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers. In: *The Journal of Immunology* 194 (12), S. 6155–6163. DOI: 10.4049/jimmunol.1500215.

- Estorninho, Megan; Gibson, Vivienne B.; Kronenberg-Versteeg, Deborah; Liu, Yuk-Fun; Ni, Chester; Cerosaletti, Karen; Peakman, Mark (2013): A novel approach to tracking antigen-experienced CD4 T cells into functional compartments via tandem deep and shallow TCR clonotyping. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (11), S. 5430–5440. DOI: 10.4049/jimmunol.1300622.
- Eyrich, Matthias; Croner, Tanja; Leiler, Christine; Lang, Peter; Bader, Peter; Klingebiel, Thomas et al. (2002): Distinct contributions of CD4(+) and CD8(+) naive and memory T-cell subsets to overall T-cell-receptor repertoire complexity following transplantation of T-cell-depleted CD34-selected hematopoietic progenitor cells from unrelated donors. In: *Blood* 100 (5), S. 1915–1918. DOI: 10.1182/blood-2001-11-0005.
- Faham, Malek; Zheng, Jianbiao; Moorhead, Martin; Carlton, Victoria E. H.; Stow, Patricia; Coustan-Smith, Elaine et al. (2012): Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 120 (26), S. 5173–5180. DOI: 10.1182/blood-2012-07-444042.
- Forster, R.; Schubel, A.; Breitfeld, D.; Kremmer, E.; Renner-Muller, I.; Wolf, E.; Lipp, M. (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. In: *Cell* 99 (1), S. 23–33.
- Fu, Glenn K.; Hu, Jing; Wang, Pei-Hua; Fodor, Stephen P. A. (2011): Counting individual DNA molecules by the stochastic attachment of diverse labels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (22), S. 9026–9031. DOI: 10.1073/pnas.1017621108.
- Fujita, T.; Inoue, K.; Yamamoto, S.; Ikumoto, T.; Sasaki, S.; Toyama, R. et al. (1994): Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. In: *The Journal of antibiotics* 47 (2), S. 208–215.
- Gay, D.; Esiri, M. (1991): Blood-brain barrier damage in acute Multiple Sclerosis plaques. In: *Brain* 114 (1), S. 557–572. DOI: 10.1093/brain/114.1.557.
- Golubovskaya, Vita; Wu, Lijun (2016): Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. In: *Cancers* 8 (3). DOI: 10.3390/cancers8030036.
- Griesemer, Adam D.; Sorenson, Eric C.; Hardy, Mark A. (2010): The role of the thymus in tolerance. In: *Transplantation* 90 (5), S. 465–474. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181e7e54f.
- Haas, Jurgen; Schwarz, Alexander; Korporal-Kunke, Mirjam; Jarius, Sven; Wiendl, Heinz; Kieseier, Bernd C.; Wildemann, Brigitte (2015): Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 21 (12), S. 1521–1532. DOI: 10.1177/1352458514564589.
- Harp, Christopher T.; Ireland, Sara; Davis, Laurie S.; Remington, Gina; Cassidy, Bonnie; Cravens, Petra D. et al. (2010): Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. In: *European journal of immunology* 40 (10), S. 2942–2956. DOI: 10.1002/eji.201040516.
- Hauser, Stephen L.; Waubant, Emmanuelle; Arnold, Douglas L.; Vollmer, Timothy; Antel, Jack; Fox, Robert J. et al. (2008): B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. In: *The New England journal of medicine* 358 (7), S. 676–688. DOI: 10.1056/NEJMoa0706383.

- Hofmann, Matthias; Brinkmann, Volker; Zerwes, Hans-Gunter (2006): FTY720 preferentially depletes naive T cells from peripheral and lymphoid organs. In: *International immunopharmacology* 6 (13-14), S. 1902–1910. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.07.030.
- Hou, Dongni; Chen, Cuicui; Seely, Eric John; Chen, Shujing; Song, Yuanlin (2016a): High-Throughput Sequencing-Based Immune Repertoire Study during Infectious Disease. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 336. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00336.
- Hou, Xianliang; Wang, Mingbang; Lu, Chong; Xie, Qian; Cui, Guangying; Chen, Jianing et al. (2016b): Analysis of the Repertoire Features of TCR Beta Chain CDR3 in Human by High-Throughput Sequencing. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 39 (2), S. 651–667. DOI: 10.1159/000445656.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. In: *Nature* 431 (7011), S. 931–945. DOI: 10.1038/nature03001.
- Ishimaru, Naozumi; Yamada, Akiko; Nitta, Takeshi; Arakaki, Rieko; Lipp, Martin; Takahama, Yousuke; Hayashi, Yoshio (2012): CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. In: *The American journal of pathology* 180 (1), S. 199–208. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.09.027.
- Jack, H. M.; Wabl, M. (1988): Immunoglobulin mRNA stability varies during B lymphocyte differentiation. In: *The EMBO journal* 7 (4), S. 1041–1046.
- Kappos, Ludwig; O'Connor, Paul; Radue, Ernst-Wilhelm; Polman, Chris; Hohlfeld, Reinhard; Selmaj, Krzysztof et al. (2015): Long-term effects of fingolimod in multiple sclerosis: the randomized FREEDOMS extension trial. In: *Neurology* 84 (15), S. 1582–1591. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001462.
- Kappos, Ludwig; Radue, Ernst-Wilhelm; O'Connor, Paul; Polman, Chris; Hohlfeld, Reinhard; Calabresi, Peter et al. (2010): A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. In: *The New England journal of medicine* 362 (5), S. 387–401. DOI: 10.1056/NEJMoa0909494.
- Khan, Tarik A.; Friedensohn, Simon; Gorter de Vries, Arthur R.; Straszewski, Jakub; Ruscheweyh, Hans-Joachim; Reddy, Sai T. (2016): Accurate and predictive antibody repertoire profiling by molecular amplification fingerprinting. In: *Science advances* 2 (3), e1501371. DOI: 10.1126/sciadv.1501371.
- Kinde, Isaac; Wu, Jian; Papadopoulos, Nick; Kinzler, Kenneth W.; Vogelstein, Bert (2011): Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23), S. 9530–9535. DOI: 10.1073/pnas.1105422108.
- Kircher, Martin; Stenzel, Udo; Kelso, Janet (2009): Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. In: *Genome biology* 10 (8), R83. DOI: 10.1186/gb-2009-10-8-r83.
- Kivioja, Teemu; Vaharautio, Anna; Karlsson, Kasper; Bonke, Martin; Enge, Martin; Linnarsson, Sten; Taipale, Jussi (2011): Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. In: *Nature methods* 9 (1), S. 72–74. DOI: 10.1038/nmeth.1778.
- Klatt, J.; Hartung, H-P; Hohlfeld, R. (2007): FTY720 (Fingolimod) als neue Therapiemöglichkeit der Multiplen Sklerose. In: *Der Nervenarzt* 78 (10), S. 1200–1208. DOI: 10.1007/s00115-007-2298-9.

