

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek)

Der Einfluss der CD27 Ko-Stimulation auf T Zellen im Zusammenhang mit
Tuberkulose

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Johanna Pauline Villmann

2024

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Marc Jacobsen

Zweitgutachterin: PD Dr. Anja Moldenhauer

Zusammenfassung

CD27 (*cluster of differentiation 27*) ist ein Ko-Rezeptor auf T Zellen. Neben CD27 gibt es noch diverse weitere Ko-Rezeptoren. Diese können entweder einen aktivierenden oder einen inhibierenden Effekt auf die Aktivierung der T Zellen über den T Zell Rezeptors (TCR) haben. Alle Ko-Rezeptoren haben gemeinsam, dass eine alleinige Stimulation dieser keine Aktivierung der T Zellen hervorruft. Eine simultane Stimulation des TCR und eines aktivierenden Ko-Rezeptors, wie es CD27 oder CD28 sind, führt zu einer Verstärkung des Aktivierungssignals und damit einer gesteigerten Funktion der T Zellen. Als Zeichen der Aktivierung wurden die Zytokinproduktion der T Zellen, sowie die Veränderung der Expression der Oberflächenrezeptoren definiert.

Unter anderem spielen T Zellen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer aktiven Tuberkulose. Die Tuberkulose ist eine der häufigsten Infektionserkrankungen und führenden Todesursachen weltweit. Die Erkrankung entsteht durch die Übertragung von Mycobakterien, meist vom *Mycobacterium tuberculosis complex*. Es konnte bereits gezeigt werden, dass T Zellen von Patienten mit aktiver Tuberkulose eine veränderte Oberflächenexpression von bestimmten Zytokin- und Ko-Rezeptoren verglichen mit Gesunden aufweisen. Sowohl der IL7R α (Interleukin 7 Rezeptor α) als auch der CD27 Rezeptor werden vermindert auf der Oberfläche exprimiert. In diesem Projekt sollte untersucht werden, welche Auswirkung die CD27 Ko-Stimulation auf die Aktivierung und Funktion von naiven T Zellen und die Regulation des IL7R α auf der Zelloberfläche hat. Zudem sollte ein möglicher Zusammenhang der verminderten Expression der beiden Rezeptoren überprüft werden.

Aus heparinisiertem Vollblut von gesunden Spendern wurden mononukleare Zellen (PBMCs) isoliert. Für weitere Experimente wurden aus diesen Zellen mittels negativer magnetischer Zellauswahl naive T Zellen isoliert. Die angereicherten naiven T Zellen wurden mittels vernetzender TCR und CD28 Antikörper, sowie unterschiedlichen Konzentrationen von CD27 Antikörpern stimuliert und mit PBMCs verglichen. Die stimulierten T-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von Zytokinen und die Oberflächenrezeptoren CD25, IL7R α und CD45-Isoformen als Aktivitätsparameter untersucht.

Eine vernetzende Stimulation des TCR mit CD27 oder CD28 führte zu einer gesteigerten Aktivierung der naiven T Zellen in Form einer erhöhten Zytokinproduktion. Insgesamt wiesen naive T Zellen verglichen mit einer gemischten T Zell Population eine erhöhte Aktivierungsschwelle auf. Eine Ko-Stimulation von CD27 führte zu einer konzentrations-abhängigen verminderten Expression des IL7R α auf der Oberfläche der naiven T Zellen. Im Re-Stimulationsmodell konnte ebenfalls ein Einfluss der CD27 Ko-Stimulation auf naive T Zellen gezeigt werden. Die initiale Ko-Stimulation von CD27 führte nach Re-Stimulation zu einem deutlich gesteigerten Reaktivierungspotential der Zellen in Form einer erhöhten Zytokinproduktion. Insgesamt konnte zwar ein Zusammenhang zwischen CD27 und der Expression des IL7R α dargestellt werden, dieser erklärt allerdings nicht die Erniedrigung beider Rezeptoren in Tuberkulosepatienten. CD27 könnte somit insgesamt in der Pathogenese der Tuberkulose eine Rolle spielen und sollte Bestandteil weiterer Studien sein, um diese genauer zu definieren.

Summary

CD27 (cluster of differentiation 27) is a co-receptor on T cells. In addition to CD27, there are various other co-receptors. These can have either an activating or an inhibitory effect on the activation of T cells via the T cell receptor (TCR). What all co-receptors have in common is that stimulation of the co-receptor alone does not activate the T cells. Simultaneous stimulation of the TCR and an activating co-receptor, such as CD27 or CD28, leads to an amplification of the activation signal and thus to increased T cell function. As indicators of activation, the cytokine production of T cells and the alteration in surface receptor expression were defined.

Among other things, T cells play a decisive role in the development of active tuberculosis. Tuberculosis is one of the most common infectious diseases and leading causes of death worldwide. The disease is caused by the transmission of mycobacteria, mostly from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. It has already been shown that T cells from patients with active tuberculosis have an altered surface expression of certain cytokine and co-receptors compared to healthy individuals. Both the IL7R α (interleukin 7 receptor α) and the CD27 receptor are expressed at a reduced level on the surface. The aim of this project was to investigate the effect of CD27 co-stimulation on the activation of naïve T cells and the regulation of IL7R α on the cell surface. In addition, a possible connection between the reduced expression of the two receptors was to be examined.

Mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized whole blood from healthy donors. For further experiments, naïve T cells were isolated from these cells using negative magnetic cell selection. The enriched naïve T cells were stimulated with cross-linking TCR and CD28 antibodies and different concentrations of CD27 antibodies and compared with PBMCs. The stimulated T cells were analyzed by flow cytometry for the expression of cytokines and the surface receptors CD25, IL7R α and CD45 isoforms as activity parameters.

Cross-linking stimulation of the TCR with CD27 or CD28 led to increased activation of naïve T cells in the form of increased cytokine production. Overall, naïve T cells showed a higher activation threshold compared to a mixed T cell population. Co-stimulation of CD27 led to a concentration-dependent decreased expression of IL7R α on the surface of naïve T cells. The re-stimulation model also showed an influence of CD27 co-stimulation on naïve T cells. After re-stimulation, the initial co-stimulation of CD27 led to a significantly increased reactivation potential of the cells in the form of increased cytokine production. Overall, although a correlation between CD27 and the expression of IL7R α could be demonstrated, this does not explain the reduction of both receptors in tuberculosis patients. CD27 could therefore contribute to the pathogenesis of tuberculosis and should be part of further studies to define this role more precisely.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
BCL2	B-cell lymphoma 2 (anti-apoptotischer Faktor)
buffy coat	Leukozytenkonzentrat (Nebenprodukt bei der Herstellung von Erythrozyten-/Thrombozytenkonzentraten)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD27^{high/ low}	hohe/ geringe Expression von CD27 an der Oberfläche
E. coli	Escherichia coli (Bakterium)
ELISA	<i>Enzyme-linked immune-sorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
Fas	<i>death receptor</i> (CD95) (Teil der TNF-Familie)
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICS	<i>Intracellular cytokine staining</i> (intrazelluläre Zytokinfärbung)
IFNγ	Interferon gamma
IGRA	<i>Interferon-γ-release assay</i>
IL	Interleukin
IL2R	Rezeptor für Interleukin 2
IL2Rα	alpha-Kette des IL2-Rezeptors
IL2Rβ	beta-Kette des IL2-Rezeptors
IL7R	Rezeptor für Interleukin 7
IL7Rα	alpha-Kette des IL7-Rezeptors
Jak	Januskinase
LeGO	<i>novel lentiviral gene ontology</i>
LTBI	Latente tuberkulöse Infektion
mIL7Rα	membrangebundener IL7R α
MFI	<i>mean fluorescent intensity</i> (Mittlere Fluoreszenz Intensität)

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Ribonukleinsäure)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pLKO	<i>lentiviral (HIV)-based plasmid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
shRNA	<i>small hairpin RNA (ribonucleic acid)</i> durch Plasmide/virale Vektoren vermittelt
sCD27	<i>soluble CD27 receptor</i> (löslicher CD27 Rezeptor)
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TB	Tuberkulose
TCR	T Zell Rezeptor
T Zellen	im Thymus gereifte Lymphozyten
TH1/ TH2/ TH17	T Helferzellen des Subtyps 1/2/17
TNF	Tumornekrose Faktor (Rezeptorfamilie)
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
VB	Vollblut

ZUSAMMENFASSUNG	3
SUMMARY	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	4
1.1. T Zellen: Reifung, Einteilung und Funktion	4
1.2. T Zell Aktivierung	5
1.3. T Zell Proliferation	7
1.4. T Zell Differenzierung	9
1.5. CD27	9
1.5.1. Funktion von CD27 auf T Zellen	10
1.6. Immunpathologie der Tuberkulose	11
1.7. Epidemiologie der Tuberkulose	11
1.8. Die Rolle von T Zellen bei Infektion mit <i>M. tuberculosis</i>	11
1.9. IL7R und Tuberkulose	13
1.10. CD27 im Zusammenhang mit Tuberkulose	13
1.11. Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. Material	15
2.1.1. Laborgeräte	15
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.4. Antikörper	17
2.1.5. Stimulantien	18
2.1.6. Kits	18
2.1.7. Medien und Lösungen	19
2.1.8. Spenderzellen	19
2.1.9. Software	19
2.2. Methoden	20
2.2.1. Isolation von PBMCs aus dem Vollblut	20
2.2.2. Zellzahlbestimmung	20
2.2.3. Isolation von naiven T Zellen aus PBMCs	21
2.2.4. Messung der Reinheit der naiven T Zellen	22
2.2.5. Antikörper <i>Coating</i>	22
2.2.6. Gemeinsamkeiten der Stimulationsmodelle	23
2.2.7. Kurzzeitstimulation von naiven T Zellen	24

2.2.8.	Stimulation mit sekundärem Antikörper	24
2.2.9.	Langzeitstimulation von naiven T Zellen	25
2.2.10.	Stimulation naiver T Zellen mit später Re-Stimulation	25
2.2.11.	Antikörperfärbung nach den Stimulationsmodellen	26
2.2.11.1.	Intrazelluläre und extrazelluläre Färbung nach Kurzzeitstimulation	28
2.2.11.2.	Extrazelluläre Antikörperfärbung nach Langzeitstimulation und Stimulation mit sekundärem Antikörper	29
2.2.11.3.	Antikörperfärbung nach Re-Stimulations-Assay	29
2.2.12.	Kryokonservierung von PBMCs	30
2.2.13.	Auftauen von kryokonservierten PBMCs	30
2.2.14.	Klonen der shRNAs in LeGO-Vektoren	31
2.2.15.	Lentivirale Transduktion naiver T Zellen	31
2.2.16.	Durchflusszytometrische Analyse	33
2.2.16.1.	Auswertung der Zytokine nach Kurzzeitstimulation	34
2.2.16.2.	Auswertung Oberflächenmarker nach Langzeitstimulation	35
2.2.16.3.	Auswertung der Zytokine nach „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assay	36
2.2.16.4.	Auswertung nach Transduktion	37
2.3.	Statistische Auswertung	38
3.	ERGEBNISSE	39
3.1.	Lentivirale Transduktion naiver T Zellen bewirkt keine CD27 Suppression	39
3.2.	Verwendung naiver T Zellen zur Charakterisierung der CD27-Funktion	41
3.3.	Optimierung der Stimulationsbedingungen	42
3.3.1.	Antikörper <i>Coating</i> zur Erhöhung der Zytokinproduktion	42
3.3.2.	Sekundärer Antikörper zur Verbesserung des <i>Crosslinkings</i> der Oberflächenrezeptoren mit nur gering positivem Effekt	45
3.4.	Gesteigerte Zytokinproduktion durch CD27 Ko-Stimulation in der Kurzzeitstimulation naiver T Zellen	47
3.5.	Langzeitstimulation zeigt Teilaktivierung naiver T Zellen im Vergleich zu vollständig aktivierten PBMCs	48
3.6.	Charakterisierung der Auswirkung der CD27 Ko-Stimulation auf naive T Zellen	51
3.6.1.	CD27 Ko-Stimulation zeigt regulatorischen Effekt auf die Expression des IL7R α	51
3.6.2.	Gesteigertes Reaktivierungspotential naiver T Zellen nach Vorstimulation mit CD27 im Re-Stimulations-Assay	53
3.7.	Ergebnisse im Überblick	54
4.	DISKUSSION	55
4.1.	Lentivirale Transduktion als Tool zur Expressionskontrolle von CD27	55
4.2.	Stimulationsbedingungen führten zu geringer Aktivierung naiver T Zellen mit niedriger Zytokinproduktion verglichen mit PBMCs	56
4.3.	Antikörper <i>Coating</i> als überlegene Methode zur Verbesserung der Stimulationsbedingungen verglichen mit der Verwendung eines sekundären Antikörpers	57
4.4.	Gesteigerte Aktivierung der T Zellen durch CD27 Ko-Stimulation	58

4.5. Unterschiedliches Regulationsverhalten des IL7R α in verschiedenen Zellpopulationen	59
4.6. CD27-AK beeinflusst die Aktivität naiver T Zellen und die Expression des IL7R α	60
4.7. CD27 verändert die sekundäre Immunantwort der T Zellen	61
4.8. Möglicher Zusammenhang einer verminderten IL7R α und CD27 Expression auf T Zellen von Patienten mit Tuberkulose	61
4.9. Limitationen	62
4.9.1. Schlussfolgerung	63
5. LITERATURVERZEICHNIS	65
6. TABELLENVERZEICHNIS	70
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70

1. Einleitung

1.1. T Zellen: Reifung, Einteilung und Funktion

T Zellen sind ein Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Sie werden im Knochenmark gebildet und entwickeln sich im Thymus weiter zu reifen T Zellen. Während des Reifungsprozesses durchlaufen die Zellen eine positive und negative Selektion. Dieser Mechanismus soll fehlerhaft entwickelte Zellen wie zum Beispiel autoreaktive T Zellen aussortieren. Die reifen T Zellen gelangen anschließend in die Blutbahn. Solange noch kein Kontakt mit Antigenen stattgefunden hat, bezeichnet man die Zellen als naive T Zellen. Sobald die naiven T Zellen in Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) treten, können diese aktiviert werden und sich weiter differenzieren. [1]

Zunächst werden T Zellen in $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen unterschieden. Diese 2 Gruppen entwickeln sich bereits während der positiven Selektion im Thymus. Aus *double-positive* ($CD4^+CD8^+$) T Zellen werden durch die Interaktion mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren *single-positive* T Zellen. Der Kontakt mit *Major Histocompatibility Complex 2* (MHC2) Molekülen führt zur Entwicklung der $CD4^+$ T Zellen und der Kontakt mit MHC1 Molekülen bringt $CD8^+$ T Zellen hervor. Es gibt außerdem einen kleinen Anteil der T Zellen, der weder $CD4$ noch $CD8$ an der Oberfläche trägt (*double-negative*). [2, 3] Die $CD8^+$ T Zellen bezeichnet man auch als zytotoxische T Zellen. Diese können über verschiedene Mechanismen fremde Oberflächenantigene erkennen und die fremden Zellen ausschalten. [1, 4]

$CD4^+$ T Zellen lassen sich in weitere Subtypen unterteilen. Die verschiedenen Subtypen entstehen durch externe Stimuli und das umgebende Zytokinmilieu in dem sich die $CD4^+$ T Zellen befinden. [5] Man unterscheidet regulatorische T Zellen von T Helfer Zellen. Regulatorische T Zellen kontrollieren die Immunantwort und wahren durch Kontrolle autoreaktiver Zellen die immunologische Selbsttoleranz. Die T Helfer Zellen unterteilen sich wiederum in spezifische Untergruppen (TH1, TH2 und TH17), wobei jede Gruppe spezifische Funktionen der Immunabwehr übernimmt. [1, 6]

Weiterhin werden T Zellen in naive T Zellen und differenzierte T Zellen unterschieden. Naive T Zellen hatten noch keinen Kontakt zu APCs. Die Aktivierung der naiven Zellen erfolgt über den Kontakt des T Zell Rezeptors (TCR) auf ihrer Zelloberfläche mit dem MHC-Molekül auf den APCs. Die Aktivierung von naiven T Zellen führt neben der Proliferation und Zytokinproduktion zu ihrer Differenzierung zu Effektor T Zellen. Diese lassen sich durch eine veränderte Expression der Oberflächenmarker unterscheiden (siehe 1.2 und 1.3). [5, 7, 8] Die Effektor T Zellen lassen sich nach ihren Oberflächenmarkern in $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen mit ihren spezifischen Funktionen einteilen. [1] Sowohl naive T Zellen als auch Effektor T Zellen

können sich zu Gedächtnis T Zellen weiterentwickeln. Diese Differenzierung ist von weiteren spezifischen Signalen abhängig. [7]

1.2. T Zell Aktivierung

Die Aktivierung der naiven T Zellen erfolgt über den T Zell Rezeptor (TCR). Dieser interagiert mit dem MHC auf den APCs, welcher ein Peptid präsentiert. Dieser Kontakt reicht allein nicht aus, um die ruhende naive T Zelle zu aktivieren. Es benötigt zwei weitere Signale, damit die naive T Zelle in den Zellzyklus eintritt. Das zweite Signal ist die Interaktion der Ko-Rezeptoren. Es gibt sowohl inhibierende als auch aktivierende Ko-Rezeptoren. Diese kommunizieren mit ihrem spezifischen Liganden, welcher von den APCs präsentiert wird. Mittlerweile sind neben CD28, welcher als erster Ko-Rezeptor der T Zellen identifiziert wurde, zahlreiche weitere sowohl inhibierende als auch aktivierende Ko-Rezeptoren bekannt. Zu den aktivierenden Ko-Rezeptoren gehören CD28 und CD27. Die untenstehende Abbildung verdeutlicht einige Rezeptor-Liganden Paare der Ko-Stimulation, welche bis heute bekannt sind. [1, 9, 10] Als drittes Signal werden Zytokine benötigt. Zu diesen gehören zum Beispiel Interleukin 1 (IL1), IL6, IL12 und einige weitere. Aber auch das autokrin produzierte IL2 fördert die Aktivierung der naiven T Zellen über die Bindung an seinen Rezeptor.

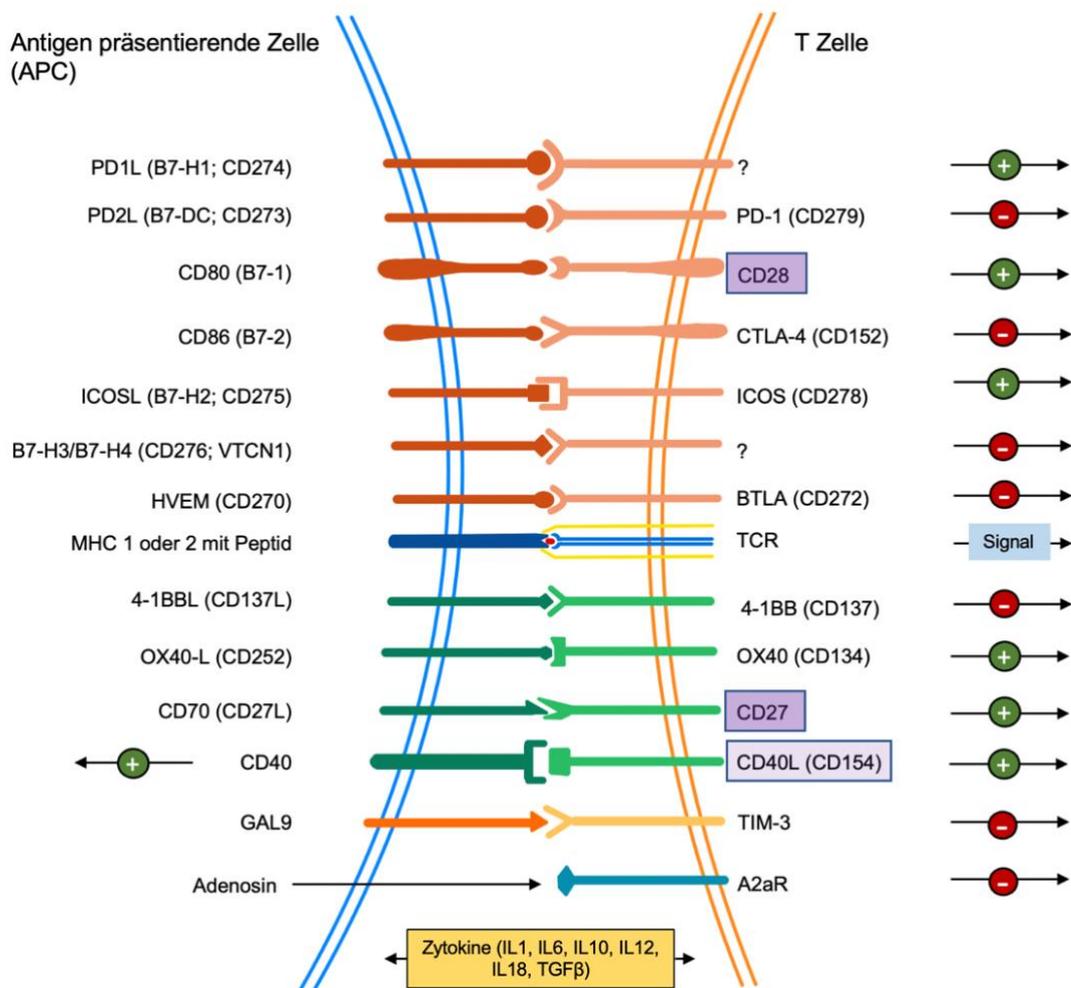


Abb. 1 Schematische Darstellung der diversen Ko-Rezeptoren und deren Bindungspartner

Mittig in der Abb. der TCR mit dem MHC und dem präsentierten Peptid. Inhibitorische Ko-Rezeptoren mit rot markiertem -, aktivierende Ko-Rezeptoren mit grün markiertem +. CD27 und CD28 als verwendete Ko-Rezeptoren in dunklem violett hinterlegt. CD40L in hellem violett hinterlegt, als Analyseparameter im Re-Stimulationsmodell unter 3.5.2 verwendet.

Quelle: Eigene Abbildung

Bei der Interaktion von T Zellen mit APCs findet eine Kreuzvernetzung der verschiedenen Rezeptoren und Ko-Rezeptoren statt. Diese führt zur gesteigerten Aktivierung der naiven T Zellen. [1] Die Kreuzvernetzung der Antikörper der T Zellen bei Kontakt mit APCs wurde mit Hilfe des *Coatings* der Well-Platten als *in-vitro* Modell nachgestellt. CD27 wurde als zusätzlicher Ko-Stimulator zum TCR (stimuliert über CD3-Antikörper) und CD28 verwendet.

Die Aktivierung naiver T Zellen kann über verschiedene Parameter gemessen werden. Zum einen findet nach der Aktivierung der T Zellen die Zytokinproduktion und -sekretion statt. Zum anderen verändern die T Zellen ihre Oberflächenmarker (Abb. 2).

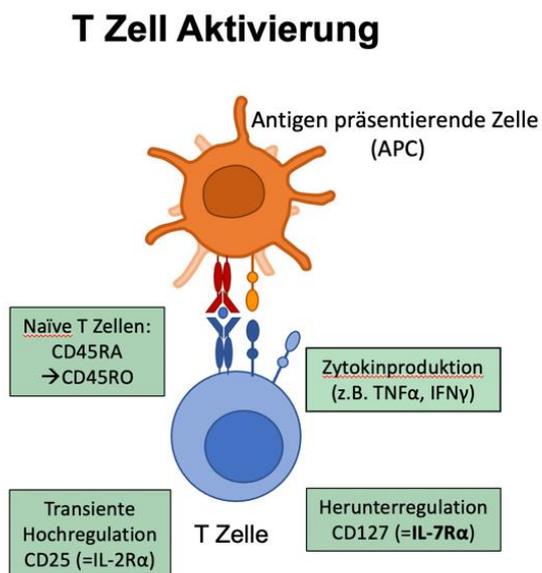


Abb. 2 Schematische Darstellung der T Zell Aktivierung

Aktivierung der T Zelle (blau) über den Kontakt zur APC (orange). Messbare Parameter der naiven T Zellen nach Aktivierung. (grün)

Quelle: Eigene Abbildung

T Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung eine Reihe an Zytokinen. Die Art der Zytokine ist abhängig von dem Subtyp der T Zellen (siehe 1.1). Zytotoxische CD8⁺ T Zellen können Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) produzieren. [4] Bei den T Helferzellen hat jeder Subtyp ein spezifisches Zytokinprofil. TH1 Zellen, TH2 Zellen und TH17 Zellen produzieren aktivierende Zytokine. Hierzu zählen auch die Zytokine TNF α und IFN γ . Mit Hilfe dieser Zytokine können weitere Immunzellen rekrutiert werden, um die Immunabwehr zu steigern. Die regulatorischen T Zellen produzieren ausschließlich supprimierende Zytokine. [1, 5, 11]

Ein weiterer Parameter der T Zell Aktivierung ist CD40L. Dieser kann nur auf aktivierten T Zellen gefunden werden. Es handelt sich um eine transiente Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche. CD40L gehört zu den frühesten Aktivierungsmarkern und kann bereits wenige Minuten nach TCR-Aktivierung der Zellen messbar sein. Eine weite Welle der CD40L Expression beginnt nach 1-2h, erreicht ihren Höhepunkt 6-8h und fällt anschließend wieder ab. [12, 13] In dieser Arbeit wurde der Rezeptor im Re-Stimulationsassay als Aktivierungsparameter gemessen.

1.3. T Zell Proliferation

Wie bereits in 1.2 beschrieben, produzieren naive T Zellen nach ihrer Aktivierung unter anderem IL2. Dies dient als autokrines oder parakrines Signal zur Proliferation der T Zellen. [14] IL2 bindet an den IL2R auf der Oberfläche der T Zellen. Die hierdurch aktivierte Signalkaskade fördert weiter die Aktivierung der T Zellen, sowie deren Überleben und Proliferation. Der IL2R existiert in 2 verschiedenen Formen: der hoch-affin bindende IL2R und der niedrig-affin bindende IL2R (Abb. 3). Der niedrig affine Rezeptor besteht aus der *common- γ chain* und dem IL2-R β (CD122). Der hoch affine Rezeptor besteht aus den gleichen Komponenten, enthält aber zusätzlich IL2R α (CD25). [15] Auf naiven T Zellen wird zu Beginn der niedrig-affine Rezeptor exprimiert. Nach ihrer Aktivierung wird nicht nur IL2 produziert, sondern auch die Expression von CD25 auf der Oberfläche hochreguliert. Auch die Stimulation mit IL2 selbst führt zur vermehrten Expression von CD25. [16] Die Expression von CD25 ist ein Parameter für eine aktivierte T Zelle. Bei der gesteigerten Expression von CD25 handelt es sich um einen transienten Mechanismus. Bleibt eine weitere Stimulation aus, so wird der Rezeptor wieder vermindert auf der Oberfläche präsentiert. [1, 6]

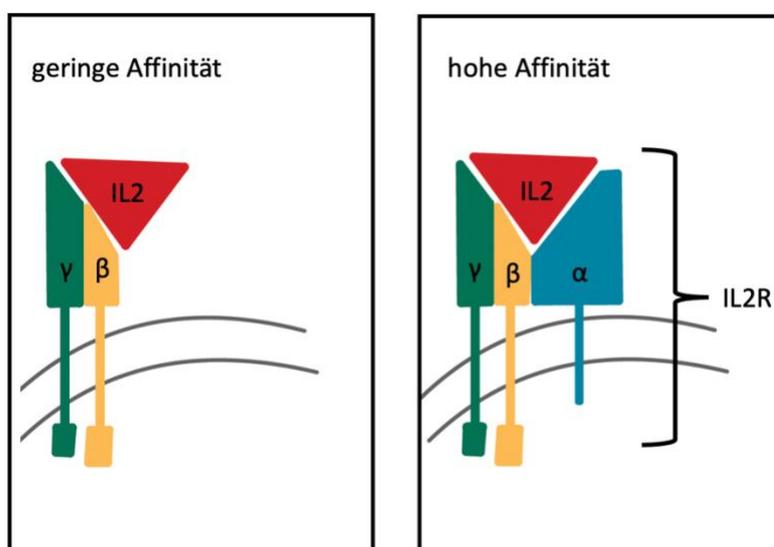


Abb. 3 Der IL2R in seinen zwei verschiedenen Formen

Schematische Darstellung des IL2R. Der niedrig affine Rezeptor besteht aus der *common- γ chain* (γ) und dem IL2R β (β). Der hoch affine Rezeptor mit zusätzlich IL2R α = CD25 (α).

Quelle: Eigene Abbildung

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Proliferation der naiven T Zellen nach ihrer Aktivierung ist das homöostatische Zytokinmilieu. Insbesondere IL7 spielt eine hier eine Rolle. Das Zytokin bindet an den IL7R auf der Oberfläche der T Zellen. [17, 18]

Der IL7-Rezeptor ist ein heterodimerer Rezeptor. Er besteht aus dem IL7R α (=CD127) und der *common- γ chain* (Abb. 4). Nach der Bindung des Substrates an den Rezeptor der T Zelle, wird die Jak/STAT-Signalkaskade (*Januskinase/ Signal transducer and activator of transcription*) aktiviert. [19, 20] Über die gesteigerte Synthese anti-apoptotischer Proteine wird das Überleben und die Proliferation der T Zellen gefördert. [17] Die Stimulation mit IL7 fördert außerdem die Zytokinproduktion der aktivierten Effektorzellen und steigert die Sensitivität der T Zellen für weitere Stimuli. [21, 22]

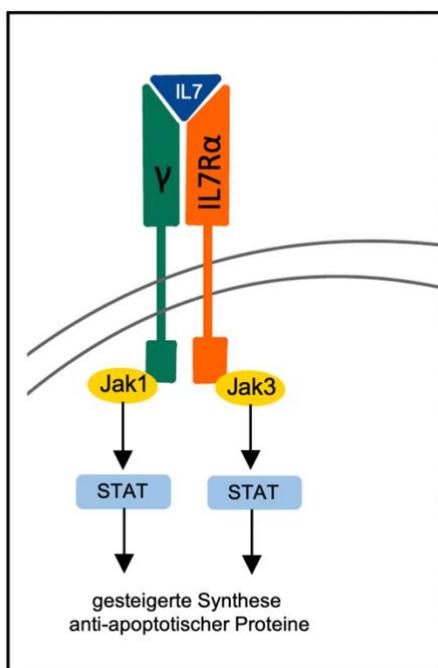


Abb. 4 **Der IL7 Rezeptor als heterodimerer Rezeptor**

Schematische Darstellung des Rezeptors bestehend aus der *common- γ chain* (γ) und dem IL7R α . Aktivierung des Signalweges (Jak/STAT) nach Bindung von IL7. Gesteigerte Synthese von anti-apoptotischen Proteinen auf zellulärer Ebene, wodurch das Überleben und die Proliferation der Zellen gefördert werden.

Quelle: Eigene Abbildung

IL7 wird hauptsächlich von Stromazellen produziert. Da die Zytokinproduktion wenigen extrinsischen Kontrollmechanismen unterliegt, wird der Effekt von IL7 auf T Zellen vor allem durch die Expression des IL7R α reguliert. Diese Regulation erfolgt über verschiedene Mechanismen. Als Teil des IL7-Signals nach Bindung an den IL7R erfolgt die Endozytose des membrangebundenen Rezeptors (mIL7R α), welcher im Anschluss entweder degradiert oder wieder zurück an die Oberfläche transportiert wird. [23] Ein weiterer Kontrollmechanismus erfolgt auf Transkriptionsebene, wo verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel IL7 selbst, zur verminderten Expression der IL7R α mRNA führen. [24] Durch alternatives Spleißen kann außerdem ein löslicher IL7R α (sIL7R α) entstehen, welcher dann im Blut zirkuliert und niedrig-affin an IL7 binden kann. Das an sIL7R α gebundene IL7 kann somit nichtmehr an den Rezeptor auf T Zellen binden. [25]

1.4. T Zell Differenzierung

Nach der Aktivierung und Expansion naiver T Zellen differenzieren diese sich weiter. Sie können entweder zu kurzlebigen Effektor T Zellen werden oder sich direkt zu Gedächtnis T Zellen weiterentwickeln. Die unterschiedlichen Gruppen lassen sich anhand verschiedener Oberflächenmarker trennen. [5, 7]

Ein Differenzierungsmarker der T Zellen ist CD45RA und -RO. Der Rezeptor ist eine Protein-Tyrosin Phosphatase, welche auf allen Leukozyten im Menschen vorhanden ist. [26] Es handelt sich bei CD45RA/-RO um verschiedene Isoformen eines Rezeptors. Diese entstehen durch alternatives Spleißen. [27] Naïve T Zellen exprimieren initial CD45RA auf ihrer Oberfläche. Nach der Aktivierung durchläuft der Rezeptor den Spleiß-Mechanismus und wird durch CD45RO ersetzt. [27, 28] CD45RO befindet sich auf Effektor T Zellen und Gedächtnis T Zellen, wobei Gedächtnis T Zellen zur CD45RA-Expression zurückkehren können. [29] Ebenfalls unterschiedlich ist die Expression des IL7R α . Naïve T Zellen exprimieren nach Verlassen des Thymus in die periphere Blutbahn einen hohen Anteil an IL7R α . [30] Die Aktivierung der T Zellen über den TCR führt zur verminderten Expression des IL7R α . Effektor T Zellen exprimieren wenig bis keinen IL7R α auf ihrer Oberfläche. Bei einer Differenzierung zu Gedächtnis T Zellen wird der Rezeptor auf den T Zellen re-exprimiert. Im *in vitro* Modell kann eine Re-Expression des IL7R α mehrere Tage nach Beenden der TCR-Stimulation auf den T Zellen beobachtet werden. Die Stimulation mit dem Substrat IL7 über seinen Rezeptor führt ebenfalls zur Regulierung der Rezeptorexpression. Hier zeigt sich jedoch bereits innerhalb weniger Stunden nach Beenden der Stimulation eine Re-Expression an der Zelloberfläche. [31, 32]

Die Messung der CD45 Isoformen auf der Oberfläche der Zellen diente zur initialen Bestimmung des Anteils der naiven T Zellen in der Zellpopulation. Hierdurch konnte ebenfalls der Erfolg der Isolation naiver T Zellen zu Beginn der Stimulationsmodelle verifiziert werden. Im Verlauf wurden die CD45 Isoformen verwendet, um eine Aktivierung und Differenzierung der T Zellen beobachten zu können. CD25 und der IL7R α wurden in dieser Arbeit primär als Aktivierungsmarker der T Zellen gemessen. Eine verminderte Expression des IL7R α und eine gesteigerte Expression von CD25 sind Marker für eine Aktivierung und eine Differenzierung der T Zellen.

1.5. CD27

Cluster of differentiation 27 (CD27) ist ein Oberflächenprotein und zählt zu der TNF-R (Tumornekrosefaktor-Rezeptor) Familie. Er wird auf einem Großteil der Zellen des Immunsystems exprimiert. Insbesondere naïve T Zellen exprimieren den Rezeptor hochfrequent. CD27 wird nach Aktivierung des TCR naiver T Zellen hochreguliert. Die

Aktivierung der Zellen führt zu mehrfacher Teilung und Proliferation der Zellen. Nach anhaltender Aktivierung der T Zellen wird der Rezeptor über proteolytische Spaltung von der Oberfläche der T Zellen entfernt. Er ist nach der Spaltung als löslicher CD27 (sCD27) im Blut nachweisbar und wird weniger bis nichtmehr auf der Oberfläche der T Zellen exprimiert. [33-35] Während Effektor T Zellen kaum bis kein CD27 auf ihrer Oberfläche präsentieren, wird dieser auf Gedächtnis T Zellen wieder höherfrequent exprimiert. Die Ausprägung des Rezeptors variiert somit für die verschiedenen T Zell Populationen und ist zudem von deren Aktivierungsstatus abhängig. [36]

Der einzige bekannte *in vivo* Ligand von CD27 ist CD70, welcher zur TNF-Familie gehört. Dieser wird streng reguliert und nur vorübergehend auf B Zellen, T Zellen und dendritischen Zellen nach ihrer Aktivierung exprimiert. [37] Die Expression des CD27-Liganden wird zudem durch das Zytokinmilieu beeinflusst. So können IL2, IL12 oder TNF α den Liganden auf der Zellmembran hochregulieren, während IL10 und IL4 zu einer verminderten Expression an der Oberfläche führen. Da CD27 vielseitig exprimiert wird, begrenzt CD70 als einziger Bindungspartner *in vivo* durch seine begrenzte Verfügbarkeit die Rezeptor-Liganden Interaktion. [38, 39]

1.5.1. Funktion von CD27 auf T Zellen

CD27 ist ein Ko-Rezeptor des TCR. Bei alleiniger Stimulation von CD27 ist kein Effekt auf T Zellen nachweisbar. Für die Beurteilung des Effekts von CD27 auf T Zellen ist demnach eine zeitgleiche Stimulation des TCR nötig. [40] Die Ko-Stimulation von CD27 führt zu einer deutlich gesteigerten Anzahl an überlebenden T Zellen im *in vitro* Modell. [41] Dieser Effekt lässt sich am ehesten auf eine günstige Auswirkung auf das Überleben der T Zellen und nicht eine Steigerung der Proliferationsrate zurückführen. Die Ko-Stimulation von CD27 führt zur vermehrten Expression anti-apoptotischer Proteine wie zum Beispiel BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) in den T Zellen. Zusätzlich werden Apoptose-fördernde Faktoren wie FAS-L durch die Ko-Stimulation eingeschränkt. Durch diese Mechanismen wird das Überleben der T Zellen gefördert. [42, 43] Ein weiterer Effekt der CD27 Ko-Stimulation lässt sich bei der Entwicklung von Gedächtnis T Zellen beobachten. Dong et al. zeigten, dass die direkte Stimulation von CD27 zu einer vermehrten Generation von CD8⁺ Gedächtnis T Zellen führt. Eine Blockade der Interaktion mit CD70 hingegen beeinträchtigte sowohl die Entstehung als auch die Funktion von Gedächtnis T Zellen. [44] Dies ist zurückzuführen auf die gesteigerte Re-Expression des IL7R α durch eine späte Stimulation von CD27. Über die Interaktion des IL7R α mit IL7 wird die Formierung von Gedächtnis T Zellen gesteigert. [45] Die CD27-CD70 Interaktion fördert außerdem die Differenzierung der naiven T Zellen zu Effektor T Zellen. Sie werden dadurch befähigt eine Vielzahl an Zytokinen zu produzieren wie zum Beispiel IFN γ , TNF α , und IL2. [46]

1.6. Immunpathologie der Tuberkulose

Die Infektion mit *M. tuberculosis* beginnt meist über die Inhalation infektiöser Aerosole von Patienten mit einer offenen Tuberkulose. [47] Bei einer offenen Tuberkulose handelt es sich um die aktive Form, welche ansteckend ist. Die Aerosole werden beim Sprechen oder Husten der infizierten Patienten freigesetzt. Bereits eine geringe Anzahl von Bakterien im Aerosol reicht für eine mögliche Infektion aus. [48] Die Bakterien wandern nach der Inhalation in die Alveolen und treffen dort auf alveoläre Makrophagen. Die Pathogene werden über *Toll-like* Rezeptoren der Makrophagen erkannt und phagozytiert. Die Makrophagen sekretieren daraufhin proinflammatorische Zytokine wie IL12, TNF α und IL6. Durch die Freisetzung dieser proinflammatorischen Zytokine werden weitere Immunzellen, wie auch T Zellen, rekrutiert. [49]

Nach einer neuen Infektion mit dem Bakterium entwickeln nur ungefähr 5-10% der Immunkompetenten eine klinisch relevante Tuberkulose, welche behandelt werden muss. [50, 51] Die Latenzzeit kann in diesem Fall mehrere Wochen bis Jahrzehnte andauern. [52, 53] Bei dem Großteil der immunkompetenten Patienten führt die adäquate Immunreaktion zur Abkapselung des Erregers in Form eines Granuloms. Diese Entwicklung wird als latente Infektion mit *M. tuberculosis* bezeichnet (LTBI). Die Patienten sind asymptomatisch und nicht infektiös. Jedoch kann die latente Tuberkulose noch Jahrzehnte später, zum Beispiel im Rahmen einer Immunsuppression, reaktiviert werden und sich zu einer aktiven Tuberkulose entwickeln. Das Lebenszeitrisiko hierfür beträgt ungefähr 5-10%. [51, 54]

1.7. Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine chronisch infektiöse Erkrankung. Der häufigste Erreger der Tuberkulose ist *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Dieses Bakterium wurde 1882 von Robert Koch erstmalig isoliert und als Erreger der Erkrankung identifiziert. [55] *M. tuberculosis* gehört zur Erregergruppe des Mycobacterium-tuberculosis-Komplexes. [56] Die Tuberkulose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit. Ungefähr ein Viertel der Weltbevölkerung ist mit dem Bakterium *M. tuberculosis* infiziert. Nach COVID-19 ist die Tuberkulose global betrachtet aktuell die führende infektiöse Todesursache. Im Jahr 2020 sind ungefähr 1,5 Millionen Menschen an Tuberkulose verstorben, was die Zahl der Toten durch das Human Immundefizienz-Virus (HIV) um das Doppelte übersteigt. [57] Im Gegensatz zu den Hochinzidenzgebieten Südostasien und Afrika, ist die Inzidenz in Deutschland seit 2017 rückläufig und betrug 2020 5:100 000. [58]

1.8. Die Rolle von T Zellen bei Infektion mit *M. tuberculosis*

CD4⁺ T Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Prävention einer Primärinfektion sowie in der Reaktivierung der Tuberkuloseinfektion. Dies wird deutlich, da eine verminderte Anzahl von CD4⁺ T Zellen in HIV-Erkrankten das Risiko einer aktiven Tuberkulose und der Reaktivierung

einer LTBI deutlich erhöhte. [59] Stimulierte CD4⁺ T Zellen aktivieren über die Produktion von Zytokinen, insbesondere IFN γ , Makrophagen. Die Abwesenheit von IFN γ in genveränderten Mäusen führte nach Exposition mit *M. tuberculosis* zu einem rasch endenden tödlichen Verlauf der Infektion. [60] Die aktivierten CD4⁺ T Zellen fördern außerdem die Funktion von CD8⁺ T Zellen. Die zytotoxischen CD8⁺ T Zellen können über die Sekretion von Granzym und Perforin mit dem Bakterium infizierte Zellen lysieren und somit direkt die *M. tuberculosis* Infektion eindämmen. [61] Die T Zellen sind außerdem an der Bildung der Granulome beteiligt und somit für die Eindämmung der Infektion mitverantwortlich. [62]