- Koch-Henriksen, Nils; Sørensen, Per Soelberg (2010): The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. In: *The Lancet Neurology* 9 (5), S. 520–532. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70064-8.
- Kozich, James J.; Westcott, Sarah L.; Baxter, Nielson T.; Highlander, Sarah K.; Schloss, Patrick D. (2013): Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. In: *Applied and environmental microbiology* 79 (17), S. 5112–5120. DOI: 10.1128/AEM.01043-13.
- Krell, Pina F. I.; Reuther, Susanne; Fischer, Ute; Keller, Thomas; Weber, Stephan; Gombert, Michael et al. (2013): Next-generation-sequencing-spectratyping reveals public T-cell receptor repertoires in pediatric very severe aplastic anemia and identifies a beta chain CDR3 sequence associated with hepatitis-induced pathogenesis. In: *Haematologica* 98 (9), S. 1388–1396. DOI: 10.3324/haematol.2012.069708.
- Krueger, Felix; Andrews, Simon R.; Osborne, Cameron S. (2011): Large scale loss of data in low-diversity illumina sequencing libraries can be recovered by deferred cluster calling. In: *PloS one* 6 (1), e16607. DOI: 10.1371/journal.pone.0016607.
- Kurtz, David M.; Green, Michael R.; Bratman, Scott V.; Scherer, Florian; Liu, Chih Long; Kunder, Christian A. et al. (2015): Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. In: *Blood* 125 (24), S. 3679–3687. DOI: 10.1182/blood-2015-03-635169.
- Kurtzke, J. F. (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis. An expanded disability status scale (EDSS). In: *Neurology* 33 (11), S. 1444–1452.
- La Mantia, Loredana; Tramacere, Irene; Firwana, Belal; Pacchetti, Ilaria; Palumbo, Roberto; Filippini, Graziella (2016): Fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 4, CD009371. DOI: 10.1002/14651858.CD009371.pub2.
- Langerak, A. W.; Groenen, P. J. T. A.; Bruggemann, M.; Beldjord, K.; Bellan, C.; Bonello, L. et al. (2012): EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. In: *Leukemia* 26 (10), S. 2159–2171. DOI: 10.1038/leu.2012.246.
- Laplaud, David-Axel; Berthelot, Laureline; Miqueu, Patrick; Bourcier, Kasia; Moynard, Julien; Oudinet, Yannick et al. (2006): Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. In: *Journal of neuroimmunology* 177 (1-2), S. 151–160. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2006.05.006.
- Ledergerber, Christian; Dessimoz, Christophe (2011): Base-calling for next-generation sequencing platforms. In: *Briefings in bioinformatics* 12 (5), S. 489–497. DOI: 10.1093/bib/bbq077.
- Lefranc, Marie-Paule; Lefranc, Gerard (2001a): The Immunoglobulin FactsBook. Burlington: Elsevier Science (Factsbook). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10551741>.
- Lefranc, Marie-Paule; Lefranc, Gérard (2001b): The T cell receptor factsbook. San Diego, Calif: Academic Press (Factsbook series). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10190340>.
- Li, Hoi Ming; Hiroi, Toyoko; Zhang, Yongqing; Shi, Alvin; Chen, Guobing; De, Supriyo et al. (2016): TCR $\beta$  repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. In: *Journal of leukocyte biology* 99 (3), S. 505–513. DOI: 10.1189/jlb.6A0215-071RR.