Bei chronischen Infektionen, wie zum Beispiel mit *M. tuberculosis*, konnte eine Erschöpfung von sowohl CD4⁺ T Zellen als auch CD8⁺ T Zellen beobachtet werden. [63] Eine dauerhafte Antigenpräsentation auf den infizierten Makrophagen führte zur Dysfunktionalität der T Zellen. Die T Zellen veränderten ihre Oberflächenrezeptoren. Die Zellen exprimierten IL7R α vermindert und im Gegensatz dazu inhibitorische Proteine vermehrt auf ihrer Oberfläche. Zusätzlich wiesen die Zellen ein pro-apoptisches Expressionsmuster auf. Es ließ sich eine verminderte Expression von Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) nachweisen. Bcl-2 gilt als anti-Apoptose Protein und reguliert somit den programmierten Zelltod. Zusätzlich zeigten die Zellen eine vermehrte Expression pro-apoptischer Proteine wie Fas (CD95). [64] Außerdem konnte eine beeinträchtigte Funktion der T Zellen festgestellt werden. Dies zeigte sich in einer verminderten Zytokinproduktion und einer reduzierten Fähigkeit Gedächtnis T Zellen zu bilden. Auch die Effektorfunktion der T Zellen ging mit der Erschöpfung durch chronische Aktivierung verloren. Durch das verminderte Proliferationspotential durch die Expression Apoptose-begünstigender Proteine und die eingeschränkte Funktionalität der T Zellen kann man von einer Dysfunktionalität der T Zellen in Tuberkulosepatienten ausgehen. [64, 65]

Im Blut von Patienten mit einer aktiven Tuberkulose konnten weitere spezifische Veränderungen der Immunantwort festgestellt werden. Harling et al. wiesen im Blut von Tuberkulosepatienten im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Konzentration von IL6 und IL10 nach. [66] Über die Bindung an Ihre Rezeptoren (IL6-R und IL10-R) aktivieren sie die Jak-STAT-Signalkaskade in T Zellen. Dies führt über die Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT3 zur Induktion einer vermehrten Expression von SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*). [67] Eine vermehrte Konzentration von SOCS3 konnte ebenfalls im Blut von TB-Patienten detektiert werden. Die vermehrte Expression des inhibitorischen Proteins SOCS3 korrelierte mit einer verminderten T Zell Aktivierung und IFN γ -Produktion. Die Veränderung des Zytokinmilieus bei TB-Patienten führte somit zur Beeinträchtigung der T Zell Aktivität und trägt zur Immunpathogenese der Tuberkulose bei. [66]

1.9. IL7R und Tuberkulose

Nach der Infektion mit einem Pathogen startet eine Reihe von Abwehrkaskaden durch das Immunsystem. Makrophagen produzieren unter anderem vermehrt IL7, welches die zelluläre Immunantwort fördert. [68] IL7 kann an den IL7R auf T Zellen binden und die Effektorfunktion der T Zellen, sowie deren Überleben und das Formen von Gedächtnis T Zellen fördern. Pellegrini et al. haben gezeigt, dass die Zugabe von IL7 die durch chronische Infektion hervorgerufene Erschöpfung der T Zellen aufheben kann und die T Zell Funktion sich anschließend wieder verbessert. [22] Damit einhergehend konnte im Mausmodell dargestellt werden, dass die Applikation von IL7 nach Infektion mit *M. tuberculosis* das Überleben der Tiere signifikant steigert. [69] Für den Effekt von IL7 auf die T Zellen ist die Expression des IL7R auf der Oberfläche entscheidend, damit das Zytokin daran binden kann und die Signalkaskade startet. [31]

Lundtoft et al. zeigten für IL7 und seinen Rezeptor spezifische Veränderungen im Blut von Tuberkulosepatienten. Sie stellten einen erhöhten IL7-Spiegel im peripheren Blut fest. Im Gegensatz dazu waren sowohl der mL7R auf den T Zellen als auch der freie sIL7R reduziert. Die verminderte Expression des mL7R auf der Oberfläche der T Zellen führte zu einer geringeren Bindung von IL7. Folglich war der Effekt von IL7 auf die Zellen vermindert und auch die IL7 abhängige Zytokinfreisetzung gestört. Die verminderte IL7R Expression im Blut von Patienten mit Tuberkulose wurde als Ausdruck einer pathologischen T Zell Immunität erklärt. Dies beschriebenen Veränderungen normalisierten sich unter Therapie und nach Genesung wieder auf das Niveau der gesunden Kontrollprobanden. [70]

1.10. CD27 im Zusammenhang mit Tuberkulose

Die genaue Rolle von CD27 in der Pathogenese der Tuberkulose ist nicht abschließend geklärt. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits auf einen Einfluss des Rezeptors in der Immunpathogenese hingewiesen. Die Dauerstimulation von T Zellen durch anhaltende Antigenpräsentation *in vivo* führte zum Verlust des CD27 Rezeptors an der Zelloberfläche und zur Differenzierung der Zellen. [71] Die Zellen exprimierten nach Aktivierung nicht nur vermindert CD27 an der Oberfläche, sondern wiesen auch ein reduziertes Proliferationspotential und eine geringere Produktion von IFN γ verglichen mit CD27⁺ T Zellen auf. Zudem konnten Jiang et al. eine Korrelation von einer reduzierten Menge an CD27⁺ T Zellen im Blut mit einer persistierenden aktiven Tuberkulose feststellen. [72]

Nikita et al. unterstützen mit ihren Resultaten diese Thesen. Sie konnten im Blut von Tuberkulosepatienten einen vermehrten Anteil CD27⁻ T Zellen verglichen mit gesunden Patienten nachweisen. Außerdem fanden sie eine Assoziation von einem erhöhten Anteil an CD27⁻ T Zellen zu einer vermehrten Destruktion des Lungengewebes von

Tuberkulosepatienten. [73] Diese Ergebnisse decken sich damit, dass CD27⁻ T Zellen weniger Zytokine produzieren sowohl bei der primären und als auch bei der sekundären Immunantwort. Die geringere Verfügbarkeit von Zytokinen führt zu einer verminderten Aktivierung der Makrophagen und ermöglicht daher eine erhöhte Pathogenaktivität. [64]

Einen verminderten Anteil an CD27⁺ T Zellen im Blut von Tuberkulosepatienten wiesen auch Adankwah et al. nach. Hierbei konnte nicht nur eine insgesamt verminderte Expression von CD27 beobachtet werden, sondern auch eine verminderte Expression des Rezeptors auf den einzelnen CD27^{high} exprimierenden T Zellen. Dieser Unterschied war in den Experimenten der Arbeitsgruppe sensitiver als das IFN γ -Release Assay (IGRA), welches das aktuelle Standardverfahren zum indirekten Erregernachweis darstellt. Mit Hilfe der Bestimmung der CD27⁺ T Zellen konnten infizierte Patienten mit negativem IGRA identifiziert werden. [74, 75]

Auf der anderen Seite wurden im Mausmodell Ergebnisse dargestellt, die diesen Thesen entgegenstehen. Es zeigte sich ebenfalls eine Herunterregulation des CD27-Rezeptors nach Aktivierung der T Zellen. Jedoch ließen sich die CD27⁻ T Zellen hier mit einer vergrößerten IFN γ -Produktion assoziieren. Die Akkumulation von CD27⁻ Zellen in der Lunge von Tuberkulose infizierten Patienten korrelierte im Experiment mit einem schützenden Effekt vor einer letalen Tuberkulose. Die Differenzierung von CD27^{high} exprimierenden T Zellen zu CD27^{low} exprimierenden T Zellen wurde somit als Aktivitätsparameter der T Zellen identifiziert. [76]

1.11. Zielsetzung der Arbeit

Bei Patienten mit aktiver Tuberkulose lassen sich Veränderungen der Immunantwort nachweisen. Insbesondere bei Betrachtung der T Zellen konnte eine beeinträchtigte T Zell Funktion beobachtet werden. [66, 70] Zudem wurde gezeigt, dass auf den T Zellen der Tuberkulosepatienten sowohl CD27 als auch der IL7R α vermindert exprimiert werden. [70, 72] Da die verminderte Expression von CD27 auf den T Zellen bei Patienten mit aktiver Tuberkulose vermutlich eine Rolle in der Immunpathogenese spielt, stellt dies den thematischen Hintergrund dieses Projektes dar. Die Rolle von CD27 als Ko-Rezeptor auf den T Zellen und die Auswirkungen der Ko-Stimulation auf die Funktionalität der Zellen sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Das Ziel war es, in verschiedenen Ansätzen den unterschiedlichen Einfluss der CD27 Ko-Stimulation auf die Aktivierung der T Zellen, deren Zytokinproduktion sowie die Expression des IL7R α näher zu untersuchen. Es sollte überprüft werden, ob ein kausaler Zusammenhang der beeinträchtigten CD27 und IL7R α Expression in Tuberkulosepatienten vorliegt. Um die Fragestellung zu beantworten, wurden *in vitro* Experimente mit PBMCs und isolierten naiven T Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern durchgeführt. Es wurde die

Zytokinproduktion sowie die Expression der Oberflächenmarker der T Zellen in verschiedenen Stimulationsmodellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Es wurde ein „two-hit“ Re-Stimulationsansatz durchgeführt, um Auswirkungen auf das Reaktivierungspotential der T Zellen zu beurteilen. Außerdem wurde ein Transduktionsansatz an naiven T Zellen mittels shRNAs durchgeführt, um die Expression von CD27 an der Oberfläche zu reduzieren. Dies erfolgte zur Darstellung der Auswirkung einer verminderten Ko-Expression des CD27 Rezeptors auf die T Zell Funktion. Diese verschiedenen Vorgehensweisen erlauben die *in-vitro* Analyse unterschiedlicher Parameter und Stadien der initialen Aktivierung sowie der Re-Aktivierung der T Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen umfassenden Einblick in die Funktionen von CD27 als Ko-Rezeptor und mögliche Auswirkungen einer verminderten Expression auf dysfunktionalen T Zellen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Laborgerät	Lieferant, Standort
BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer	BD, Heidelberg
Cryo-Einfriercontainer	Nalgene, Langenselbold
CO ₂ -Inkubator (Brutschrank)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
EasySep™ Magnet	Stemcell, Köln
Mehrkanalpipetten (30µl, 300µl)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA Starlab, Hamburg
Mikroskop OLYMPUS CK40	OLYMPUS, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson Inc., Middleton, USA Starlab, Hamburg
Pipettierhilfe (PIPETBOY accu)	Integra Biosciences, Fernwald
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Mülheim a.d.R.

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Lieferant, Standort
Abdeckplatten steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS-Röhrchen (5 ml Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
FALCON™-Röhrchen (50 ml, 15ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Handschuhe, Nitril MICRO-TOUCH®	Ansell, München
Kanülen	Braun, Melsungen
Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025mm ²)	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Parafilm® M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipetten Stripette® (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., Corning, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen	Starlab, Hamburg
Reservoirs unsteril/steril	Starlab, Hamburg
Vacutainer® Lithium-Heparin Plasmaröhrchen (6 ml)	BD, Heidelberg
Zellkulturplatten (Rundboden; 96-Well) (Flachboden; 96-Well; unbeschichtet)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Lieferant, Standort
Ampuwa Aqua destillata	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacillol® AF Flächendesinfektion	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Bovine Serum Albumin Solution (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Fixationspuffer	BioLegend, Fell
HEPES Buffer Solution (1M)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Histopaque®-1077	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kodan® Tinktur forte	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10.000 IU/ml; 10mg/ml)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Perm&Wash (Permeabilisationspuffer) 10x	BioLegend, Fell
Rectronectin	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Trypanblau Färbung 0,4%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
X-VIVO 15 (serum-free haematopoetic cell medium)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Viabilitätsfarbstoff eFluor® 780	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.1.4. Antikörper

Alle Antikörper (AK) sind gegen humane Antigene gerichtet. Außer der CD27-AK, welcher im armenischen Hamster generiert wurde, sind alle AK in Mäusen generiert worden.

Antikörper	Markierung	Klon	Lieferant, Standort
Anti-CD4	PE/Cy7	RPA-T4	BioLegend, Fell
Anti-CD4	BV510	OKT4	BioLegend, Fell
Anti-CD8	PerCP/Cy5.5	HIT8a	BioLegend, Fell
Anti-CD8	PE-CF594	RPA-T8	BD, Heidelberg
Anti-CD25	BV711	M-A251	BioLegend, Fell
Anti-CD45RA	BV711	HI100	BioLegend, Fell
Anti-CD45A	FITC	HI100	BioLegend, Fell
Anti-CD45RO	BV711	UCHL1	BioLegend, Fell
Anti-CD127	PE	A019D5	BioLegend, Fell
Anti-CD154	PE	24-31	BioLegend, Fell
Anti-IFN- γ	FITC	B27	BD, Heidelberg
Anti-TNF- α	AF700	MAb11	BD, Heidelberg
Anti-CD3	-	OKT3	BioLegend, Fell
Anti-CD27	-	LG.3A10	BioLegend, Fell
Anti-CD28	-	CD28.2	BioLegend, Fell
Ig κ -light chain	-	RG77.6	BD, Heidelberg
Viability Dye	eFluor 780		ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5. Stimulantien

Stimulus	(END?) Konzentration	Lieferant, Standort
Dynabeads	4 x 10 ⁷ beads/ml	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Brefeldin A	1 mg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Interleukin 7	1 mg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.1.6. Kits

Kit	Lieferant, Standort
EasySep™ Human Naive Pan T Cell Isolation Kit	BD, Heidelberg
Mission® shRNA Bacterial Glycerol Stock SHCLNG, 08112011MN	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.1.7. Medien und Lösungen

Medium/Lösung	Bestandteile	Endkonzentrationen
Isolationsmedium	FCS	2%
	EDTA	1 mM
	PBS	ad
X-VIVO + P/S	Penicillin	1%
	Streptomycin	1%
	X-VIVO	ad
Permeabilisationspuffer 1fach	Perm&Wash 10x	10%
	H ₂ O	ad
FACS Puffer	FCS	2%
	PBS	ad
Einfriermedium	DMSO	20%
	FKS	ad
Blocking-Lösung	BSA	2%
	PBS	ad
Waschlösung (Transduktion)	HEPES	2,5%
	HBS	ad

2.1.8. Spenderzellen

Die Experimente wurden mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus Vollblut von gesunden Spendern durchgeführt. Für den Großteil der Experimente wurden diese weiter zu naiven T Zellen aufgearbeitet. Das Vollblut stammte aus der Blutspendezentrale der Universitätsklinik Düsseldorf. Die Einwilligung der Spender lag nach schriftlicher Aufklärung stets vor (Ethikvotum 5445). Die Blutproben wurden innerhalb 1 Stunde nach Ankunft im Labor weiterverarbeitet.

2.1.9. Software

Software	Lieferant, Standort
BD FACSDiva v6.0	BD, Heidelberg
FlowJo™ v10	FlowJo, Ashland, USA
Goodnotes 5 for iPad	Time Base Technology Limited, London, UK

Graphpad Prism v9	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Microsoft Excel for Mac 2021	Microsoft Corporation, USA
Microsoft PowerPoint for Mac 2021	Microsoft Corporation, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von PBMCs aus dem Vollblut

Die Isolation der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) erfolgte aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtezentrifugation (Histopaque-1077, Sigma Aldrich) nach Anleitung des Herstellers. Es wurden je nach Verfügbarkeit entweder 60ml *buffy coat* aus der Blutspendezentrale der Universität Düsseldorf oder 75ml Vollblut von gesunden Spendern verwendet. Im ersten Schritt wurde das Vollblut im Verhältnis 1:1 mit D-PBS verdünnt und dann je 35 ml der Blutsuspension auf 15 ml Histopaque®-Lösung geschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit minimaler Akzeleration und Dezeleration der Zentrifuge für 30 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die PBMCs, welche sich als weißlicher Ring zwischen dem Histopaque® und dem Plasma darstellen, wurden vorsichtig entnommen und in ein neues Röhrchen überführt. Erneut wurden die Zellen 1:1 mit kaltem D-PBS verdünnt und für 20 min bei 4°C und 1200 rpm mit maximaler Akzeleration und Dezeleration zentrifugiert. Daraufhin waren die PBMCs als Pellet am Boden des Röhrchens erkennbar. Der Überstand wurde dekantiert und das überbleibende Pellet in 1 ml kaltem D-PBS ohne Schaumbildung resuspendiert. Nach der Zugabe von weiteren 10 ml D-PBS wurden die Zellen bei 4°C und 1200 rpm für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder dekantiert und die Zellen zur anschließenden Zellzahlbestimmung je nach Menge des Vollbluts in 2-10 ml D-PBS resuspendiert.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl fand mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer statt. Hierzu wurden 5 µl der PBMC-Suspension mit 195 µl Trypanblau (1:10 verdünnt) gemischt und kräftig resuspendiert. Daraus ergab sich ein Verdünnungsverhältnis von 1:40. Das Trypanblau dient als Viabilitätsmarker. Der Farbstoff bindet an zelluläre Proteine, kann aber die Zellmembran nicht überschreiten. So werden nur avitale Zellen, deren Zellmembran nicht intakt ist, von der Trypanblau-Lösung blau markiert. Lebende Zellen schließen den sauren Farbstoff aus und erscheinen im Mikroskop weiß vor einem dunkelblauen Hintergrund. Im Anschluss wurden

10 µl der Trypanblau-PBMC-Suspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Anzahl der PBMC insgesamt ließ sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$\text{Gezählte Zellen (in allen 4 Quadranten)} \times 10^5 = \text{Zellzahl / ml}$$

Mittels der folgenden Formel ließ sich die benötigte Menge der Suspension in ml für die folgenden Experimente berechnen:

$$\frac{\text{benötigte Zellzahl}}{\text{gezählte Zellen / ml}} = \text{ml welche die gewünschte Zellzahl enthalten}$$

2.2.3. Isolation von naiven T Zellen aus PBMCs

Die Isolation der naiven T Zellen erfolgte durch negative magnetische Zellauswahl mittels des *EasySep™ Human Naive Pan T Cell Isolation Kit* (BD Bioscience). Dieses Kit enthält einen *Selection Cocktail*, einen *Depletion Cocktail* und *RapidSpheres™*. Mit Hilfe dieser Reagenzien können in wenigen Schritten naive T Zellen aus einer PBMC-Suspension isoliert werden. Zunächst wurden 5×10^7 PBMC aus der zuvor isolierten PBMC-Suspension entnommen und anschließend bei 4°C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet aus PBMCs am Boden des Röhrchens in 250 µl des Isolationsmediums gelöst. Die Suspension wurde dann in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit je 25 µl des *Selection Cocktail* und des *Depletion Cocktail* des Kits vermischt. Der *Selection Cocktail* enthält monoklonale Antikörper in PBS. Der *Depletion Cocktail* enthält monoklonale Antikörper in PBS und 0,1% BSA, sowie Fc-Rezeptor blockierende Antikörper. Mit Hilfe dieser Kits wurden die nicht benötigten Zellen mit Antikörpern markiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 25 µl der *RapidSpheres™* aus dem Isolations-Kit hinzugegeben, worauf eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min folgte. Die *RapidSpheres™* sind magnetische Partikel, welche an die mit Antikörpern des *Selection Cocktail* und des *Depletion Cocktail* markierten Zellen binden. Das FACS-Röhrchen wurde nach der Inkubation auf eine Gesamtmenge von 2,5 ml aufgefüllt, resuspendiert und für 2,5 min in den Magneten gesteckt. Der Inhalt des Röhrchens wurde nach Ablauf der Inkubationszeit, während es sich noch in dem Magneten befand, in ein neues FALCON™ Röhrchen gekippt. So konnte die mit naiven T Zellen angereicherte Suspension überführt werden, während die übrigen mit magnetischen Partikeln markierten Lymphozyten im FACS-Röhrchen am Magneten haften blieben. Vor der Weiterverwendung wurden die naiven T Zellen bei 4°C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und dann in 1 ml X-VIVO + P/S-Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt, bevor die Zellen gezählt wurden. Die Zählung erfolgte nach der gleichen Methode wie die PBMC-Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer (2.2.2).

2.2.4. Messung der Reinheit der naiven T Zellen

Um den Erfolg der Isolation der naiven T Zellen zu überprüfen, wurde im Anschluss an den in 2.2.1-2.2.3 beschriebenen Prozess die Reinheit der isolierten Zellen überprüft. Die Zellen wurden unstimuliert auf eine 96-Well Platte gegeben. Je zwei Wells wurden mit 100.000 der naiven T Zellen in X-VIVO + P/S-Medium und zwei Wells mit 100.000 Zellen der PBMCs in PBS befüllt. Im Anschluss daran wurden die Antikörper (Tabelle 1) zu den Zellen gegeben und nach reichlicher Re-Suspension für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Messung erfolgte nach der Inkubation mit Hilfe des Durchflusszytometers. In allen Experimenten wurden die naiven T Zellen mit einer Reinheit von >95% weiterverwendet.

Oberflächenmarker	Konjugat	Menge in µl/ Well
CD 4	PE/Cy7	0,5
CD 8	PE/CF594	0,5
CD45RO	BV711	0,5
CD45RA	FITC	0,5
Via (1:5)	e780	0,5

Tabelle 1 Antikörper zur Reinheitsbestimmung naiver T Zellen

2.2.5. Antikörper Coating

Beim *Coating* (Beschichten) der 96-Well Platten werden die löslichen Antikörper durch physikalische Wechselwirkungen am Boden der Platten gebunden. Da die Zellen mit der Zeit ebenfalls auf den Boden der Platten sinken, treffen sie dort auf eine hohe Dichte an Antikörpern, die sie binden können. Dadurch kann ein *Cross-Linking* der Oberflächenrezeptoren auf den T Zellen stattfinden (Abb. 5).