- Lossius, Andreas; Johansen, Jorunn N.; Vartdal, Frode; Holmøy, Trygve (2016): High-throughput sequencing of immune repertoires in multiple sclerosis. In: *Annals of clinical and translational neurology* 3 (4), S. 295–306. DOI: 10.1002/acn3.295.
- Loukas, Yannis L.; Thodi, Georgia; Molou, Elina; Georgiou, Vassiliki; Dotsikas, Yannis; Schulpis, Kleopatra H. (2015): Clinical diagnostic Next-Generation sequencing: the case of CFTR carrier screening. In: *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 75 (5), S. 374–381. DOI: 10.3109/00365513.2015.1031689.
- Lublin, F. D.; Reingold, S. C. (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis. Results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. In: *Neurology* 46 (4), S. 907–911.
- Lublin, Fred D.; Reingold, Stephen C.; Cohen, Jeffrey A.; Cutter, Gary R.; Sorensen, Per Soelberg; Thompson, Alan J. et al. (2014): Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. In: *Neurology* 83 (3), S. 278–286. DOI: 10.1212/WNL.000000000000560.
- Luckey, J. A.; Drossman, H.; Kostichka, A. J.; Mead, D. A.; D'Cunha, J.; Norris, T. B.; Smith, L. M. (1990): High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. In: *Nucleic acids research* 18 (15), S. 4417–4421. DOI: 10.1093/nar/18.15.4417.
- Mahnke, Yolanda D.; Brodie, Tess M.; Sallusto, Federica; Roederer, Mario; Lugli, Enrico (2013): The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. In: *European journal of immunology* 43 (11), S. 2797–2809. DOI: 10.1002/eji.201343751.
- Mandala, Suzanne; Hajdu, Richard; Bergstrom, James; Quackenbush, Elizabeth; Xie, Jenny; Milligan, James et al. (2002): Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5566), S. 346–349. DOI: 10.1126/science.1070238.
- Margulies, Marcel; Egholm, Michael; Altman, William E.; Attiya, Said; Bader, Joel S.; Bembien, Lisa A. et al. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. In: *Nature* 437 (7057), S. 376–380. DOI: 10.1038/nature03959.
- Markoulatos, P.; Siafakas, N.; Moncany, M. (2002): Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. In: *Journal of clinical laboratory analysis* 16 (1), S. 47–51.
- Martin, Roland; Sospedra, Mireia; Rosito, Maria; Engelhardt, Britta (2016): Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. In: *European journal of immunology* 46 (9), S. 2078–2090. DOI: 10.1002/eji.201646485.
- Matloubian, Mehrdad; Lo, Charles G.; Cinamon, Guy; Lesneski, Matthew J.; Xu, Ying; Brinkmann, Volker et al. (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. In: *Nature* 427 (6972), S. 355–360. DOI: 10.1038/nature02284.
- Matsumoto, Y.; Yoon, W. K.; Jee, Y.; Fujihara, K.; Misu, T.; Sato, S. et al. (2003): Complementarity-Determining Region 3 Spectratyping Analysis of the TCR Repertoire in Multiple Sclerosis. In: *The Journal of Immunology* 170 (9), S. 4846–4853. DOI: 10.4049/jimmunol.170.9.4846.
- Matz, M.; Shagin, D.; Bogdanova, E.; Britanova, O.; Lukyanov, S.; Diatchenko, L.; Chenchik, A. (1999): Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. In: *Nucleic acids research* 27 (6), S. 1558–1560.
- McCloskey, Megan L.; Stoger, Reinhard; Hansen, R. Scott; Laird, Charles D. (2007): Encoding PCR products with batch-stamps and barcodes. In: *Biochemical genetics* 45 (11-12), S. 761–767. DOI: 10.1007/s10528-007-9114-x.

- McDonald, W. I.; Compston, A.; Edan, G.; Goodkin, D.; Hartung, H. P.; Lublin, F. D. et al. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis. Guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. In: *Annals of neurology* 50 (1), S. 121–127.
- Mehling, M.; Brinkmann, V.; Antel, J.; Bar-Or, A.; Goebels, N.; Vadrine, C. et al. (2008): FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. In: *Neurology* 71 (16), S. 1261–1267. DOI: 10.1212/01.wnl.0000327609.57688.ea.
- Mehling, M.; Lindberg, R.; Raulf, F.; Kuhle, J.; Hess, C.; Kappos, L.; Brinkmann, V. (2010): Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. In: *Neurology* 75 (5), S. 403–410. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181ebdd64.
- Miles, John J.; Douek, Daniel C.; Price, David A. (2011): Bias in the  $\alpha\beta$  T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. In: *Immunology and cell biology* 89 (3), S. 375–387. DOI: 10.1038/icb.2010.139.
- Miner, Brooks E.; Stoger, Reinhard J.; Burden, Alice F.; Laird, Charles D.; Hansen, R. Scott (2004): Molecular barcodes detect redundancy and contamination in hairpin-bisulfite PCR. In: *Nucleic acids research* 32 (17), e135. DOI: 10.1093/nar/gnh132.
- Miyazaki, Yusei; Niino, Masaaki; Fukazawa, Toshiyuki; Takahashi, Eri; Nonaka, Takayuki; Amino, Itaru et al. (2014): Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, based on altered proportions of B-cell subpopulations. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 151 (2), S. 127–135. DOI: 10.1016/j.clim.2014.02.001.
- Murphy, Kenneth M.; Travers, Paul; Walport, Mark (2014): Janeway Immunologie. Unter Mitarbeit von Michael Ehrenstein, Claudia Mauri, Allan Mowat, Lothar Seidler und Ingrid Haubler-Siller. 7., Auflage, korrigierter Nachdruck 2014. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Mutter, G. L.; Boynton, K. A. (1995): PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. In: *Nucleic acids research* 23 (8), S. 1411–1418.
- Nakamura, Masakazu; Matsuoka, Takako; Chihara, Norio; Miyake, Sachiko; Sato, Wakiro; Araki, Manabu et al. (2014): Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 20 (10), S. 1371–1380. DOI: 10.1177/1352458514523496.
- Nguyen, Phuong; Ma, Jing; Pei, Deqing; Obert, Caroline; Cheng, Cheng; Geiger, Terrence L. (2011): Identification of errors introduced during high throughput sequencing of the T cell receptor repertoire. In: *BMC genomics* 12, S. 106. DOI: 10.1186/1471-2164-12-106.
- Nijkamp, F. P.; Parnham, Michael J. (Hg.) (2011): Principles of Immunopharmacology. 3rd revised and extended edition. Basel: Birkhäuser Basel. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-0346-0136-8>.
- Nikolich-Zugich, Janko; Slifka, Mark K.; Messaoudi, Ilhem (2004): The many important facets of T-cell repertoire diversity. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (2), S. 123–132. DOI: 10.1038/nri1292.
- Ortiz, Genaro Gabriel; Pacheco-Moisés, Fermín Paul; Macías-Islas, Miguel Ángel; Flores-Alvarado, Luis Javier; Mireles-Ramírez, Mario A.; González-Renovato, Erika Daniela et al. (2014): Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. In: *Archives of medical research* 45 (8), S. 687–697. DOI: 10.1016/j.arcmed.2014.11.013.
- Paillard, F.; Sterkers, G.; Bismuth, G.; Gomard, E.; Vaquero, C. (1988): Lymphokine mRNA and T cell multireceptor mRNA of the Ig super gene family are reciprocally modulated during human

- T cell activation. In: *European journal of immunology* 18 (10), S. 1643–1646. DOI: 10.1002/eji.1830181028.
- Pielou, E. C. (1966): The measurement of diversity in different types of biological collections. In: *Journal of Theoretical Biology* 13, S. 131–144. DOI: 10.1016/0022-5193(66)90013-0.
- Polman, Chris H.; Reingold, Stephen C.; Banwell, Brenda; Clanet, Michel; Cohen, Jeffrey A.; Filippi, Massimo et al. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. In: *Annals of neurology* 69 (2), S. 292–302. DOI: 10.1002/ana.22366.
- Polman, Chris H.; Reingold, Stephen C.; Edan, Gilles; Filippi, Massimo; Hartung, Hans-Peter; Kappos, Ludwig et al. (2005): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". In: *Annals of neurology* 58 (6), S. 840–846. DOI: 10.1002/ana.20703.
- Qi, Qian; Liu, Yi; Cheng, Yong; Glanville, Jacob; Zhang, David; Lee, Ji-Yeun et al. (2014): Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (36), S. 13139–13144. DOI: 10.1073/pnas.1409155111.
- Robins, Harlan S.; Campregher, Paulo V.; Srivastava, Santosh K.; Wachter, Abigail; Turtle, Cameron J.; Kahsai, Orsalem et al. (2009): Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. In: *Blood* 114 (19), S. 4099–4107. DOI: 10.1182/blood-2009-04-217604.
- Robins, Harlan S.; Srivastava, Santosh K.; Campregher, Paulo V.; Turtle, Cameron J.; Andriesen, Jessica; Riddell, Stanley R. et al. (2010): Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. In: *Science translational medicine* 2 (47), 47ra64. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001442.
- Rothberg, Jonathan M.; Hinz, Wolfgang; Rearick, Todd M.; Schultz, Jonathan; Mileski, William; Davey, Mel et al. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. In: *Nature* 475 (7356), S. 348–352. DOI: 10.1038/nature10242.
- Ruggiero, Eliana; Nicolay, Jan P.; Fronza, Raffaele; Arens, Anne; Paruzynski, Anna; Nowrouzi, Ali et al. (2015): High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. In: *Nature communications* 6, S. 8081. DOI: 10.1038/ncomms9081.
- Sakaguchi, Shimon; Wing, Kajsa; Yamaguchi, Tomoyuki (2009): Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. In: *European journal of immunology* 39 (9), S. 2331–2336. DOI: 10.1002/eji.200939688.
- Sallusto, Federica; Geginat, Jens; Lanzavecchia, Antonio (2004): Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. In: *Annual review of immunology* 22, S. 745–763. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- Salou, Marion; Garcia, Alexandra; Michel, Laure; Gainche-Salmon, Anne; Loussouarn, Delphine; Nicol, Bryan et al. (2015): Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. In: *Annals of clinical and translational neurology* 2 (6), S. 609–622. DOI: 10.1002/acn3.199.
- Sanger, F.; Coulson, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. In: *Journal of molecular biology* 94 (3), S. 441–448.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.
- Sato, Douglas Kazutoshi; Nakashima, Ichiro; Bar-Or, Amit; Misu, Tatsuro; Suzuki, Chihiro; Nishiyama, Shuhei et al. (2014): Changes in Th17 and regulatory T cells after fingolimod

- initiation to treat multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 268 (1-2), S. 95–98. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.01.008.
- Sawcer, Stephen; Hellenthal, Garrett; Pirinen, Matti; Spencer, Chris C. A.; Patsopoulos, Nikolaos A.; Moutsianas, Loukas et al. (2011): Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. In: *Nature* 476 (7359), S. 214–219. DOI: 10.1038/nature10251.
- Schirmer, Melanie; Ijaz, Umer Z.; D'Amore, Rosalinda; Hall, Neil; Sloan, William T.; Quince, Christopher (2015): Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. In: *Nucleic acids research* 43 (6), e37. DOI: 10.1093/nar/gku1341.
- Schroeder, Harry W.; Cavacini, Lisa (2010): Structure and function of immunoglobulins. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S41-52. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Serpero, Laura D.; Filaci, Gilberto; Parodi, Alessia; Battaglia, Florinda; Kalli, Francesca; Brogi, Davide et al. (2013): Fingolimod modulates peripheral effector and regulatory T cells in MS patients. In: *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 8 (5), S. 1106–1113. DOI: 10.1007/s11481-013-9465-5.
- Shannon, C. E. (1948): A Mathematical Theory of Communication. In: *Bell System Technical Journal* 27 (4), S. 623–656. DOI: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb00917.x.
- Shannon, C. E. (1997): The mathematical theory of communication. 1963. In: *M.D. computing : computers in medical practice* 14 (4), S. 306–317.
- Shugay, Mikhail; Bagaev, Dmitriy V.; Turchaninova, Maria A.; Bolotin, Dmitriy A.; Britanova, Olga V.; Putintseva, Ekaterina V. et al. (2015): VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. In: *PLoS computational biology* 11 (11), e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
- Siebert, P. D.; Chenchik, A.; Kellogg, D. E.; Lukyanov, K. A.; Lukyanov, S. A. (1995): An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. In: *Nucleic acids research* 23 (6), S. 1087–1088.
- SIMPSON, E. H. (1949): Measurement of Diversity. In: *Nature* 163 (4148), S. 688. DOI: 10.1038/163688a0.
- Sint, Daniela; Raso, Lorna; Traugott, Michael (2012): Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. In: *Methods in ecology and evolution* 3 (5), S. 898–905. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x.
- Six, Adrien; Mariotti-Ferrandiz, Maria Encarnita; Chaara, Wahiba; Magadan, Susana; Pham, Hang-Phuong; Lefranc, Marie-Paule et al. (2013): The past, present, and future of immune repertoire biology - the rise of next-generation repertoire analysis. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 413. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00413.
- Skulina, Christian; Schmidt, Stephan; Dornmair, Klaus; Babbe, Holger; Roers, Axel; Rajewsky, Klaus et al. (2004): Multiple sclerosis. Brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (8), S. 2428–2433.
- Smith, L. M.; Sanders, J. Z.; Kaiser, R. J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Connell, C. R. et al. (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. In: *Nature* 321 (6071), S. 674–679. DOI: 10.1038/321674a0.
- Sobottka, Bettina; Harrer, Melanie Denise; Ziegler, Urs; Fischer, Katja; Wiendl, Heinz; Hünig, Thomas et al. (2009): Collateral bystander damage by myelin-directed CD8+ T cells causes