Das Beschichten der 96-Well Rundbodenplatten erfolgte mit einer Gesamtmenge von 50 µl pro Well, wobei 25 µl des CD27-Antikörpers (AK) (Konzentrationen von 0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml und 1,25 µg/ml) und je 12,5 µl des CD3-AK in einer Konzentration von 0,5 µg/ml und CD28-AK in einer Konzentration von 0,25 µg/ml verwendet wurden. Die verschiedenen Konzentrationen der AK wurden im Voraus in X-VIVO + P/S-Medium vorbereitet. Nach Zugabe der AK wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

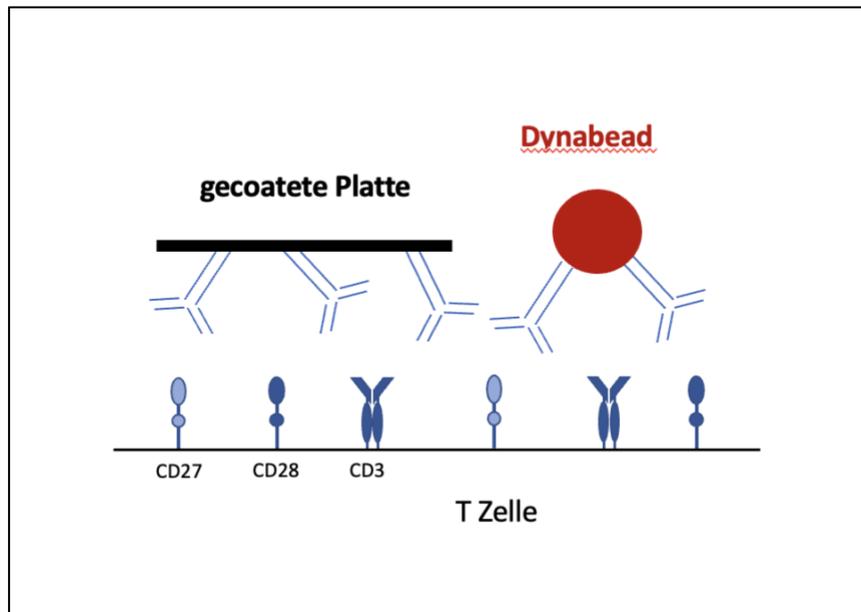


Abb. 5 Schematische Darstellung des Coatings.

Antikörper befinden sich durch physikalische Wechselwirkungen am Boden der Well-Platte. (*Coating*). Die Zellen treffen durch Absinken im Medium auf eine hohe Dichte an Antikörpern auf dem Well-Boden, wodurch ein *Cross-Linking* der Oberflächenrezeptoren stattfinden kann.

Dynabead= mit Antikörpern beschichtetes Polymer, dient als Positivkontrolle.

Quelle: Eigene Abbildung

Am nächsten Tag konnten die *gecoateten* Platten weiterverwendet werden. Da die Well-Platten nach dem Coating nicht für einen längeren Zeitraum trockenstehen sollten, wurde der Überstand (AK-Mix) einer Reihe mit der Mehrkanalpipette abgenommen, die Spitzen abgeworfen und nach Wechsel der Pipettenspitzen direkt mit 100 µl X-VIVO + P/S-Medium pro Well befüllt. Auf diese Weise wurde das Medium der Platten Reihe für Reihe ausgetauscht. Danach konnten die Zellen auf die Platten gegeben werden.

2.2.6. Gemeinsamkeiten der Stimulationsmodelle

Für die Stimulation der Zellen wurden diese wie in 2.2.1-2.2.3 beschrieben zuerst isoliert und gezählt. Je nach Stimulationsmodell wurden 50.000-100.000 Zellen pro Well hinzugefügt. In allen Ansätzen wurden die einzelnen Stimulationsbedingungen jeweils doppelt angelegt. Als Negativkontrollen gab es einerseits Proben ohne Stimulus und andererseits Proben welche ohne CD3, aber mit den Ko-Stimulatoren CD27/CD28 versehen wurden. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit CD3/CD28-Dynabeads in einer Menge von 0,5 µl pro Well. Bei Dynabeads handelt es sich um mit CD3/CD28-AK benetzte Polymere. Sie haben eine hohe Dichte an Antikörpern auf ihrer Oberfläche und können dadurch ebenfalls zum Cross-Linking der Oberflächenrezeptoren der T Zellen führen. Die Dynabeads stellen durch ihre Präsenz einen Dauerstimulus für die Zellen dar. (Abb. 5).

In allen Modellen wurden die gleichen Antikörperkonzentrationen verwendet. Mit Ausnahme der Kurzzeitstimulation wurde in allen Experimenten mit Antikörper-*gecoateten* Platten gearbeitet. Der CD3-AK wurde dabei mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml verwendet und der CD28-AK mit 0,25 µg/ml. Der CD27-AK wurde mit verschiedenen Konzentrationen titriert (0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1,25 µg/ml). In der Testung des sekundären Antikörpers, sowie im Re-Stimulationsansatz wurde CD27 in der Konzentration 0,25 µg/ml verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte immer in einem Gesamtvolumen von 200 µl X-VIVO + P/S-Medium. Die Platten wurden für spezifische Zeiträume bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.7. Kurzzeitstimulation von naïven T Zellen

In den verschiedenen Ansätzen wurden die Zellen entweder mit löslichen CD3, CD28 und CD27-Antikörpern stimuliert oder in *gecoatete* Platten mit denselben Antikörperkonzentrationen gegeben. Zusätzlich wurde eine Optimierung der Kulturbedingungen durch die Zugabe von 10 ng IL7 pro Well getestet. Dabei wurde IL7 in der gewünschten Konzentration in X-VIVO +P/S-Medium zu den Wells hinzugefügt. Es wurden 1×10^5 naïve T Zellen pro Well über Nacht stimuliert. Die Platten wurden nach Zugabe der Antikörper für eine Stunde inkubiert, bevor 0,5 µl Brefeldin A pro Well hinzugegeben wurde. Dies hemmt die intrazelluläre Translokation der Zytokine in den Golgi-Apparat der Zellen, wodurch die Zytokine intrazellulär akkumulieren und nicht freigesetzt werden. Dadurch sind sie im Anschluss mittels ICS messbar. [77] Die Zellen wurden für weitere 12 h inkubiert und danach mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen.

2.2.8. Stimulation mit sekundärem Antikörper

Das in 2.2.5 beschriebene *Cross-Linking* der Antikörper kann nicht nur durch *Coating*, sondern auch durch andere Methoden wie Verlinkung der Antikörper durch einen sekundären AK (*Ig κ-light chain*) erzielt werden. Dieser bindet die an Oberflächenrezeptoren gebundenen stimulierenden Antikörper und ermöglicht so die Interaktion dieser. Diese Interaktion (= *Cross-Linking*) führt zur Verstärkung des aktivierenden Signals der stimulierenden Antikörper. In diesem Stimulationsmodell wurde das X-VIVO + P/S-Medium für die Inkubation bei 37°C vorgewärmt. Die primären und der sekundäre Antikörper wurden in den gewünschten Konzentrationen in X-VIVO + P/S-Medium bei Raumtemperatur vorbereitet. Es folgte die Zugabe von je 5 µl der vorbereiteten CD3, CD28 und CD27 (0,25 µg/ml) Antikörper zu den 96-Well Rundbodenplatten. Im Anschluss wurden 1×10^5 naïve T Zellen gelöst in einer Menge von 10 µl X-VIVO + P/S-Medium pro Well hinzu pipettiert. Die Wells wurden kräftig mit der Mehrkanalpipette resuspendiert und dann für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 µl des vorgewärmten X-VIVO + P/S-Mediums pro Well hinzugegeben, die Platten bei Raumtemperatur für 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand mit der Mehrkanalpipette abgenommen. Von dem sekundären *Cross-Linking*-AK wurden in der

vorbereiteten Konzentration 150 µl in jedes Well gegeben. Die Titration des sekundären AK erfolgte mit Konzentrationen von 0,25 µg/ml, 2,5 µg/ml und 25 µg/ml. Die Platten wurden für 12 Stunden inkubiert.

2.2.9. Langzeitstimulation von naïven T Zellen

Die 96-Well Rundboden Platten wurden am Tag vor der Zellisolation wie in 2.2.5 beschrieben mit den Antikörpern CD3, CD28 und verschiedenen Konzentrationen von CD27 *gecoatet*. Pro Well wurden 5×10^4 Zellen, entweder PBMCs oder naïve T Zellen, in insgesamt 200 µl Volumen zugegeben. In verschiedenen Ansätzen wurde als Medium X-VIVO + P/S mit oder ohne IL7 zugesetzt verwendet. Die Platten wurden für Zeiträume von 24 h bis 144 h inkubiert.

2.2.10. Stimulation naïver T Zellen mit später Re-Stimulation

Im „*Two-Hit*“ Re-stimulations-Assay wurden die Zellen an Tag 1 stimuliert, anschließend für 6 Tage inkubiert und zu einem zweiten Zeitpunkt (Tag 7) erneut stimuliert. Die Funktionalität der CD27-Kostimulation wurde mittels ICS analysiert.

Das *Coating* der Platten erfolgte wie in 2.2.5 beschrieben am Tag vor der Zellisolation. Die Platten wurden mit CD3 und CD28 *gecoatet*. In zwei Gruppen erfolgte entweder die zusätzliche Stimulation mittels *Coating* des CD27-Antikörpers oder ohne Zugabe von CD27. Die Platten wurden nach der Entnahme des Antikörper-Überstandes mit 100 µl X-VIVO + P/S-Medium plus IL7 gelöst in einer Konzentration von 1 ng/ml befüllt. Es wurden 50.000 Zellen gelöst in 100 µl X-VIVO +P/S-Medium in jedes *gecoatete* Well der Rundbodenplatten gegeben. Die Platten wurden anschließend für 3 Tage inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Zellen in ihrem Medium von den *gecoateten* Platten in neue 96-Well Rundbodenplatten überführt. Dazu wurden die Wells mit Hilfe der Mehrkanalpipette vorsichtig resuspendiert und dann in nicht-*gecoatete* Platten überführt. Sie wurden in den neuen Platten für weitere 3 Tage inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen zur Re-Stimulation an Tag 7 wieder in *gecoatete* Platten überführt, welche am Vortag vorbereitet wurden. Dabei wurden die Zellen mit den beschriebenen Konzentrationen der CD3 und CD28 Antikörper und entweder ohne CD27 oder mit 0,25 µg/ml CD27 re-stimuliert. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die zum ersten Zeitpunkt nur mit IL7 aber ohne Antikörper stimuliert wurde und danach keinen weiteren Stimulus erhielt. Die Positivkontrolle wurde zu beiden Stimulationszeitpunkten mit 0,1 µl der

Dynabeads versehen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde 0,5 µl Brefeldin pro Well hinzugegeben. Die Platten wurden für weitere 12 h inkubiert und danach gemessen (Abb. 6).

2.2.11. Antikörperfärbung nach den Stimulationsmodellen

Die Färbungen für die durchflusszytometrische Analyse im Anschluss an die unterschiedlichen Stimulationsmodelle bauen auf demselben Prinzip auf. Je nach gewünschten Parametern unterschied sich das Vorgehen in weniger Schritten (siehe Abb. 7).

Als erstes wurden die Platten aus dem Inkubator genommen und bei 4°C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeworfen, die Zellen mit je 180 µl PBS pro Well gewaschen und bei 4°C und 1500 rpm für weitere 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgeworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung der Oberflächenrezeptoren extrazellulär. Dies ermöglicht die Unterscheidung in die verschiedenen Zellpopulationen sowie die Messung einiger Rezeptoren als Aktivitätsparameter. Außerdem können durch die Färbung mit dem Viabilitätsfarbstoff eFluor 780 vitale von avitalen Zellen unterschieden werden. Der Farbstoff bindet an intrazelluläre Proteine und kann so tote Zellen, welche ihre

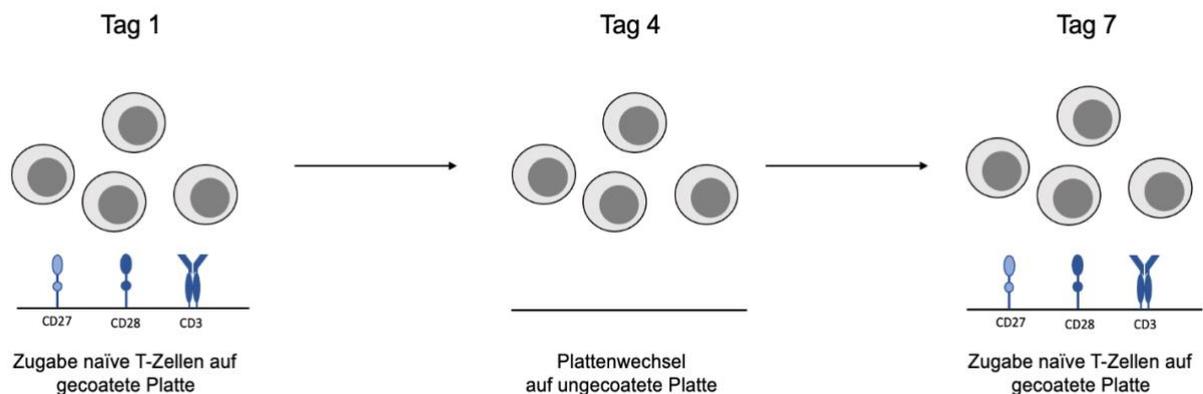


Abb. 6 „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assay (Stimulation mit später Re-Stimulation)

Naïve T Zellen wurden an Tag 1 mit CD3/CD28 +/- CD27 und IL7 stimuliert und für 3 Tage inkubiert. An Tag 4 erfolgte ein Plattenwechsel, um die Stimuli weitestgehend zu entfernen. Die zweite Stimulation erfolgte an Tag 7 erneut durch *gecoatete* Platten mit anschließender Messung 24 h später mittels Durchflusszytometer. *Quelle: Eigene Abbildung*

Membranintegrität verloren haben, markieren. Er wurde in der Verdünnung 1:5 in den unten angegebenen Mengen verwendet. Die extrazelluläre Färbung war nach allen Stimulationsmodellen nach dem Waschen der Zellen der nächste folgende Schritt. Die verwendeten Antikörper sind unter den spezifischen Teilen der Stimulationsmodelle aufgeführt. Die Antikörper wurden in den jeweils angegebenen Mengen zu jedem Well hinzugegeben, mit der Mehrkanalpipette resuspendiert und die Platten für 25 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 180 µl PBS pro Well hinzugegeben und die Platten bei 4°C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert.

Für die Messung von intrazellulären Zytokinen muss die Membran permeabilisiert werden, damit die Antikörper ins Innere der Zellen eindringen können. Vor der Permeabilisierung der Membran wurden die bereits markierten Oberflächenrezeptoren fixiert. Dazu wurden 100 µl des Fixationspuffers (BioLegend) in jedes Well gegeben. Es wurde stark resuspendiert, um die Zellen gut mit der Pufferlösung zu vermischen. Die Platten wurden unter Lichtausschluss für 20 min auf Eis inkubiert. Auf die Inkubation folgte die Zentrifugation bei 4°C und 1700 rpm für 5 min und das Verwerfen des Überstandes.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit je 180 µl des 1:10 verdünnten Permeabilisationspuffers (Perm&Wash, BioLegend) gewaschen. Nach dem Zugabe des Puffers wurden die Well-Platten bei 4°C und 1700 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Durch die Permeabilisation der Membran, können im Anschluss auch intrazelluläre Zytokine durch fluoreszierende Antikörper markiert werden. Die Antikörper wurden in den beschriebenen Mengen zu den Wells gegeben und ausreichend mit der Mehrkanalpipette resuspendiert. Es folgte die Inkubation der Platten im Dunkeln auf Eis für 30 min. Um überschüssige AK zu entfernen, wurden die Zellen erneut mit 180 µl Permeabilisationspuffer pro Well gewaschen und anschließend bei 4°C und 1700 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Zu den Zellen wurden für die anschließende Messung 100 µl FACS-Puffer gegeben.

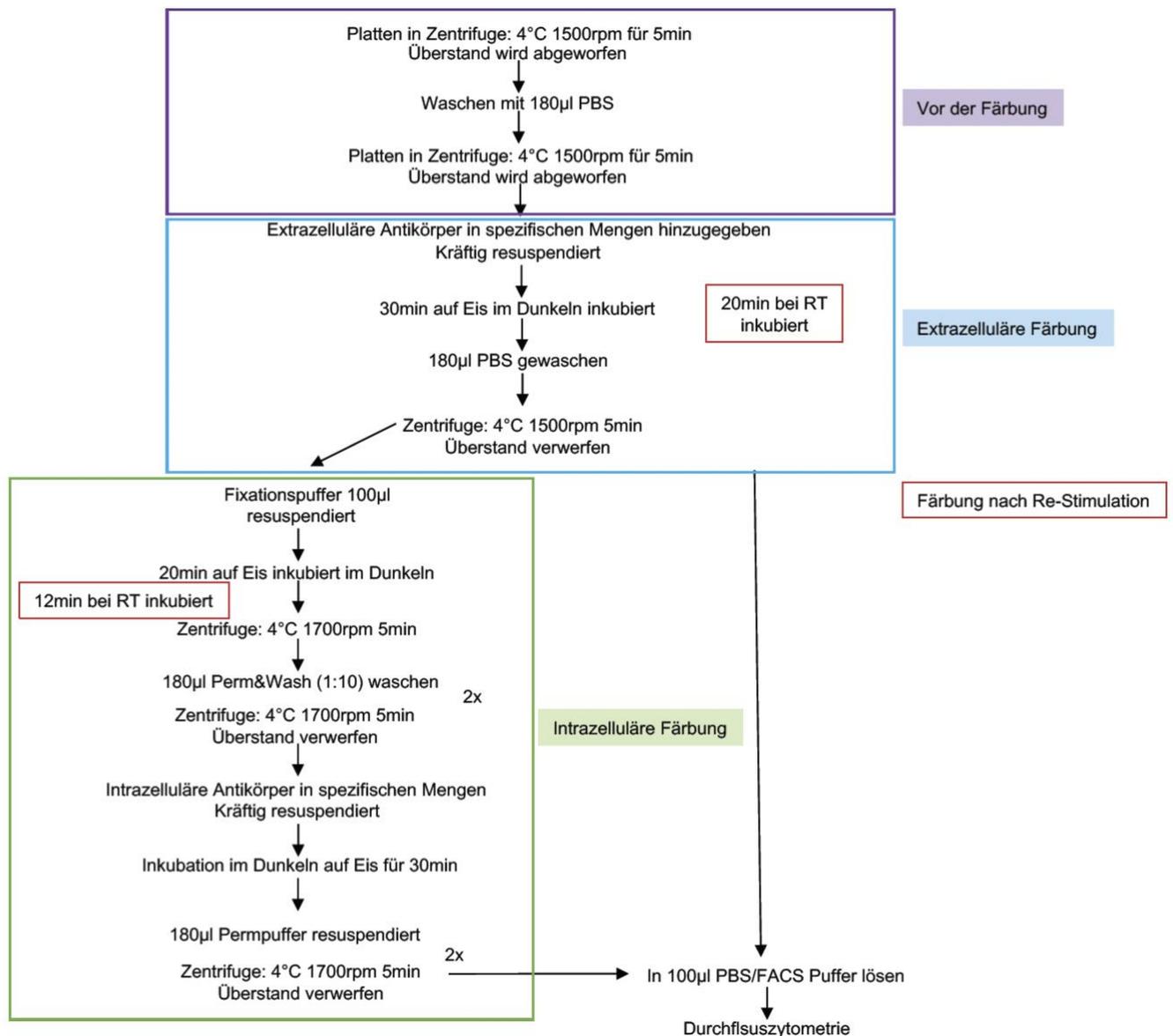


Abb. 7 Flowchart als Übersicht über die Antikörperfärbung nach den verschiedenen Stimulationsmodellen

Violett: gemeinsame Schritte nach allen Stimulationsmodellen, bevor die Färbung begonnen wird.

Blau: Extrazelluläre Färbung als erster Schritt

Grün: Intrazelluläre Färbung im Anschluss an die extrazelluläre Färbung (Kurzzeitstimulation und Re-Stimulations-Assay)

Rot: Abweichungen im Protokoll der Färbung nach Re-Stimulations-Assay

Quelle: Eigene Abbildung

2.2.11.1. Intrazelluläre und extrazelluläre Färbung nach Kurzzeitstimulation

Aufgeführt werden die Antikörper mit ihren Mengen, welche im Anschluss an die Kurzzeitstimulation verwendet wurden. Es wurde nach den in 2.2.10. beschriebenen Schritten die Färbung von extrazellulären und intrazellulären Markern durchgeführt. Diese sind in Tabelle 2 und 3 beschrieben.

Oberflächenmarker	Konjugat	Menge in μl / Well
CD 4	BV510	0,5
CD 8	PerP-Cy5.5	1
CD45RA	BV711	0,5
Via (1:5)	e780	0,5

Tabelle 2 Antikörper extrazelluläre Marker

Zytokin	Konjugat	Menge in μl / Well
TNF- α	AF700	0,05
IFN- γ	FITC	0,5

Tabelle 3 Antikörper intrazelluläre Färbung

2.2.11.2. Extrazelluläre Antikörperfärbung nach Langzeitstimulation und Stimulation mit sekundärem Antikörper

Oberflächenmarker	Konjugat	Menge in μl / Well
CD 4	PE/Cy7	0,02
CD 8	PerP-Cy5.5	0,5
CD45RA	FITC	1
Via (1:5)	e780	0,5
CD 25	BV711	0,5
CD 127	PE	0,5

Tabelle 4 Antikörper zur extrazellulären Färbung nach Langzeitstimulation

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Platten herausgenommen und nach den unter 2.2.10. beschriebenen Schritten gefärbt. Verwendet wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper. Es fand in diesem Modell ausschließlich eine extrazelluläre Färbung statt. Im Anschluss wurden die Zellen direkt in 100 μl D-PBS pro Well für die anschließende Messung gelöst.