- axonal loss. In: *The American journal of pathology* 175 (3), S. 1160–1166. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090340.
- Song, Zi-Ye; Yamasaki, Ryo; Kawano, Yuji; Sato, Shinya; Masaki, Katsuhisa; Yoshimura, Satoshi et al. (2014): Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. In: *PloS one* 10 (4), e0124923. DOI: 10.1371/journal.pone.0124923.
- Sospedra, Mireia; Martin, Roland (2005): Immunology of multiple sclerosis. In: *Annual review of immunology* 23, S. 683–747. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.
- Stromnes, Ingunn M.; Goverman, Joan M. (2006a): Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. In: *Nature protocols* 1 (4), S. 1810–1819. DOI: 10.1038/nprot.2006.285.
- Stromnes, Ingunn M.; Goverman, Joan M. (2006b): Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. In: *Nature protocols* 1 (4), S. 1952–1960. DOI: 10.1038/nprot.2006.284.
- Swerdlow, Harold; Gesteland, Raymond (1990): Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. In: *Nucleic acids research* 18 (6), S. 1415–1419. DOI: 10.1093/nar/18.6.1415.
- Thompson, Alan J.; Banwell, Brenda L.; Barkhof, Frederik; Carroll, William M.; Coetzee, Timothy; Comi, Giancarlo et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis. 2017 revisions of the McDonald criteria. In: *The Lancet Neurology* 17 (2), S. 162–173. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- Turchaninova, M. A.; Davydov, A.; Britanova, O. V.; Shugay, M.; Bikos, V.; Egorov, E. S. et al. (2016): High-quality full-length immunoglobulin profiling with unique molecular barcoding. In: *Nature protocols* 11 (9), S. 1599–1616. DOI: 10.1038/nprot.2016.093.
- van Dongen, J. J. M.; Langerak, A. W.; Brüggemann, M.; Evans, P. A. S.; Hummel, M.; Lavender, F. L. et al. (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. In: *Leukemia* 17 (12), S. 2257–2317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
- van Heijst, Jeroen W. J.; Ceberio, Izaskun; Lipuma, Lauren B.; Samilo, Dane W.; Wasilewski, Gloria D.; Gonzales, Anne Marie R. et al. (2013): Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. In: *Nature medicine* 19 (3), S. 372–377. DOI: 10.1038/nm.3100.
- Venturi, Vanessa; Price, David A.; Douek, Daniel C.; Davenport, Miles P. (2008): The molecular basis for public T-cell responses? In: *Nature reviews. Immunology* 8 (3), S. 231–238. DOI: 10.1038/nri2260.
- Viglietta, Vissia; Baecher-Allan, Clare; Weiner, Howard L.; Hafler, David A. (2004): Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (7), S. 971–979. DOI: 10.1084/jem.20031579.
- Vollmers, Christopher; Sit, Rene V.; Weinstein, Joshua A.; Dekker, Cornelia L.; Quake, Stephen R. (2013): Genetic measurement of memory B-cell recall using antibody repertoire sequencing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (33), S. 13463–13468. DOI: 10.1073/pnas.1312146110.
- Wagner, Andreas; Blackstone, Neil; Cartwright, Pauly; Dick, Matthew; Misof, Bernhard; Snow, Peter et al. (1994): Surveys of Gene Families Using Polymerase Chain Reaction. PCR Selection and PCR Drift. In: *Systematic Biology* 43 (2), S. 250. DOI: 10.2307/2413465.

- Walsh, M. J.; Tourtellotte, W. W.; Roman, J.; Dreyer, W. (1985): Immunoglobulin G, A, and M-clonal restriction in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum--analysis by two-dimensional electrophoresis. In: *Clinical immunology and immunopathology* 35 (3), S. 313–327.
- Wu, Zhihua; Gui, Songtao; Quan, Zhiwu; Pan, Lei; Wang, Shuzhen; Ke, Weidong et al. (2014): A precise chloroplast genome of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) evaluated with Sanger, Illumina MiSeq, and PacBio RS II sequencing platforms: insight into the plastid evolution of basal eudicots. In: *BMC plant biology* 14, S. 289. DOI: 10.1186/s12870-014-0289-0.
- Xing, Yan; Hogquist, Kristin A. (2012): T-cell tolerance. Central and peripheral. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a006957.
- Xu, J. L.; Davis, M. M. (2000): Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. In: *Immunity* 13 (1), S. 37–45.
- Ye, Jian; Ma, Ning; Madden, Thomas L.; Ostell, James M. (2013): IgBLAST. An immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. In: *Nucleic acids research* 41 (Web Server issue), W34-40. DOI: 10.1093/nar/gkt382.
- Yokota, Ryo; Kaminaga, Yuki; Kobayashi, Tetsuya J. (2017): Quantification of Inter-Sample Differences in T-Cell Receptor Repertoires Using Sequence-Based Information. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1500. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01500.
- Yu, Yaxuan; Ceredig, Rhodri; Seoighe, Cathal (2016): LymAnalyzer: a tool for comprehensive analysis of next generation sequencing data of T cell receptors and immunoglobulins. In: *Nucleic acids research* 44 (4), e31. DOI: 10.1093/nar/gkv1016.
- Zhang, J.; Markovic-Plese, S.; Lacet, B.; Raus, J.; Weiner, H. L.; Hafler, D. A. (1994): Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. In: *The Journal of experimental medicine* 179 (3), S. 973–984.
- Zhu, Y. Y.; Machleder, E. M.; Chenchik, A.; Li, R.; Siebert, P. D. (2001): Reverse transcriptase template switching. A SMART approach for full-length cDNA library construction. In: *BioTechniques* 30 (4), S. 892–897.

### Internet-Quellen:

- <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/brochure-ab-genetic-analyzers.pdf> (Stand vom 06.02.2018)
- <https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business> (Stand vom 06.02.2018)
- <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PGM-Specification-Sheet.pdf> (Stand vom 06.02.2018)
- [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_miseq.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_miseq.pdf) (Stand vom 06.02.2018)
- <https://www.r-project.org/>
- <https://www.rstudio.com/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>

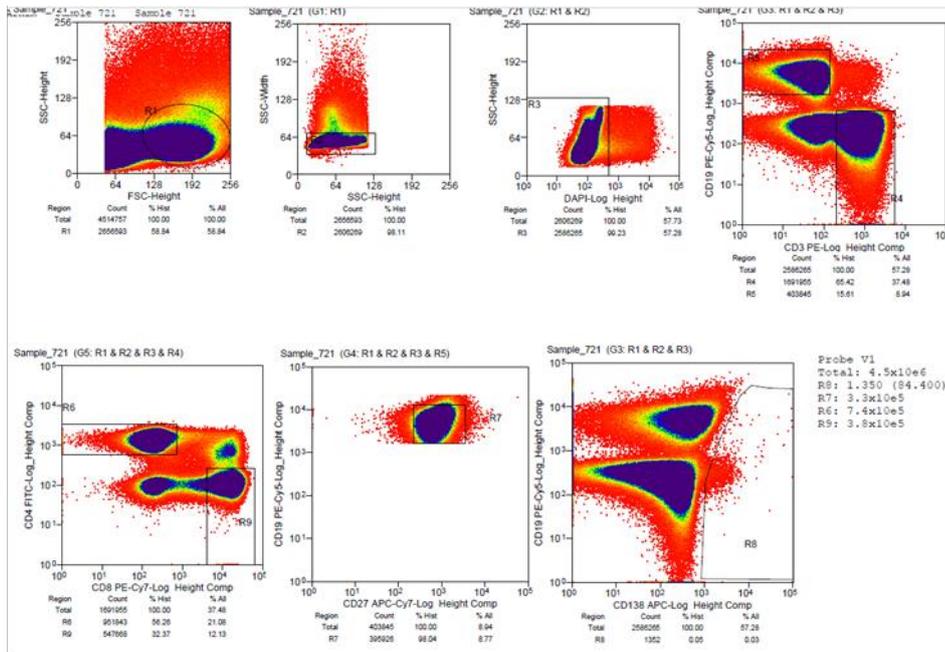
[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system\\_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-01.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-01.pdf) (Stand vom 06.02.2018)

# 8 Anhang

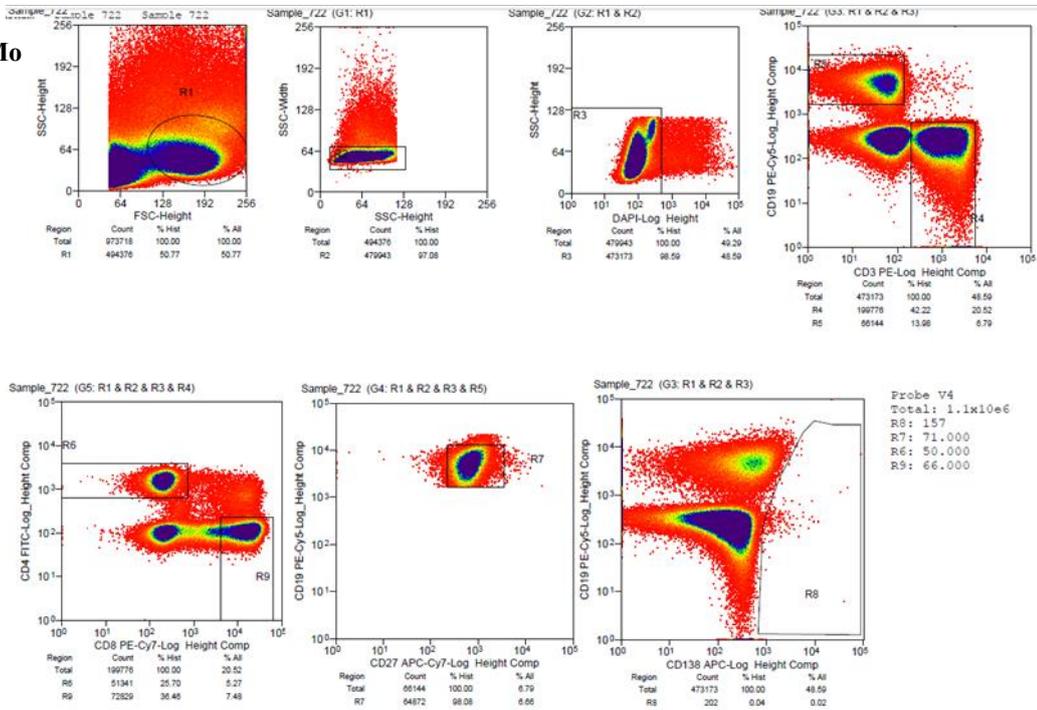
## 8.1 Dokumentation der Zellsortierung der einzelnen Proben (FACS)