2.2.11.3. Antikörperfärbung nach Re-Stimulations-Assay

Im Anschluss an das Re-Stimulationsassay wurden zunächst dieselben Schritte wie in Abb. 7 beschrieben durchgeführt. In der extrazellulären Färbung wurden die avitalen Zellen mittels Viabilitätsfarbstoff eFluor 780 angefärbt. Die Zellen wurden im Unterschied zu den weiteren Färbungen bei Raumtemperatur für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach den Waschschrinen wurden die Zellen im Fixationspuffer bei Raumtemperatur für 12 min im Dunkeln inkubiert. Die

daraufliegenden Schritte stimmen mit den in Abb.7 beschriebenen Schritten der intrazellulären Färbung überein. Beim ICS wurde alle Antikörper bis auf den Viabilitätsfarbstoff verwendet. Die verwendeten Antikörper mit ihren Mengen sind in Tabelle 5 beschrieben.

Oberflächenmarker/ Zytokin	Konjugat	Menge in μl / Well
Via (1:5)	e780	0,5
CD 4	BV510	0,5
CD 8	PerP-Cy5.5	1
CD45RA	BV711	0,5
CD40L (CD154)	PE	0,5
TNF- α	AF700	0,05
IFN- γ	FITC	0,5

Tabelle 5 Antikörper des „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assay

2.2.12. Kryokonservierung von PBMCs

Die PBMCs, die nach der Isolation (2.2.1) nicht direkt für die Stimulationsexperimente verwendet worden sind, wurden zur Lagerung über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff (Kryokonservierung) aufbewahrt. Dafür wurde die PBMC-Suspension bei 4°C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das überbleibende Pellet wurde in 2 ml FKS (Fetales Kälberserum) resuspendiert und je 500 μl der Suspension in ein Einfrierrohrchen gegeben. Die Röhrchen wurden mit je 500 μl des Einfriermediums (20% DMSO) aufgefüllt und dann zügig in einen bei 0°C bis -5°C vorgekühlten Kryo-Einfriercontainer überführt. Dieser wurde zuvor mit Propan-1-ol befüllt, um einen Temperaturabfall von 1°C bis 3°C pro Stunde zu ermöglichen. In dem Container wurden die Röhrchen für 24 h bei -70°C gelagert und danach in den flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.13. Auftauen von kryokonservierten PBMCs

Wenn für Experimente kein frisches Blut zur Verfügung stand, wurden eingefrorene PBMC für die Experimente verwendet. Die kryokonservierten PBMC wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, bis man sie aus dem Behälter herauslösen konnte. Sie wurden so bald wie möglich in ein 15 ml FALCON™ Röhrchen überführt, welches bereits mit 13 ml X-VIVO + P/S-Medium befüllt war, um das zellschädliche DMSO so schnell wie möglich zu verdünnen. Das Röhrchen mit den Zellen wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand im Anschluss dekantiert. Die Zellen konnten in 1 ml X-VIVO + P/S-Medium resuspendiert werden und wie in 2.2.2 beschrieben gezählt und weiterverwendet werden.

2.2.14. Klonen der shRNAs in LeGO-Vektoren

Für die lentivirale Transduktion wurden kommerziell erwerbliche MISSION® shRNAs verwendet. Dabei handelt es sich um Glycerin Stämme von E.coli Bakterien, welche pLKO-Vektoren enthalten. Diese Vektoren enthalten spezifische shRNAs, welche wiederum spezifische Zielproteine haben. Für diese Arbeit wurden shRNAs mit CD27 als Zielprotein verwendet. Die Glycerin Stämme der E.coli Bakterien wurden zunächst kultiviert, um ein Wachstum der Bakterien und damit Expansion der pLKO-Plasmide zu erreichen. Im Anschluss wurden die Bakterien lysiert und die pLKO-Plasmide isoliert. Mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) konnten die shRNAs der Plasmide amplifiziert werden. Nach Gel-Separation und aufreinigen des PCR-Produkts konnten die shRNAs weiterverarbeitet werden. Die shRNAs wurden ebenso wie die LeGO-Vektoren (*novel lentiviral gene ontology*) an ihren Enden mit Restriktionsenzymen gekoppelt. Die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme sind miteinander kompatibel. Es folgte die erneute Gel-Isolation. Durch die kompatiblen Restriktionsenzyme konnten die shRNA-Stücke mit den LeGO-BFP Vektoren verbunden werden. Die shRNA/LeGO-BFP Vektoren wurden erneut in E.coli Stämme transformiert und auf Agarplatten ausgesät. Nach der Inkubation der Platten wurden je 2-3 Kolonien der jeweiligen shRNAs ausgewählt. Es wurde mit Hilfe einer PCR überprüft, ob die E.coli Stämme erfolgreich mit den shRNA enthaltenden LeGo-BFP Vektoren transduziert worden sind. Es folgte erneut das Lysieren der Bakterien und die Isolation der Vektoren. Zuletzt wurde eine Sequenzierung der angereicherten shRNA/LeGO-BFP Vektoren durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Einfügen der shRNAs funktioniert hat und die Zielsequenz in den Vektoren enthalten ist. Die Klonierung der shRNAs in den LeGO-Vektoren wurde von Ju-Young Kim (Mitglied der Arbeitsgruppe AG Jacobsen) durchgeführt. Die Methode wurde nach dem Protokoll von Kleinstuber et al. (Blood 2012) und Güler et al. (EJI 2020) umgesetzt. Dort sind die genauen Mengen- und Inkubationsangaben zur Reproduktion der Klonierung enthalten. [32, 78]

2.2.15. Lentivirale Transduktion naiver T Zellen

Die Transduktion der naiven T Zellen erfolgte, um die Auswirkung einer verminderten CD27 Expression auf die T Zell Aktivierung und Funktionalität zu analysieren. Der Erfolg der Transduktion wurde durch die erwartete verminderte Expression des CD27-Rezeptors auf den naiven T Zellen nach der Transduktion überprüft.

An Tag 1 des Experiments wurden die naiven T Zellen wie in 2.2.1-2.2.4 beschrieben isoliert. Es wurden je 2×10^5 Zellen in die Wells gegeben, welche mit 0,5 µl CD3/CD28-Dynabeads und IL7 in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert wurden. Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 24 h inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten für die Retronectin-Transduktion vorbereitet. Hierfür wurden unbeschichtete Flachbodenplatten verwendet. Das

Retronectin, welches mit D-PBS auf eine Konzentration von 36 µg/ml verdünnt wurde, kann bis zu viermal für das Coating der Platten verwendet werden. Die Platten wurden mit 100 µl Retronectin benetzt, was eine Konzentration von 9 µg/cm² ergab. Sie wurden mit Parafilm® versiegelt und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

An Tag 3 wurde das überbleibende Retronectin mit der Mehrkanalpipette von den Platten abgenommen und in einem FALCON-Röhrchen für den nächsten Versuch bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die mit Retronectin benetzten Platten wurden mit 100 µl der Blocking-Lösung befüllt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Währenddessen wurden die bei -80°C gefrorenen shRNA/LeGO-BFP Vektoren aufgetaut. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Blocking-Lösung mit der Mehrkanalpipette abgenommen und die Platten mit 200 µl der Waschlösung gewaschen. Im Anschluss wurden die Virusüberstände in den gewünschten Konzentrationen auf die Retronectin-Platten gegeben und für 1 h bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand konnte nach Zentrifugation abgeworfen werden und die stimulierten Zellen hinzugefügt werden. Dabei wurde ein Well der stimulierten Zellen, aufgrund des großen Wachstums während der Stimulationszeit mit den CD3/CD28-Dynabeads, jeweils auf 4 Wells der Retronectin-Platten aufgeteilt, sodass sich am Ende je ein Viertel der Zellen in einem Well befanden. Die Flachbodenplatten, welche dann die Virusüberstände und die naiven T Zellen beinhalteten, wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der 24 h wurde das Medium und die Platten gewechselt. Die neuen Platten wurden vorbereitet, indem die äußeren Wells der 96-Well Rundbodenplatten mit 200 µl D-PBS befüllt wurden. Die inkubierten Flachbodenplatten wurden für 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die überbleibenden Zellen am Boden der Platte wurden in 200 µl X-VIVO + P/S- Medium resuspendiert, auf die vorbereiteten 96-Well Rundbodenplatten überführt und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Auf die Inkubation folgte die Färbung und Fixierung der transduzierten Zellen. Die Platten wurden zunächst bei 1500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Antikörpermix wurde mit 5 µl pro Well in den in Tabelle 6 angegebenen Mengen hinzugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl D-PBS in jedes Well wurden die Platten bei 4°C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Pro Well wurden 100 µl Fixationspuffer hinzugegeben und die Platten für 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 1500 rpm und die Abnahme des Überstandes. Die Zellen wurden mit 200 µl D-PBS pro Well gewaschen, erneut bei 1500 rpm und 4°C für 5 min

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Waschen wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurden die Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

Oberflächenmarker/ Zytokin	Konjugat	Menge in μ l / Well
CD 4	PE-Cy7	0,02
CD 8	PerP-Cy5.5	1
Via (1:5)	e780	0,5
CD27	FITC	0,5

Tabelle 6 Antikörper zur Messung nach shRNA-Transduktion

2.2.16. Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine laser-basierte Methode für die Analyse von Partikeln und Zellen. Mit ihrer Hilfe können einzelne Zellen aus einer Zellsuspensionen hinsichtlich ihrer Größe, Form und Dichte genauer untersucht werden. Dazu werden die Zellen von dem Gerät aufgesogen und einzeln durch einen Laser geleitet, sodass jede Zelle von den Detektoren einzeln analysiert werden kann. Sobald der Laserstrahl auf die Zelle trifft, wird dieser in verschiedene Richtungen gestreut. Das Durchflusszytometer detektiert einerseits das Licht, welches durch flache Brechung des Lichts vorwärts gestreut wird (forward scatter, FSC) und maßgeblich durch die Größe der Zelle bestimmt wird. Andererseits wird auch das Licht, welches im rechten Winkel zur Seite gestreut wird, gemessen (sideward scatter, SSC). Dieses wird durch die Größe des Zellkerns und Granularität der Zellen bestimmt. Das von Detektoren gemessene Licht wird in elektrische Spannung umgewandelt. Diese ist direkt proportional zum gemessenen Licht. Zusätzlich kann das Durchflusszytometer emittiertes Licht messen, welches durch fluoreszierende Moleküle wie Antikörper erzeugt wird. Diese Fluoreszenzmarkierten Antikörper werden verwendet, um zum Beispiel Oberflächenmoleküle oder intrazellulär produzierte Proteine genauer zu bestimmen. Das fluoreszierende Licht kann durch die richtige Wellenlänge des Lasers angeregt werden. Gemessen werden können nicht nur mehrere Farben auf einer Zelle, sondern auch die relative Anzahl der fluoreszierenden Moleküle auf der Oberfläche der Zellen.

In den Versuchen, die im Rahmen dieses Projektes durchgeführt wurden, wurden in allen Versuchen Antikörper für die Bestimmung der verschiedenen Subtypen der T Zellen verwendet. Außerdem wurde stets der Viabilitätsmarker *Via e780* verwendet, damit avitale Zellen aus den Analysen ausgeschlossen werden konnten. Für die verschiedenen Ansätze wurden die oben beschriebenen Antikörper je nach Fragestellung verwendet. Die Messungen erfolgten am BD LSRFortessa™ mit Hilfe der FACSDiva v6.0 Software (BD). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo™ v10.

2.2.16.1. Auswertung der Zytokine nach Kurzzeitstimulation

Im ersten Schritt wurden die Zellen im FSC in ihrer Höhe gegen ihre Fläche sortiert. Hier wurden die *Singlets* (Einzelzellen) zur weiteren Analyse von den aneinanderklebenden Zellen abgegrenzt. Die Höhe und die Fläche verhalten sich bei den *Singlets* proportional zueinander. So konnten die Ausreißer, die sich nicht auf der gedachten Geraden zwischen dem FSC-H (Höhe) und FSC-A (Fläche) befinden, als aneinanderklebende Zellen ausgeschlossen werden.

Im nächsten Schritt wurde im FSC gegen SSC ein *Gate* auf die Lymphozyten gesetzt. Da in den meisten Versuchen naive T Zellen verwendet wurden, befand sich stets ein Großteil der Zellen in diesem *Gate*. Die Zellen außerhalb sind meist Zellen anderer Populationen, welche trotz der Isolation noch in der Zellsuspension überblieben. Teilweise sind es auch bereits tote Zellen, die nach der Apoptose kondensieren und kleiner werden und sich damit links vom *Gate* abgrenzen lassen.

Die Lymphozyten wurden dann im FSC gegen den Marker Via-e780 aufgetragen. Damit konnten die Zellen außerhalb des *Live-Gates* als tote Zellen identifiziert werden. Die lebenden Zellen wurden im Anschluss nach dem Marker CD45RA in die Gruppen CD45RA⁺ (CD45RA^{high}) und CD45RA⁻ (CD45RA^{low}) eingeteilt. Im weiteren Vorgehen wurden zwar die Subtypen und Zytokine für beide Gruppen bestimmt, der Fokus lag allerdings auf den CD45RA⁺ exprimierenden Zellen. Bei diesen handelt es sich um die naive T Zellen. Die CD45RA⁻ exprimierenden Zellen sind die Zellen, die nach der Isolation der naiven T Zellen mit einer Reinheit von >95% als Kontamination noch in der Kultur überbleiben konnten. Dies sind zum Beispiel Memory T Zellen oder auch Effektor T Zellen.

Als nächstes wurden die Zellen in CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen unterteilt. Dabei wurden die doppelt positiven und doppelt negativen Zellen aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Das *Gate* wurde so gesetzt, dass möglichst alle doppelt positiven und doppelt negativen Zellen abgegrenzt wurden. Dazu wurde dieses möglichst nah um die einzeln-positiven Gruppen positioniert. Zuletzt wurde die Zytokinausschüttung der Zellen bestimmt. Dazu wurden TNF α und IFN γ gegeneinander aufgetragen. Das *Gate* wurde orientierend an der doppelt negativen Population in der Negativkontrolle gesetzt und für alle gleich übertragen. So konnten doppelt-positive und einzeln-positive Zellen bestimmt werden (Abb. 8).

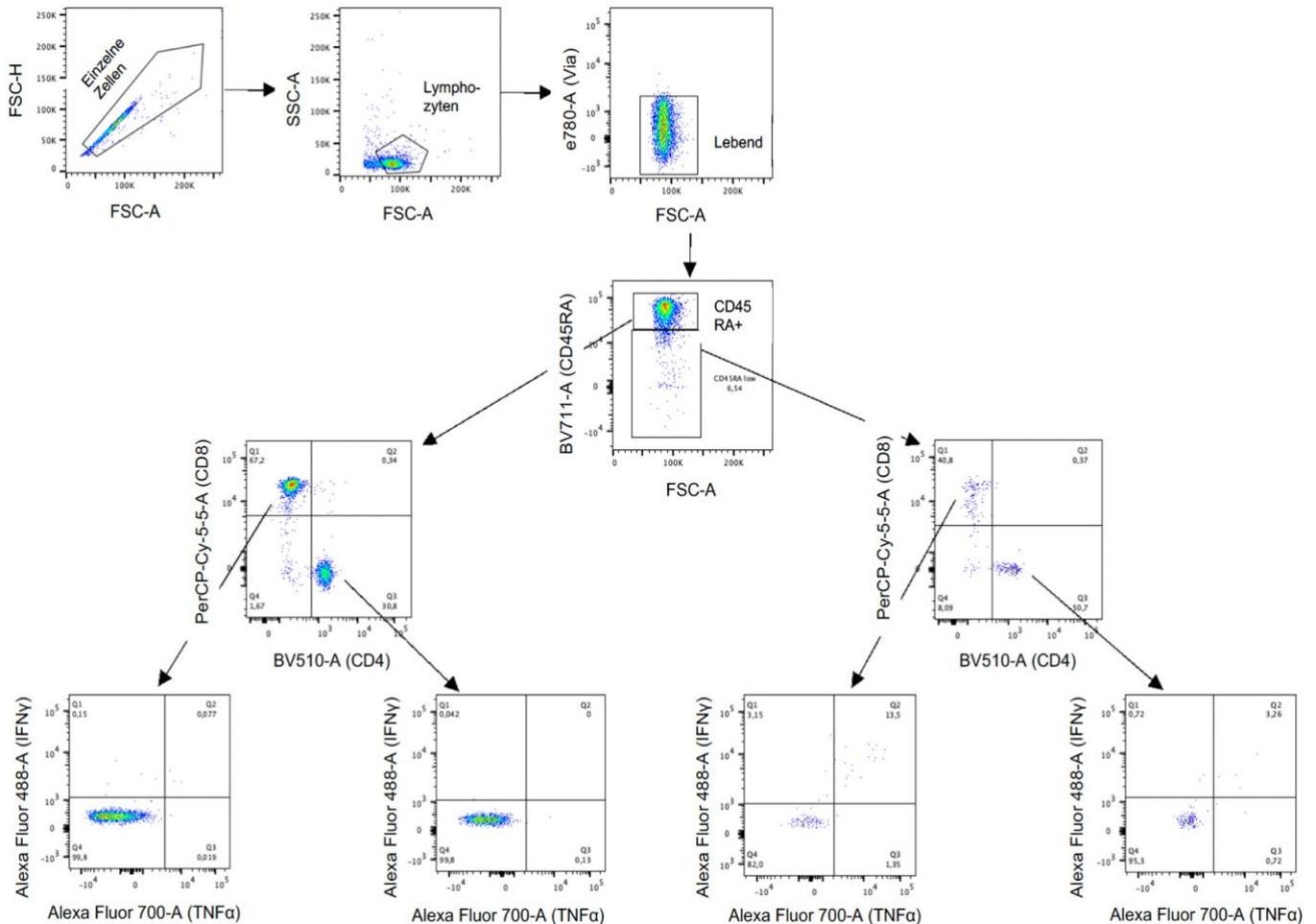


Abb. 8 **Gatingstrategie für die Auswertung der Kurzzeitstimulation**

Quelle: Eigene Abbildung

2.2.16.2. Auswertung Oberflächenmarker nach Langzeitstimulation

Das Prinzip der Auswertung entspricht in großen Teilen dem der Kurzzeitstimulation in 2.2.16.1. Die Zellen wurden auf die gleiche Weise von *Singlets* und Lymphozyten zu lebenden Zellen *gated*. Im Anschluss wurden die Zellen dann in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen geteilt. Die *Gates* wurden erneut eng an den einzeln-positiven Zellen gesetzt, um alle doppelt-positiven und doppelt-negativen Zellen aus der weiteren Analyse ausschließen zu können.

Danach erfolgte die Bestimmung der Oberflächenrezeptoren CD25 und CD127. Hier wurde sich an der Negativkontrolle orientiert. Da bei dieser kaum CD25 Expression und eine sehr hohe Expression von CD127 zu erwarten war, konnte das *Gate* eng an der CD127⁺CD25⁻ Population gesetzt werden. Dieses *Gate* wurde dann für alle Proben gleichermaßen übernommen.

Zuletzt wurden hier im FSC gegen CD45RA erneut alle lebenden Lymphozyten aufgetragen. Die Bestimmung des Anteils der naiven T Zellen wurde hier nicht im Gesamt-*Gating*, sondern als separater Marker für die Aktivierung der Zellen über den Zeitraum von 144h verwendet. Das *Gate* wurde eng an den hoch-positiven Zellen gesetzt, um auch geringe Veränderungen in den Anteilen der naiven T Zellen erkennen zu können (Abb. 9).

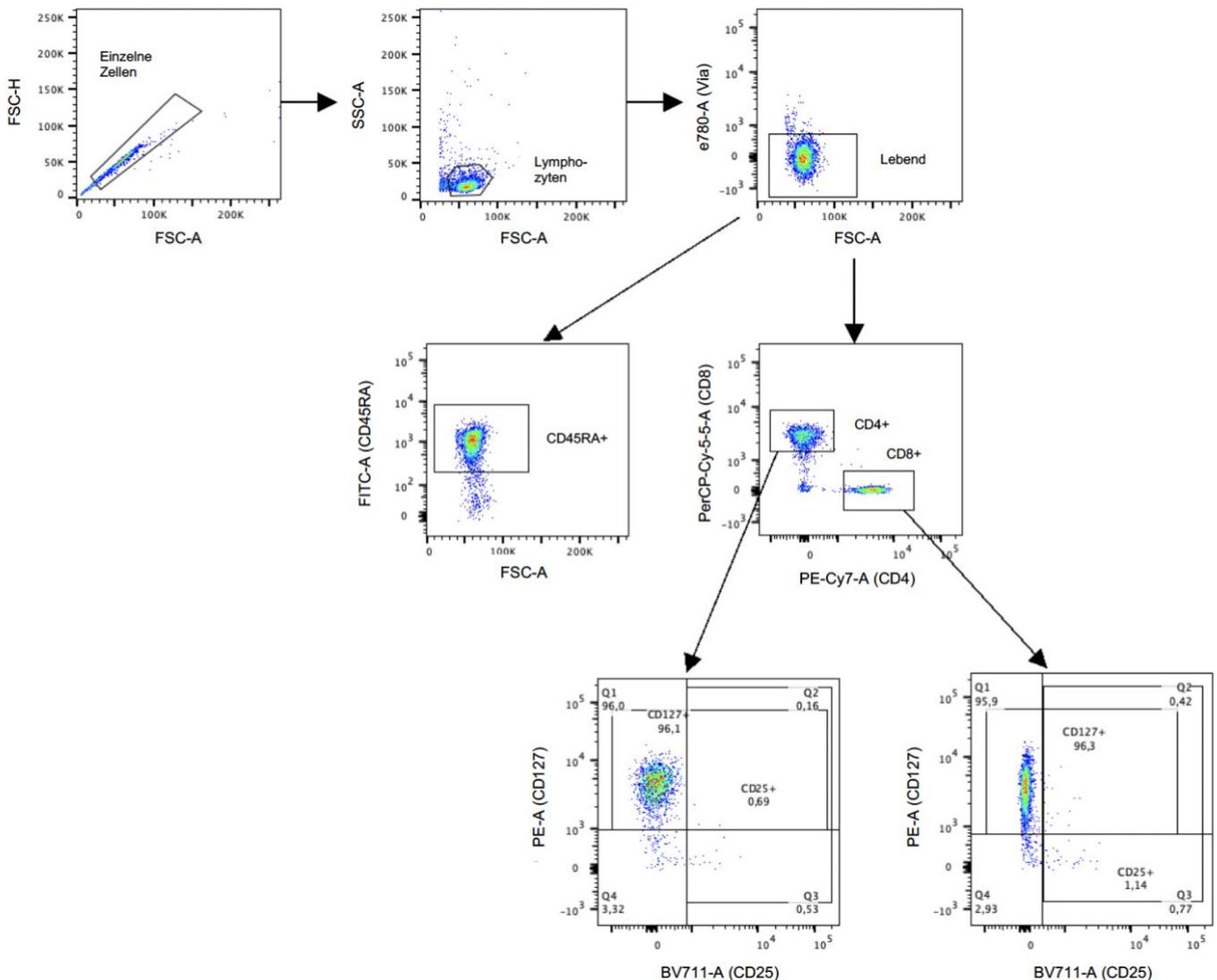


Abb. 9 *Gating*strategie für die Auswertung der Langzeitstimulation

Quelle: Eigene Abbildung

2.2.16.3. Auswertung der Zytokine nach „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assay

Die Auswertung der Zellen nach „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assay erfolgte nach demselben Prinzip wie das der Langzeitstimulation bis zur Aufteilung in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen (2.2.16.2). Im Anschluss wurde hier für die einzelnen T Zell Subtypen CD40L jeweils einmal gegen TFN α und einmal gegen IFN γ aufgetragen. Die *Gates* wurden orientierend an den doppelt-negativen Zellen gesetzt und für alle Proben übernommen. Für die Auswertung entscheidend waren in

diesem Fall nur die doppelt-positiven Zellen, welche sowohl eine Expression von CD40L als frühen Aktivierungsmarker, als auch eines Zytokins zeigten (Abb. 10).

Zuletzt wurde CD45RA als separater Marker für die Aktivierung der Zellen wie in 2.2.16.2 bestimmt.

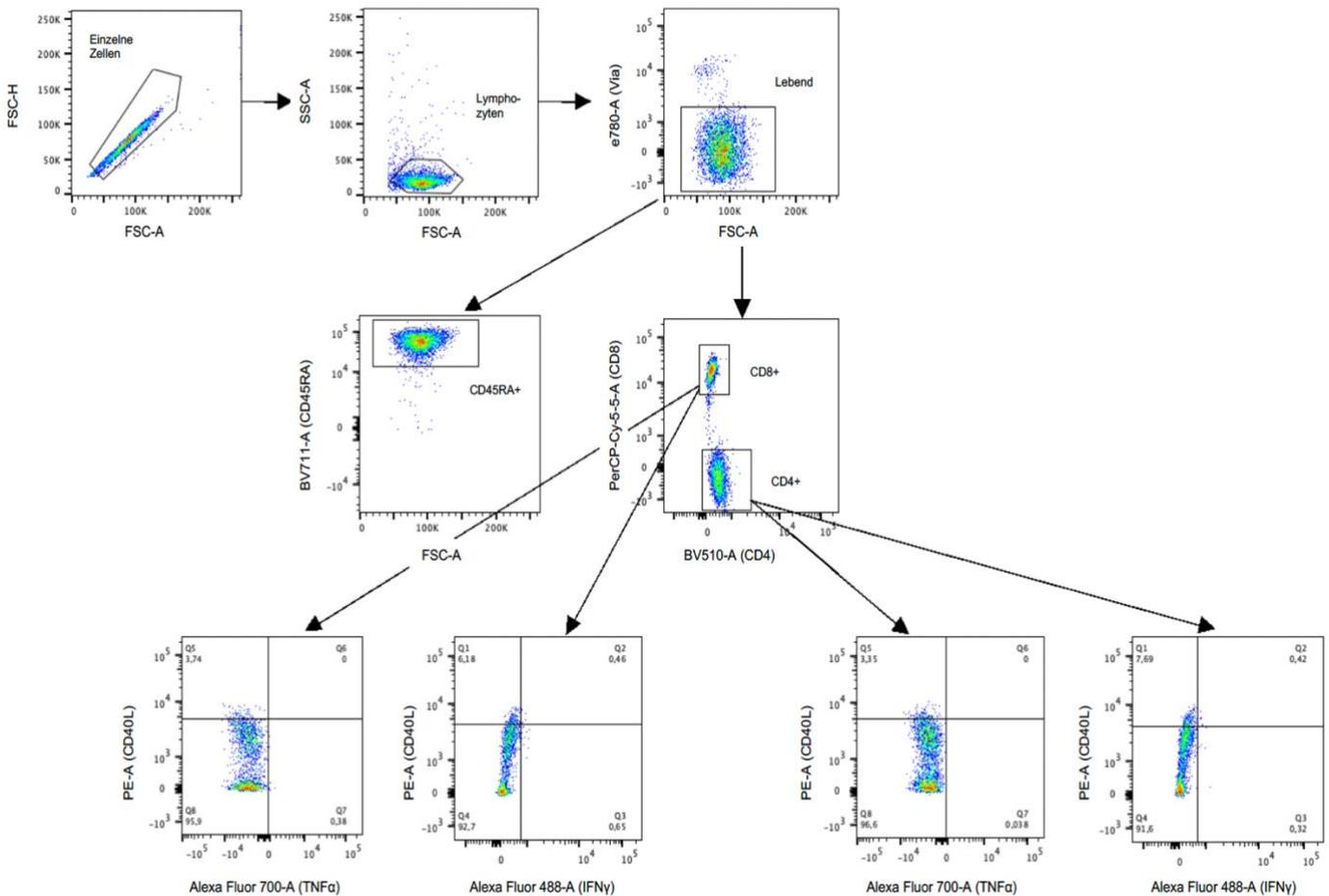


Abb. 10 **Gatingstrategie** für die Auswertung des „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assays

Quelle: Eigene Abbildung

2.2.16.4. Auswertung nach Transduktion

Nach der Transduktion erfolgte die Auswertung bis zur Unterscheidung der Zellen in einfach positive CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nach dem gleichen Prinzip wie in 2.2.16.2 beschrieben. Im Anschluss daran wurde die Transduktionsrate bestimmt, indem ein *Gate* auf die BFP⁺ Zellen gesetzt wurde. Hierbei handelt es sich um den Marker, der den Anteil der transduzierten Zellen angibt, da nur diese BFP⁺ erscheinen. Dieses *Gate* wurde anhand der Negativkontrolle der Nicht-Transduzierten Zellen gesetzt, da hier von einer Transduktionsrate von 0% ausgegangen werden kann und somit nahezu alle Zellen BFP⁻ erscheinen.

Danach wurde ausgehend von den BFP⁺ Zellen die CD27-Expression bestimmt. Das Gate konnte anhand der positiv erscheinenden Hauptpopulation gesetzt werden und für alle Proben übertragen werden (Abb. 11).

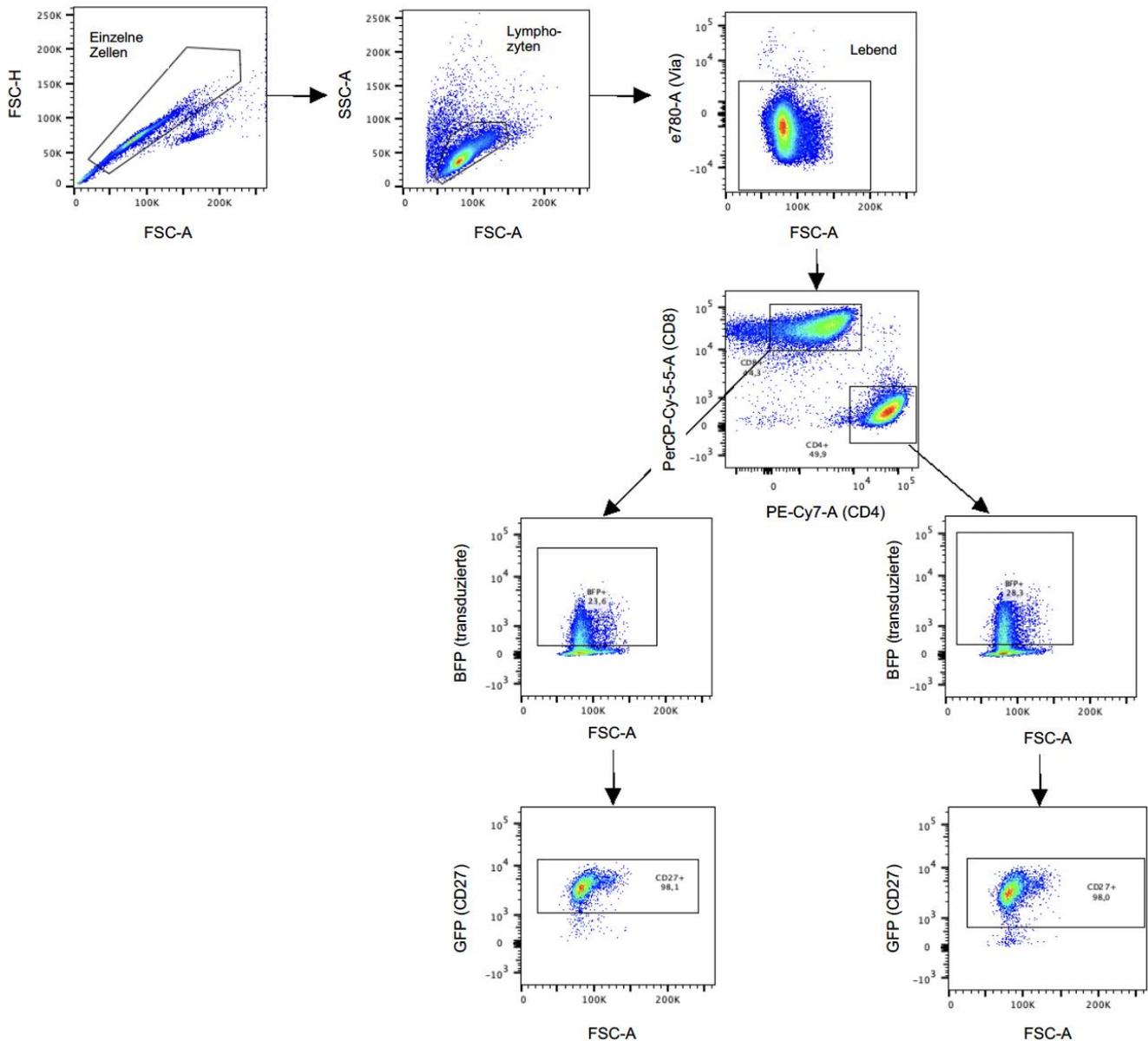


Abb. 11 **Gatingstrategie für die Auswertung der Transduktion**

Quelle: Eigene Abbildung

2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und anschließende graphische Darstellung der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism Version 9.0 für macOS (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Für die statistische Analyse wurde von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen. Bei vergleichender Darstellung zweier Gruppen wurde ein Welchs-Test als ungepaarter t-Test durchgeführt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und dementsprechend gekennzeichnet (*).

3. Ergebnisse

3.1. Lentivirale Transduktion naiver T Zellen bewirkt keine CD27 Suppression

Die lentivirale Transduktion von shRNAs zur Supprimierung des CD27 Rezeptors auf der Oberfläche von naiven T Zellen sollte genutzt werden, um mögliche Auswirkungen der Abwesenheit von CD27 auf die T Zell Aktivierung und Funktionalität zu verdeutlichen.

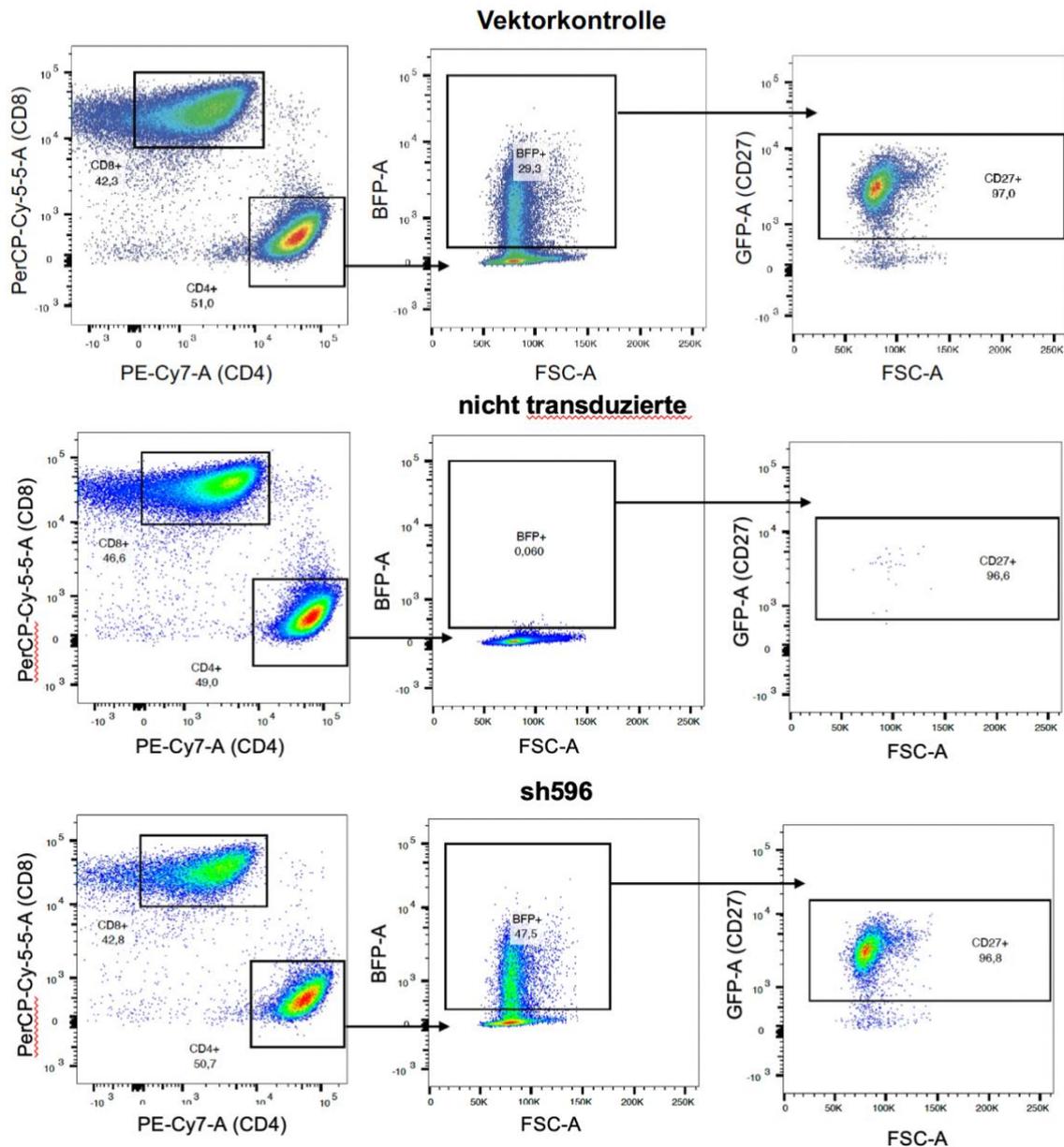


Abb. 12 Bestimmung der Transduktionsrate sowie der CD27-Expression

Darstellung der ausgewählten Gates für die Bestimmung der Transduktionsrate. Für alle als transduziert markierte Zellen (BFP⁺) wurde der Anteil an CD27 exprimierenden Zellen, sowie die Expression des CD27 als MFI (*mean fluorescence intensity*) bestimmt. Dies wurde jeweils für CD8⁺ und CD4⁺ Zellen gemessen. Hier dargestellt sind die Vektorkontrolle, die nicht transduzierten Zellen, sowie beispielhaft sh596 als Vertreter der shRNA transduzierten Zellen (von oben nach unten). Zur graphischen Darstellung wurde die MFI als Vergleichsparameter gewählt. *Quelle: Eigene Abbildung*

Für die Transduktion wurden vier verschiedene shRNAs erworben. Wie in 2.2.14-15 beschrieben wurden jeweils mehrere Klone der shRNAs aufbereitet. Insgesamt wurden sieben verschiedenen shRNA-Klone verwendet (siehe Abb.13). Der Erfolg der Transduktion wurde durch den vektorgebundenen Farbstoff BFP gemessen. Als Zielparameter wurde auf den erfolgreich transduzierten CD8⁺ oder CD4⁺ Zellen die Expression des CD27 an der Oberfläche als MFI gemessen. (Abb.12)

Die Transduktionsrate wurde an Tag 5 nach der Transduktion bestimmt. Diese wurde zunächst separat für CD4⁺ und CD8⁺ naive T Zellen gemessen. Bei vergleichbaren Ergebnissen der beiden Zellgruppen wurden die Daten für die statistische Analyse im Anschluss zusammengeführt. Für die einzelnen shRNAs zeigten sich unterschiedlich hohe Transduktionsraten. Diese variierten von einem Minimum von ungefähr 20% transduzierte naive T Zellen für sh599_c1 bis zu einem Maximum von 45% transduzierte Zellen für sh598_c8. Die weiteren shRNAs und die Vektorkontrolle (VK) zeigten Transduktionsraten im Bereich zwischen den Werten 20-45% (Abb. 13 a). Verglichen mit der Negativkontrolle der nicht-transduzierten Zellen (NT), welche eine Transduktionsrate von 0 aufwies, zeigten sich bis zu 45% BFP⁺ naive T Zellen. Die Transduktion war demnach erfolgreich.

Im Anschluss wurde auf den erfolgreich transduzierten Zellen (BFP⁺) die Expression von CD27 gemessen. CD27 ist das Zielprotein der shRNAs, welches durch die Transduktion vermindert exprimiert werden sollte. Die Vektorkontrolle stellte die Negativkontrolle dar, um einen Einfluss des Transduktionsvorgangs selbst auf die CD27-Expression ausschließen zu können. Es zeigte sich in der Auswertung für alle shRNA-transduzierten Zellen sowie die Zellen der Vektorkontrolle eine ähnliche Expression von CD27 (Abb. 13 b). Trotz einer erfolgreichen Transduktion veränderte sich die Expression von CD27 auf der Oberfläche nicht. Somit konnte kein Einfluss der in diesem Ansatz verwendeten shRNAs auf die Expression von CD27 nachgewiesen werden. Daher wurde dieser experimentelle Ansatz nicht weiterverfolgt, um eine mögliche Auswirkung der Abwesenheit von CD27 auf die Aktivierung und Funktion naiver T Zellen zu untersuchen.

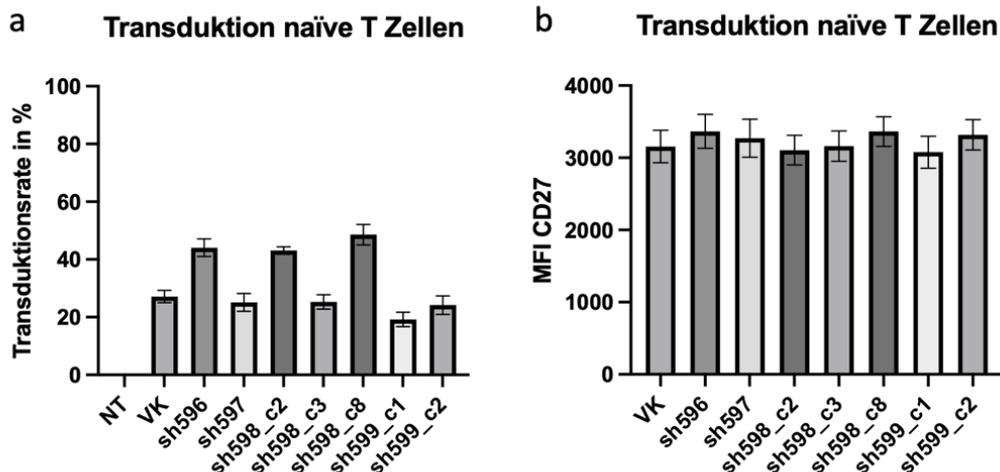


Abb. 13 Transduktion naiver T Zellen mittels shRNAs.

Transduktion der CD4+ und CD8+ naiven T Zellen mit 25µl shRNA. NT= Nicht-Transduzierte Zellen, VK= Vektorkontrolle. a) Transduktionsrate anteilig an den gesamten isolierten naiven Zellen in %. Gemessen wurde die Transduktionsrate mittels BFP als gekoppelten Farbstoff an die Vektoren. b) Expression von CD27 an der Zelloberfläche der Transduzierten Zellen als MFI.

Quelle: Eigene Abbildung

3.2. Verwendung naiver T Zellen zur Charakterisierung der CD27-Funktion

Zur Untersuchung der Auswirkungen der CD27 Ko-Stimulation auf T Zellen wurden primär naive T Zellen verwendet. Nur in wenigen Experimenten wurde zusätzlich eine PBMC-Population eingesetzt. Diese diente als Vergleichsgruppe zu den naiven T Zellen. Für die Verwendung von primär naiven T Zellen gibt es verschiedene Gründe.