Patientin A:

VB

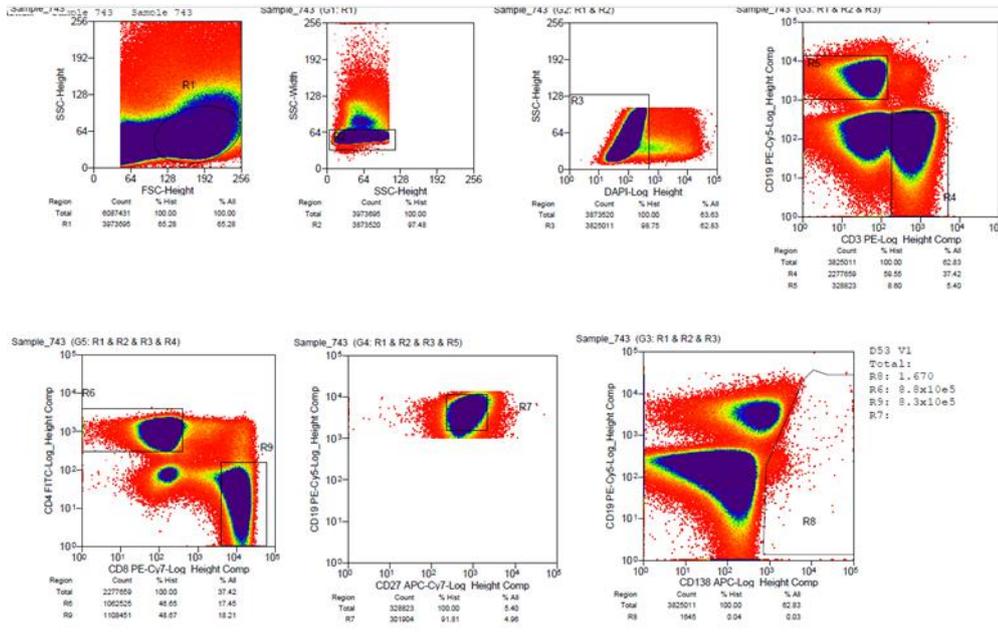


6 Mo

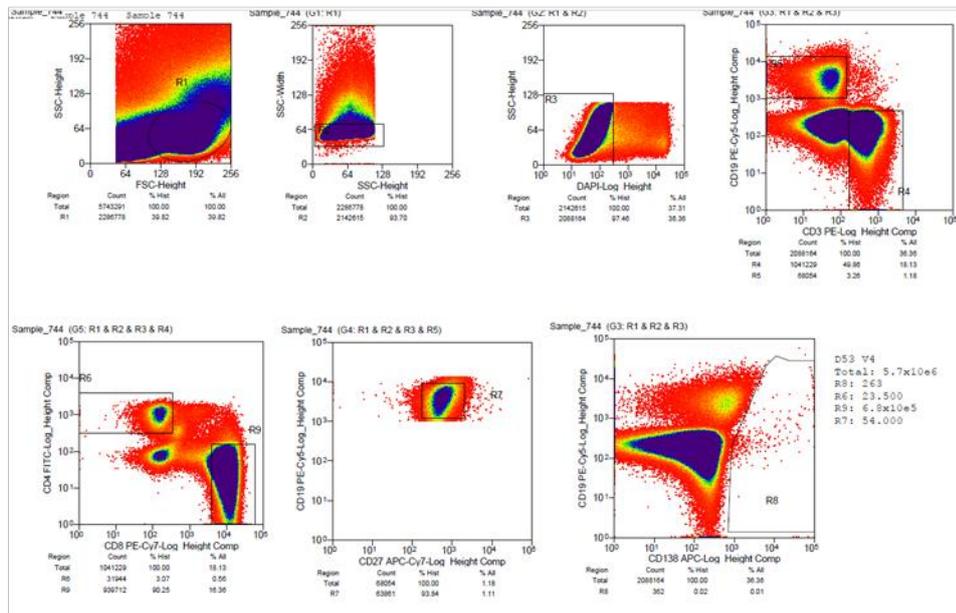


**Patient B:**

**VB**



**6 Mo**



## 8.2 Berechnung der Diversitätsindices mit R/R-Studio (Protokoll)

### Diversitätindices

Scheffler

10.01.2018

```
# Pfad
setwd("C:/VDJ_files_AB_DivIndices/")
# Daten einlesen
A1 <- read.table("vdj.exp_clones_A1.txt", header = TRUE)
A2 <- read.table("vdj.exp_clones_A2.txt", header = TRUE)
A3 <- read.table("vdj.exp_clones_A3.txt", header = TRUE)
A4 <- read.table("vdj.exp_clones_A4.txt", header = TRUE)
B1 <- read.table("vdj.exp_clones_B1.txt", header = TRUE)
B2 <- read.table("vdj.exp_clones_B2.txt", header = TRUE)
B3 <- read.table("vdj.exp_clones_B3.txt", header = TRUE)
B4 <- read.table("vdj.exp_clones_B4.txt", header = TRUE)
```