Wie in 1.5 beschrieben variiert die Expression von CD27 auf den unterschiedlichen Reifungsstufen der T Zellen. In der Population von naiven T Zellen wird der CD27 Rezeptor hochfrequent exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimieren Effektor T Zellen den Rezeptor kaum auf ihrer Oberfläche. Die Verwendung naiver T Zellen bringt somit eine hohe Dichte an CD27 exprimierenden Zellen mit sich. Dadurch lassen sich die Stimulation des Rezeptors und deren Auswirkungen auf die Aktivierung und Funktion der T Zellen genauer untersuchen. [33, 34] Ein weiterer Einflussfaktor ist die Expression von CD70, dem einzigen in vivo Liganden von CD27. Dieser wird wie bereits in 1.5 beschrieben von verschiedenen Zellpopulationen exprimiert, unter anderem von aktivierten T Zellen, B Zellen und dendritischen Zellen. [79] Diese Zellen sind Bestandteil der zuvor isolierten PBMCs. Um die Rolle der CD27 Ko-Stimulation möglichst genau untersuchen zu können, sollte CD70 als Störfaktor der Stimulation möglichst eliminiert werden. Dieser würde die spezifische Antikörper Titration durch Eigenaktivität verfälschen. Aus diesen Gründen wurden isolierte naive T Zellen für die folgenden Experimente verwendet.

3.3. Optimierung der Stimulationsbedingungen

Die initialen Versuche im Rahmen von Kurzzeitstimulationen (siehe Abb.12) wiesen eine insgesamt geringe Aktivierungsrate der naiven T Zellen auf. Die Aktivierung der T Zellen wurde mittels Zytokinproduktion gemessen. In der Auswertung der Durchflusszytometrie wurde das *Gate* anhand der Negativkontrolle mit ausbleibender Zytokinproduktion gesetzt. Alle T Zellen außerhalb dieses *Gates* wurden als Zytokin produzierende Zellen definiert. Sie wurden anteilig an der Gesamtpopulation gemessen (%). Es wurden zunächst verschiedene Ansätze untersucht, um durch verbesserte Stimulationsbedingungen eine gesteigerte Aktivierung der naiven T Zellen zu erreichen.

3.3.1. Antikörper *Coating* zur Erhöhung der Zytokinproduktion

Zur Verbesserung der Stimulationsbedingungen wurden die Well-Platten mit löslichen Antikörpern *gecoatet* (siehe 2.2.5.). Das dadurch induzierte *Cross-Linking* der Oberflächenrezeptoren der T Zellen sollte zu einer gesteigerten Aktivierung der Zellen führen.

Um die Auswirkung des *Coatings* auf die T Zell Aktivierung zu untersuchen, wurden isolierte naive T Zellen einerseits mit löslichen Antikörpern und andererseits mit den gleichen Konzentrationen der Antikörper auf *gecoateten* Platten stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit dem CD3 Antikörper und der Titration des CD28-Antikörpers in verschiedenen Konzentrationen. Die naiven T Zellen (CD45RA⁺) wurden anhand ihres Zytokinprofils nach der Stimulation in 3 Gruppen unterteilt: Einfach positive IFN γ ⁺ (Abb. 14a) oder TNF α ⁺ Zellen (Abb. 14c) und doppelt positive TNF α ⁺IFN γ ⁺ Zellen (Abb. 14b). Es wurde der Anteil an Zytokinproduzierenden Zellen an der gesamten naiven T Zell Population ausgewertet.

Insgesamt konnte eine deutliche Tendenz für die gesteigerte Zytokinproduktion von naiven T Zellen auf *gecoateten* Platten verglichen mit denselben Konzentrationen an löslichen Antikörpern festgestellt werden. Diese Tendenz zeigte sich in den einzelnen Zytokingruppen unterschiedlich groß. Die deutlichste Steigerung der Zytokinproduktion wurde bei IFN γ ⁺ naiven T Zellen festgestellt. Hier zeigten alle Konzentrationen von CD28 eine gesteigerte Zytokinproduktion verglichen mit den löslichen Antikörpern (Abb. 14a). Als statistisch signifikant erwies sich in dieser Gruppe der Vergleich der CD28-Konzentrationen von 0,05 μ g/ml. Die mit Hilfe des *Coatings* stimulierten naiven T Zellen wiesen eine signifikant höhere Zytokinproduktion als die mit löslichen Antikörpern stimulierten Zellen auf ($p=0,036$; Welch's Test). Für die weiteren Konzentrationen des CD28-Antikörpers ergab sich durch teils hohe Standardabweichungen keine statistische Signifikanz ($p=0,051/p=0,067$; hier nicht dargestellt).

Der Anteil an doppelt positiven (IFN γ ⁺TNF α ⁺) naiven T Zellen zeigte ebenfalls einen positiven Effekt des *Coatings*. Der Mittelwert der Zytokinproduktion war für die verschiedenen CD28-

Konzentrationen bei *gecoateten* Platten höher als bei der Stimulation mit löslichen Antikörpern (siehe Abb. 14b). Dies konnte in der statistischen Auswertung jedoch nicht als signifikant nachgewiesen werden.

Für TNF α ⁺ naive T Zellen zeigte nur die Konzentration von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ des CD28-Antikörpers einen Unterschied der Zytokinproduktion für beide Stimulationsmodelle. Durch die hohe Standardabweichung war keine statistische Signifikanz für diesen Parameter feststellbar (Abb. 14c).

Insgesamt erwies sich die Aktivierung naiver T Zellen nach Kurzzeitstimulation gering. Durch das *Coating* war jedoch die Tendenz für eine gesteigerte Zytokinproduktion verglichen mit der Stimulation mit löslichen Antikörpern erkennbar. Daher wurden für die folgenden Experimente *gecoatete* Platten verwendet.

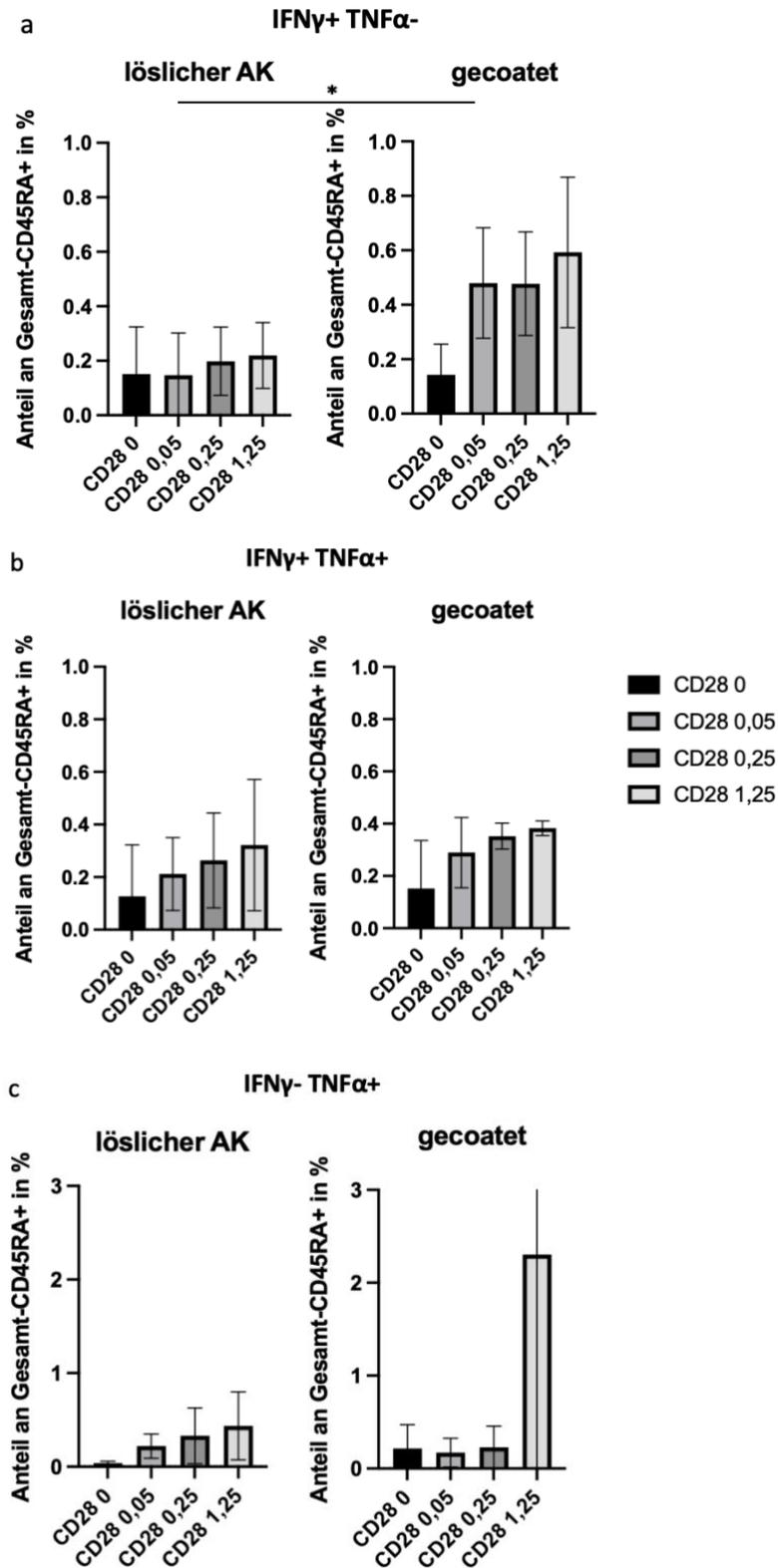


Abb. 14 Vergleich löslicher Antikörper und gecoatete Platten

Kurzzeitstimulation naiver T Zellen über 12h mit 0,5 μ g/ml CD3-Antikörper und verschiedenen Konzentrationen CD28-Antikörper. Anschließende Auswertung der Zytokinproduktion mittels Durchflusszytometrie. Betrachtet wird in allen Diagrammen der Anteil der Zytokinproduzierenden Zellen an den Gesamt-CD45RA+ Zellen (naïve T Zellen). Unterteilung in einfach positive Zellen TNF α +/ IFN γ + und doppelt positive TNF α +IFN γ + Zellen. Dargestellt als Mittelwert (Säule) mit Standardabweichung. (n=3). * =statistisch signifikant *Quelle: Eigene Abbildung*

3.3.2. Sekundärer Antikörper zur Verbesserung des *Crosslinkings* der Oberflächenrezeptoren mit nur gering positivem Effekt

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Stimulationsbedingungen ist die Verwendung eines sekundären Antikörpers. Hier wurde der von Gravestain et al. beschriebene sekundäre Antikörper RG7/7.6 eingesetzt. [41] Der sekundäre Antikörper ermöglicht ebenfalls ein *Cross-Linking* der Oberflächenrezeptoren auf den naiven T Zellen. Die naiven T Zellen wurden hierzu mit den löslichen Antikörpern (CD3, CD28 und CD27) und verschiedenen Konzentrationen des sekundären Antikörpers inkubiert (siehe 2.2.8). Es wurde die Auswirkung auf die Expression von CD25 und IL7R α (CD127) an der Zelloberfläche gemessen. Zum Vergleich wurden naive T Zellen mit den gleichen Antikörperkonzentrationen ohne den sekundären Antikörper auf *gecoateten* Platten stimuliert. Nach der Stimulation wurde eine gesteigerte Expression von CD25 und eine verminderte Expression des IL7R α als Aktivierungsmarker erwartet.

Die Stimulation mit dem sekundären Antikörper zeigte keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von CD25 auf den naiven T Zellen. Die Expression von CD25 blieb nach Stimulation bei allen Konzentrationen des RG7/7.6 ähnlich hoch wie auf den Zellen der Negativkontrolle (Abb. 15a). Ein positiver Effekt des sekundären Antikörpers war auf die Expression des IL7R α erkennbar. Mit steigender Konzentration des sekundären Antikörpers nahm die Expression des IL7R α konsekutiv ab. Dies deutet auf eine gesteigerte Aktivierung der naiven T Zellen durch Kreuzvernetzung der Oberflächen-gebundenen Antikörper hin (Abb. 15b). Im Vergleich zu den naiven Zellen, welche auf *gecoateten* Platten ohne den sekundären Antikörper stimuliert wurden, erwies sich der Effekt des RG7/7.6 deutlich geringer. Auf *gecoateten* Platten war sowohl ein Anstieg der CD25 Expression erkennbar, sowie eine niedrigere Expression des IL7R α nach der Stimulation. Folglich war der Effekt des *Crosslinkings* durch den sekundären Antikörper weniger ausgeprägt als durch das Antikörper-Coating.

In der Auswertung der Durchflusszytometrie fiel ein weiterer Einfluss des sekundären Antikörpers auf. Mit steigender Konzentration des sekundären Antikörpers sank die Viabilität der Zellen nach Stimulation auf bis zu 50% ab (Abb. 15c). In Zusammenschau der Ergebnisse eines geringen Einflusses auf die Rezeptorexpression auf naiven T Zellen und der toxischen Wirkung des RG7/7.6 auf die naiven T Zellen, wurde der Ansatz des sekundären Antikörpers als *Crosslinker* nicht weiterverfolgt.

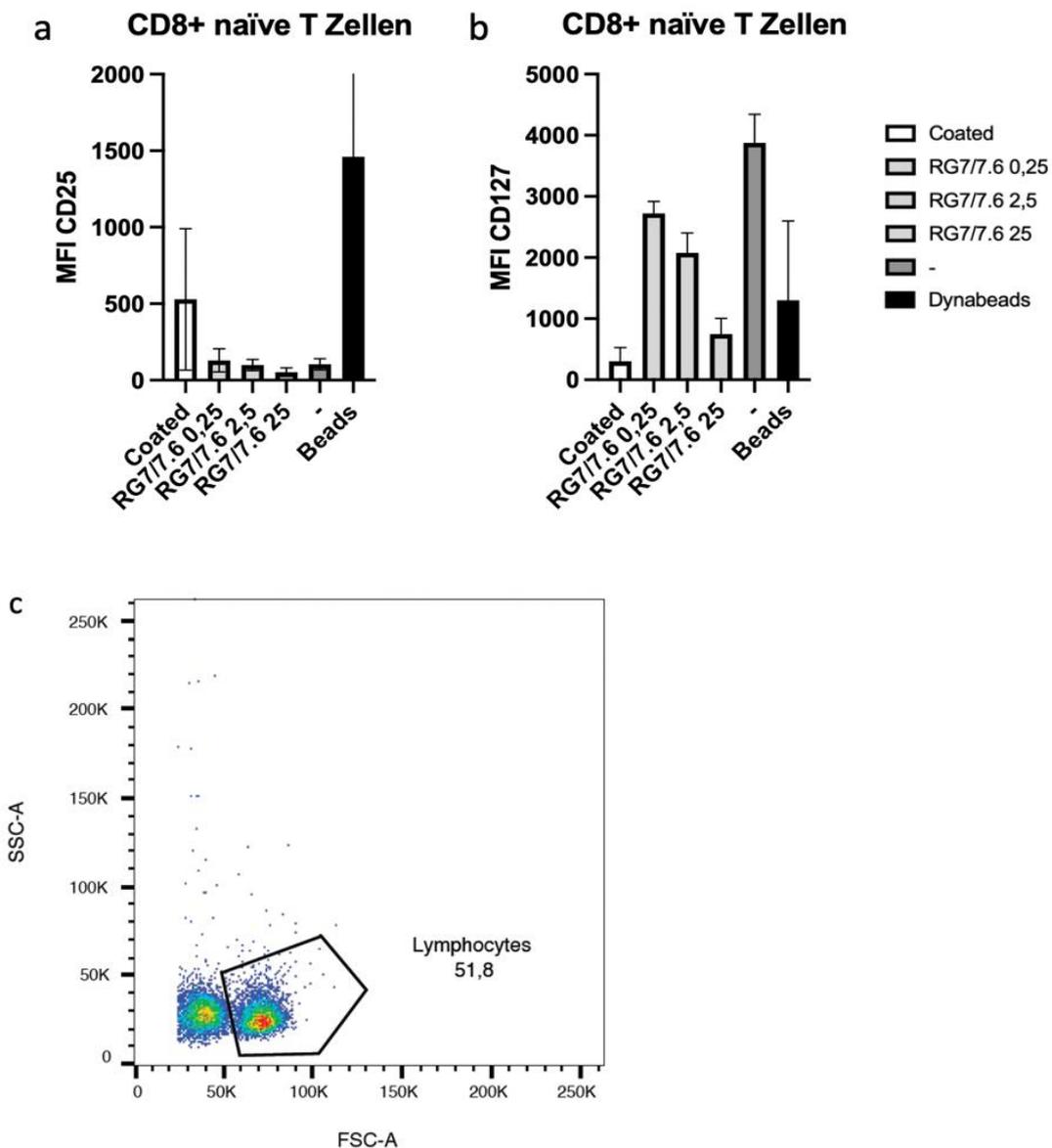


Abb. 15 **Stimulation isolierter naiver T Zellen mit gelösten Antikörpern sowie einem sekundären Antikörper.**

Messung der Expression von CD25 (a) und CD127 (b) als MFI auf naiven CD8⁺ T Zellen nach Stimulation mit CD3 (0,5 µg/ml), CD28 (0,25 µg/ml) und CD27 (0,25 µg/ml) plus verschiedene Konzentrationen des sekundären vernetzenden Antikörpers RG7/7.6 (µg/ml) über 12h;

- = Negativkontrolle, Beads/Dynabeads = Positivkontrolle, Coated = *gecoatete* Platten mit gleicher AK-Zusammensetzung ohne sekundären Antikörper c: FACS-Plot aus der Durchflusszytometrischen Analyse nach der Stimulation mit löslichen Antikörpern (wie in Abb. a und b) plus sekundärem Antikörper. *Sidewards scatter* und *forward scatter* als Achsen. Markiert sind vitale Lymphozyten (51,8%), welche danach weiter in Untergruppen analysiert wurden.
Quelle: Eigene Abbildung

3.4. Gesteigerte Zytokinproduktion durch CD27 Ko-Stimulation in der Kurzzeitstimulation naiver T Zellen

Für die Untersuchung der CD27 Ko-Stimulation und deren Auswirkung auf naive T Zellen wurde der von Gravestain et al. beschriebene CD27-Antikörper ausgewählt. [41] Als erster Ansatz wurde eine Kurzzeitstimulation von naiven T Zellen über Nacht (12h) durchgeführt. Die Zellen wurden mit CD3-, CD28- und einer Titration des CD27-Antikörpers stimuliert. Anschließend wurden die intrazellulären Zytokine mittels FACS-Analyse bestimmt. Damit sollte einerseits die Effektivität des Antikörpers und andererseits mögliche Auswirkungen auf die Aktivierung und damit die Zytokinproduktion der Zellen getestet werden. Gemessen wurden die Zytokine TNF α und IFN γ . Diese wurden jeweils für CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ Zellen bestimmt. In der Analyse wurden einfache positive TNF α^{+} oder IFN γ^{+} und doppelt positive TNF α^{+} IFN γ^{+} naive T Zellen unterschieden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fiel zunächst eine insgesamt geringe Zytokinantwort der naiven T Zellen auf. Die CD4 $^{+}$ T Zellen zeigten kaum IFN γ^{+} und doppelt positive Zellen und somit war kein Effekt des CD27-Antikörpers auf diese spezifische Zytokinproduktion erkennbar. Für CD4 $^{+}$ TNF α^{+} naive T Zellen zeigte die Stimulation mit der höchsten Konzentration des CD27-Antikörpers (1,25 μ g/ml) eine signifikant höhere Zytokinproduktion ($p=0.045$) als die Zellen, welche ohne CD27-Antikörper stimuliert wurden (Abb. 16a).

CD8 $^{+}$ naive T Zellen wiesen verglichen mit CD4 $^{+}$ Zellen insgesamt eine höhere Zytokinproduktion auf. Alle drei Zytokingruppen zeigten die Tendenz einer gesteigerten Zytokinproduktion bei Ko-Stimulation mit CD27. Dieser Effekt verstärkte sich mit steigender Konzentration des CD27-Antikörpers. Die statistische Analyse zeigte für CD8 $^{+}$ naive T Zellen aufgrund teils hoher Standardabweichungen keinen statistisch signifikanten Einfluss der CD27 Ko-Stimulation auf die Zytokinproduktion der Zellen. Für CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen lässt sich jedoch ein deutlicher Hinweis ($p=0.08$) auf eine Korrelation der gesteigerten Zytokine bei Ko-Stimulation mit 1,25 μ g/ml des CD27-Antikörpers erkennen (Abb. 16b).

Die Effektivität des Antikörpers konnte in diesem Experiment bestätigt werden. Die Aktivierungsrate der naiven T Zellen war insgesamt gering, sodass auch die Zytokinproduktion niedrig ausfiel. Nichtsdestotrotz bewirkte die CD27-Stimulation eine gesteigerte Aktivierung der naiven T Zellen in Form der vermehrten Zytokinproduktion.