### Diversitätindices

#### Simpson Index:

$$SI = 1 / \sum_i (n_i/N)^2$$

```
SI <- function(data){
  SI <- numeric(0)
  for(i in 1:nrow(data)){
    SI[i] <- (data[i,2])^2
  }
  SI_index <- 1/sum(SI)
  return(SI_index)
}

# Ausgabe des Simpson-Index für die verschiedenen Dateien
simpson_all <- c(SI(A1), SI(A2), SI(A3), SI(A4), SI(B1), SI(B2), SI(B3), SI(B4))
simpson_all <- as.matrix(simpson_all)
dimnames(simpson_all) <- list(c("Datei A1", "Datei A2", "Datei A3", "Datei A4", "Datei B1", "Datei B2", "Datei B3", "Datei B4"))
simpson_all
```

```
##           [,1]
## Datei A1 11886.316674
## Datei A2  1590.906035
## Datei A3   606.697233
## Datei A4   196.641972
## Datei B1 1127.792405
## Datei B2   19.193934
## Datei B3   52.603366
## Datei B4    2.315854
```

## Shannon Index:

$$SA = - \sum_i (n_i/N) \log(n_i/N)$$

```
SA <- function(data){

  SA_Be <- numeric(0)
  SA_B2 <- numeric(0)
  SA_B10 <- numeric(0)

  for(i in 1:nrow(data)){
    # Shannon index mit natürlichem Logarithmus
    SA_Be[i] <- data[i,2] * log(data[i,2], base = exp(1))
    SA_index_Be <- - sum(SA_Be)

    # Shannon index mit Logarithmus zur Basis 2
    SA_B2[i] <- data[i,2] * log2(data[i,2])
    SA_index_B2 <- -sum(SA_B2)

    #Shannon index mit Logarithmus zur Basis 10
    SA_B10[i] <- data[i,2] * log10(data[i,2])
    SA_index_B10 <- - sum(SA_B10)
  }

  return(c(SA_index_Be, SA_index_B2, SA_index_B10))
}

# Ausgabe des Shannon-Index für die verschiedenen Dateien
shannon_all <- matrix(c(SA(A1), SA(A2),SA(A3), SA(A4), SA(B1), SA(B2), SA(B3), SA(B
4)), ncol = 3, nrow = 8, byrow = TRUE)
dimnames(shannon_all) <- list(c("Datei A1", "Datei A2", "Datei A3", "Datei A4", "Da
tei B1", "Datei B2", "Datei B3", "Datei B4"),c("Log_e", "Log_2", "Log_10"))
shannon_all
```

```
##           Log_e    Log_2    Log_10
## Datei A1 9.697558 13.990619 4.2115958
## Datei A2 8.330044 12.017713 3.6176921
## Datei A3 6.677260 9.633250 2.8998972
## Datei A4 6.838701 9.866160 2.9700100
## Datei B1 7.537748 10.874672 3.2736024
## Datei B2 6.285193 9.067617 2.7296246
## Datei B3 5.212252 7.519690 2.2636521
## Datei B4 1.657344 2.391042 0.7197754
```

## Eveness:

$H_{max} = -\log(1/i)$ , wobei  $i$  die Anzahl der Arten ist

$$E = SA/H_{max}$$

```
H_max <- function(data){
  # H_max mit natürlichem Logarithmus
  H_max_Be <- - log(1/nrow(data), base = exp(1))

  # H_max mit Logarithmus zur Basis 2
  H_max_B2 <- - log2(1/nrow(data))

  # H_max mit Logarithmus zur Basis 10
  H_max_B10 <- - log10(1/nrow(data))

  return(c(H_max_Be, H_max_B2, H_max_B10))
}

H_max_all <- matrix(c(H_max(A1),H_max(A2), H_max(A3), H_max(A4), H_max(B1), H_max(B
2), H_max(B3), H_max(B4)), ncol = 3, nrow = 8, byrow = TRUE)
dimnames(H_max_all) <- list(c("Datei A1", "Datei A2", "Datei A3", "Datei A4", "Date
i B1", "Datei B2", "Datei B3", "Datei B4"),c("Log_e", "Log_2", "Log_10"))
H_max_all
```

```
##           Log_e    Log_2    Log_10
## Datei A1 10.177628 14.683214 4.420088
## Datei A2  8.938007 12.894818 3.881727
## Datei A3  7.259820 10.473706 3.152900
## Datei A4  7.989221 11.526010 3.469675
## Datei B1  8.020599 11.571279 3.483302
## Datei B2  8.754949 12.630722 3.802226
## Datei B3  6.375025  9.197217 2.768638
## Datei B4  5.869297  8.467606 2.549003
```

```
# Ausgabe der Eveness für die verschiedenen Dateien
eveness_all <- matrix(c(SA(A1)/H_max(A1),SA(A2)/H_max(A2),SA(A3)/H_max(A3), SA(A4)/
H_max(A4), SA(B1)/H_max(B1), SA(B2)/H_max(B2), SA(B3)/H_max(B3), SA(B4)/H_max(B4)),
ncol = 3, nrow = 8, byrow = TRUE)
dimnames(eveness_all) <- list(c("Datei A1", "Datei A2", "Datei A3", "Datei A4", "Datei B1",
"Datei B2", "Datei B3", "Datei B4"),c("Log_e", "Log_2", "Log_10"))
eveness_all
```

```
##           Log_e    Log_2    Log_10
## Datei A1 0.9528308 0.9528308 0.9528308
## Datei A2 0.9319801 0.9319801 0.9319801
## Datei A3 0.9197556 0.9197556 0.9197556
## Datei A4 0.8559909 0.8559909 0.8559909
## Datei B1 0.9397986 0.9397986 0.9397986
## Datei B2 0.7179017 0.7179017 0.7179017
## Datei B3 0.8176049 0.8176049 0.8176049
## Datei B4 0.2823753 0.2823753 0.2823753
```

## **9 Danksagung:**

Ich danke meinem Betreuer Prof. Dr. Norbert Goebels, meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Colin R. MacKenzie und allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der verschiedenen Arbeitsgruppen, Institute und Kliniken für die hervorragende Zusammenarbeit und die große Unterstützung, wodurch diese Arbeit überhaupt erst möglich wurde!