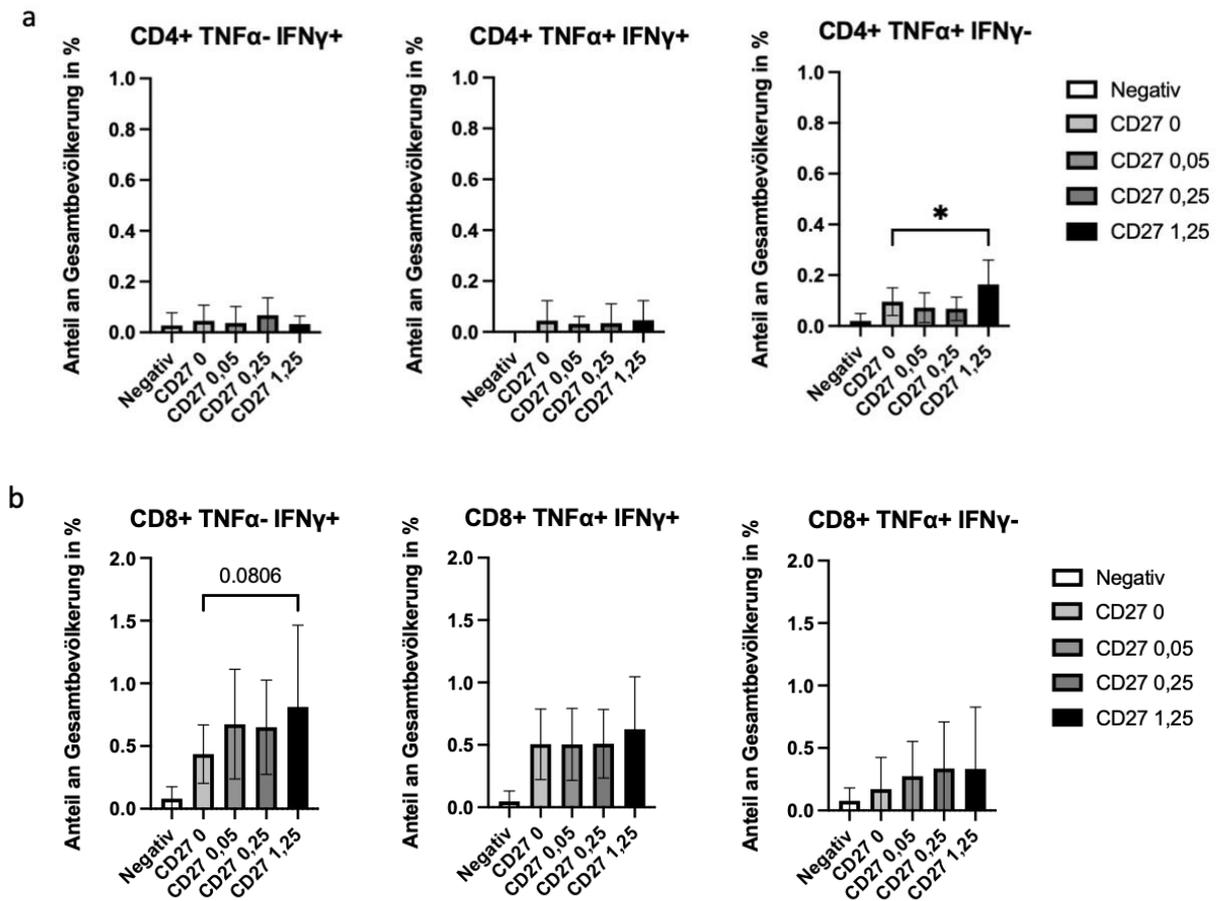


Abb. 16 Kurzzeitstimulation naiver T Zellen zur Testung des CD27-Antikörpers.

Kurzzeitstimulation von isolierten naiven T Zellen mit anschließender Messung der Zytokinausschüttung der Zellen. Stimulation mit 0,5µg/ml CD3-AK, 0,25 µg/ml CD28-AK und Titration des CD27-AK mit 0,05, 0,25 und 1,25 µg/ml. Messung der Zytokinausschüttung nach 12h von CD4⁺ und CD8⁺ naiven T Zellen. Einzelne Auswertung von IFNγ⁺, TNFα⁺ (einfach positive) und IFNγ⁺TNFα⁺ (doppelt positive) Zellen. Statistische Auswertung mittels Welch Test. * = p<0,05 (statistisch signifikant).
Quelle: Eigene Abbildung

3.5. Langzeitstimulation zeigt Teilaktivierung naiver T Zellen im Vergleich zu vollständig aktivierten PBMCs

Um den Effekt der CD27-Kostimulation unter den in dieser Arbeit etablierten Stimulationsbedingungen weiter beurteilen zu können, wurden sowohl PBMCs als auch naive T Zellen in einem Langzeitstimulations-Ansatz beobachtet. Bei den untersuchten Parametern wurden verschiedene Effekte erwartet: nach Aktivierung sollte eine transiente Hochregulierung von CD25 auf den T Zellen erfolgen, IL7Rα (CD127) nach Aktivierung für einen längeren Zeitraum vermindert exprimiert werden und es wurde ein Wechsel von CD45RA zu CD45RO auf der Oberfläche der aktivierten T Zellen erwartet. (siehe 1.1-1.4) Die Parameter wurden über einen Zeitraum von 144h beobachtet.

In der PBMC-Kultur befanden sich etwas mehr als 50% CD45RA-exprimierende T Zellen. Ab der 48h-Messung wurde eine sinkende Expression von CD45RA auf der Oberfläche der T

Zellen für die nächsten Messzeitpunkte (72 h und 144 h) beobachtet. Es fand ein Wechsel zu CD45RO im Sinne der Zellaktivierung und Differenzierung statt, sodass am Ende nur noch ein geringer Anteil von ungefähr 10% der T Zellen CD45RA exprimierte (Abb. 17, obere Zeile, links). Die Expression von CD25 auf den T Zellen der PBMC-Kultur, welche auf *gecoateten* Platten stimuliert wurden, war bereits nach 24 h erhöht verglichen mit der Negativkontrolle. Sie blieb über den Stimulationszeitraum von 144 h nahezu stabil. Auf den Dynabead-stimulierten Zellen steigerte sich im Gegensatz dazu die Expression von CD25 über 72 h konstant und nahm anschließend wieder ab. (Abb. 17, mittlere Zeile, links). Die Expression des IL7R α in PBMCs zeigte für *gecoatete* Platten und Dynabeads den erwarteten regulatorischen Effekt. Es lag bereits nach 24 h eine verminderte Expression des Rezeptors verglichen mit der nicht-stimulierten Kontrolle vor. Diese blieb über 72 h konstant und im Anschluss erfolgte die Re-Expression des Rezeptors bis nahe der Ausgangswerte (Abb. 17, untere Zeile, links).

Die isolierten naiven T Zellen exprimierten wie erwartet über 99% CD45RA. Dieser Anteil blieb für den Stimulationszeitraum von 144h konstant. Nur unter den Dynabead-stimulierten naiven T Zellen war eine vollständige Aktivierung und Differenzierung im Sinne eines Wechsels zu CD45RO erkennbar. In dieser Gruppe fand bei über 50% der Zellen ein Wechsel von CD45RA zu CD45RO statt (Abb. 17, oberer Zeile, rechts). Die naiven T Zellen zeigten bei der Expression von CD25 ebenfalls nur für die Dynabead-Stimulation eine deutliche Steigerung über 72 h mit anschließendem Abfall. Dieser Effekt blieb bei den auf *gecoateten* Platten stimulierten naiven T Zellen aus (Abb.17, mittlere Zeile, rechts). Bei Betrachtung der IL7R α -Expression fiel für die Dynabead Stimulation eine ähnliche Regulation wie auf den PBMCs auf. Der Rezeptor wurde initial vermindert exprimiert. Es fand ebenfalls eine Re-Expression von IL7R α statt, diese war jedoch deutlich geringer. Die Rezeptorexpression des IL7R α erreichte weniger als 50% des Niveaus der Negativkontrolle. Für die mit *gecoateten* Platten stimulierten T Zellen war ebenfalls ein regulatorischer Effekt erkennbar. Auch hier zeigten die naiven T Zellen eine verminderte Expression des IL7R α . Dieser Effekt war deutlich geringer als bei Stimulation mit Dynabeads. Hier folgte keine Re-Expression über den gesamten Zeitraum von 144 h (Abb. 17, untere Zeile, rechts).

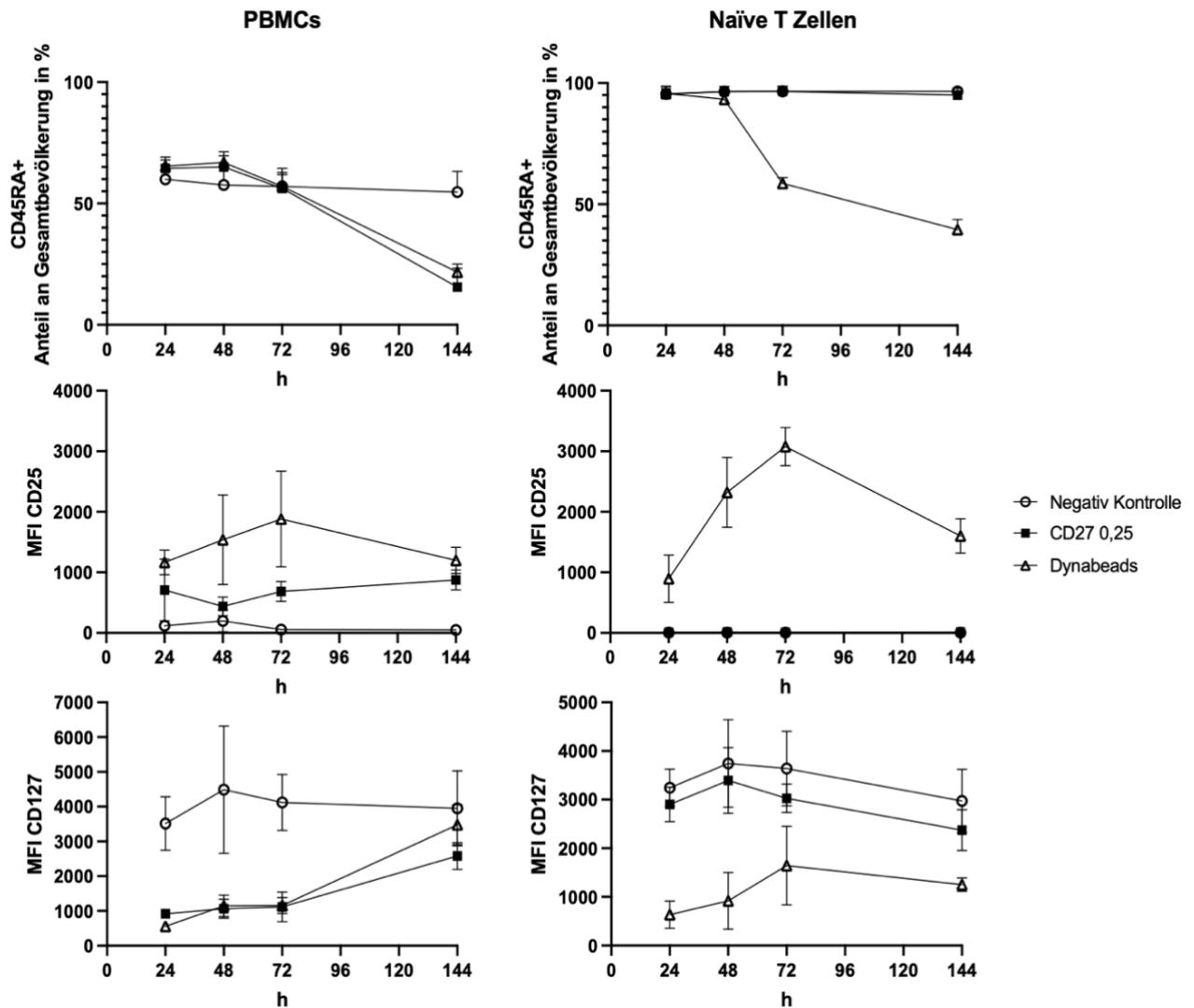


Abb. 17 Vergleich PBMCs und naiver T Zellen über einen Stimulationszeitraum von 144h.

Stimulation von jeweils PBMCs und naiven T Zellen mit CD3-AK (0,5 µg/ml), CD28-AK (0,25 µg/ml) und CD27-AK (0,25 µg/ml) über einen Zeitraum von 144 h (7d). Negative Kontrolle= kein Stimulus, Positivkontrolle= Dynabeads 0,5µl. Oben: Anteil an CD45RA⁺ Zellen an der jeweiligen Gesamtpopulation. Mitte: *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) der CD25 Expression an der Oberfläche der Zellen. Unten: MFI der CD127 Expression (=IL7R α) an der Oberfläche der Zellen. Die Werte bilden jeweils den Mittelwert und die senkrechten Linien stellen die Standardabweichung dar. (n=7)
Quelle: eigene Abbildung

Insgesamt war auf die auf *gecoateten* Platten stimulierten naiven T Zellen kein signifikanter Effekt auf die Expression von CD45RA/RO und CD25 erkennbar. Dennoch zeigte sich ein regulatorischer Effekt auf den IL7R α . Dieser fiel verglichen mit den PBMCs deutlich geringer aus. (Abb.17 Vergleich untere Zeile links PBMCs und rechts naive T Zellen). Die Ergebnisse der Langzeitstimulation deuten auf eine Teilaktivierung der naiven T Zellen hin, da durch die Stimulation der naiven T Zellen nur die Expression des IL7R α verändert werden konnte. Die weiteren Aktivierungsparameter blieben stabil. Der Einfluss der CD27-Stimulation auf den IL7R α wurde in folgenden Experimenten genauer untersucht.

3.6. Charakterisierung der Auswirkung der CD27 Ko-Stimulation auf naive T Zellen

In den oben beschriebenen Modellen wurde eine gesteigerte Aktivierung der naiven T Zellen durch CD27 Ko-Stimulation nachgewiesen. In den folgenden Stimulationsmodellen wurde der Einfluss der CD27 Ko-Stimulation auf die naiven T Zellen genauer charakterisiert. Hierfür wurden die Konzentrationen von 0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml und 1,25 µg/ml des CD27-Antikörpers verwendet, um einen möglichen Titrationseffekt zeigen zu können. Es wurden sowohl die Expression der Oberflächenrezeptoren als auch die Zytokinausschüttung der naiven T Zellen untersucht und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.6.1. CD27 Ko-Stimulation zeigt regulatorischen Effekt auf die Expression des IL7R α

Im Langzeitstimulationsmodell wurden naive T Zellen über einen Zeitraum von 144 h mit CD3/CD28-Antikörpern und verschiedenen Konzentrationen des CD27-Antikörpers inkubiert. Güler et al. zeigten bereits einen Zusammenhang der T Zell Aktivierung mit einer nachfolgend verminderten Expression des IL7R α . In den Experimenten dieser Arbeitsgruppe konnte nach 48-72h eine Re-Expression des Rezeptors beobachtet werden. [32] Im Folgenden wurde die Auswirkung der Aktivierung naiver T Zellen und die der CD27 Ko-Stimulation auf die Expression des IL7R α im Zeitverlauf betrachtet.

In der Analyse der naiven T Zellen wurden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unterschieden. Verglichen mit der Negativkontrolle exprimierten sämtliche stimulierte T Zellen den IL7R α vermindert. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ naive T Zellen zeigten für alle Konzentrationen des CD27-AK eine konstant verminderte Expression des IL7R α über den Zeitraum von 144 h. Es konnte nach Antikörperstimulation im Zeitverlauf keine Re-Expression des Rezeptors beobachtet werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Dynabeads) war der Regulationseffekt durch Antikörperstimulation auf den IL7R α weniger stark. Außerdem war die Dynabead-Kontrolle die einzige Gruppe, die eine Re-Expression des IL7R α zeigte. Die IL7R α -Expression erreichte im Verlauf jedoch nicht den Ausgangswert der Negativkontrolle und blieb ab 72h relativ konstant (Abb. 18 a und b).

Zu jedem Messzeitpunkt (24h, 48h, 72h und 144h) wurde zusätzlich der Effekt der verschiedenen CD27-Konzentrationen untereinander und mit der Negativkontrolle verglichen. Es konnte eine konzentrationsabhängige Regulation des IL7R α für CD4⁺ und CD8⁺ naive T Zellen durch die CD27 Ko-Stimulation beschrieben werden. Die Regulation des IL7R α erwies sich zum Zeitpunkt 72h am deutlichsten (Abb. 18 c und d). Auf CD8⁺ T Zellen zeigte die Ko-Stimulation mit 1,25 μ g/ml des CD27-Antikörpers eine signifikant verminderte Expression des IL7R α verglichen zu ohne CD27 ko-stimulierte Zellen (Abb. 18 c, $p < 0,05$, Welch-Test). Die weiteren Konzentrationen des CD27-Antikörpers zeigten anhand eines verminderten Mittelwerts ebenfalls einen regulatorischen Effekt auf den IL7R α , erwiesen sich jedoch verglichen mit der Stimulation ohne CD27-Antikörper als nicht signifikant.

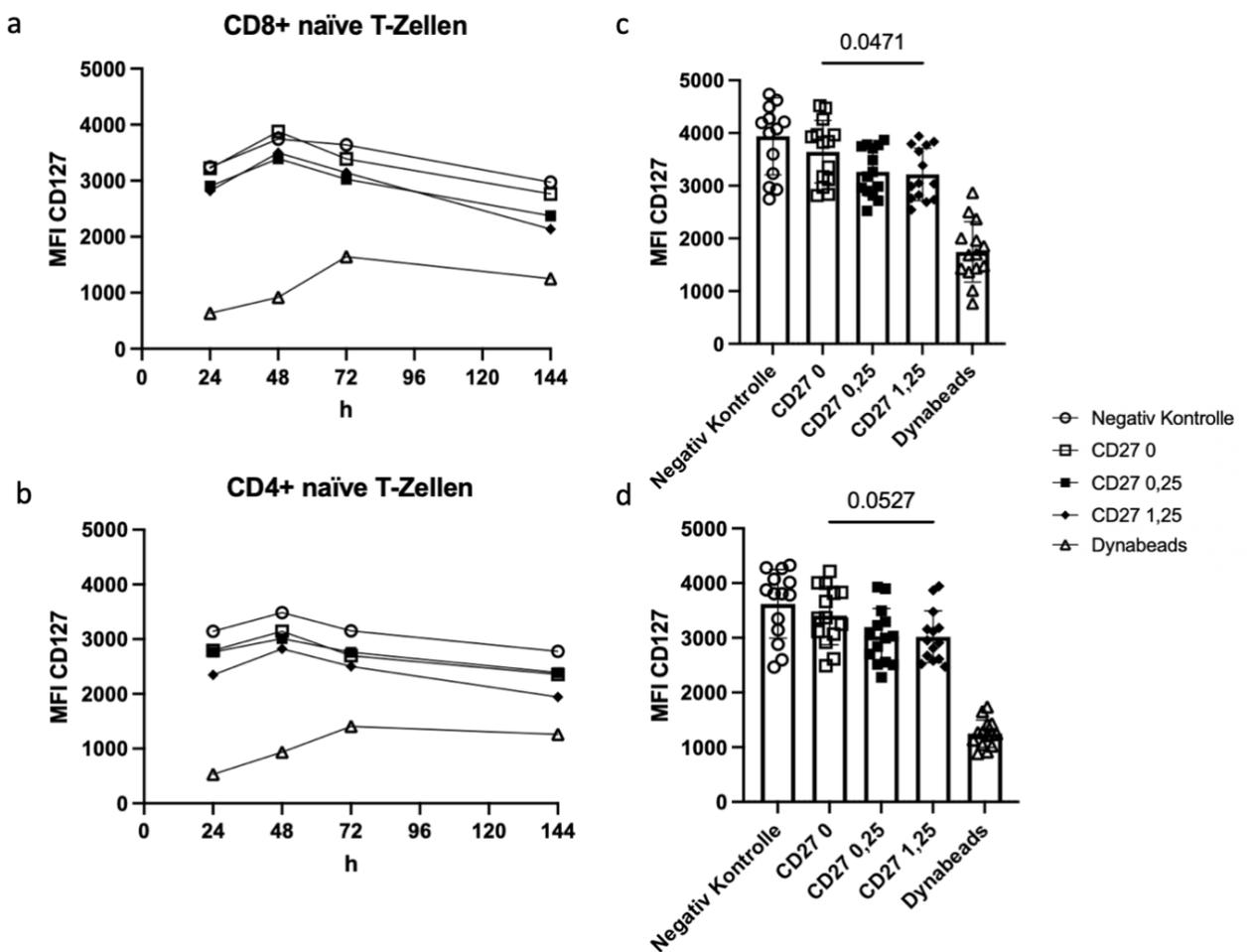


Abb. 18 CD127 Expression (IL7R α) auf der Oberfläche isolierter naiver T Zellen in Langzeitstimulation über 144 h.

Stimulation naiver CD4⁺/CD8⁺ T Zellen mit verschiedenen Konzentrationen CD27-AK (μ g/ml) über einen Zeitraum von 144 h. Negative Kontrolle = ohne Stimulation, Positivkontrolle = Dynabeads 0,5 μ l. In allen Messungen CD27 + 0,5 μ g/ml CD3-AK und 0,25 μ g/ml CD28-AK. a) und b): Messung der Expression von CD127 auf der Zelloberfläche von CD8⁺ Zellen und CD4⁺ Zellen als MFI über 144 h. Die Punkte stellen jeweils den Mittelwert der Messungen dar (n=7). c) und d): Expression von CD127 als MFI exemplarisch zum Zeitpunkt 72 h auf je CD8⁺ Zellen und CD4⁺ Zellen. Die Balkenhöhe stellt den Mittelwert aus den Messungen dar. Die senkrechten Linien im Balken stehen für die Standardabweichung. Die Zahl über den Abbildungen ist der p-Wert statistisch berechnet mittels des Welch-Test. (n=7)
Quelle: Eigene Abbildung

Für CD4⁺ Zellen ließ sich ein ähnlicher Effekt beobachten. Eine höhere Konzentration des CD27-Antikörpers führte zur stärkeren Mindereexpression des IL7R α . In der statistischen Analyse zeigte sich für die Konzentration von 1,25 μ g/ml des CD27 Antikörpers eine starke Korrelation zur IL7R α -Regulation. Diese war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 18 d, $p=0,0527$, Welch-Test).

Die genauere Betrachtung der IL7R α Regulation auf naiven T Zellen ähnelt somit dem Regulationsverhalten von PBMCs. Es konnte nach Aktivierung der Zellen ebenfalls eine verminderte Expression des Rezeptors beobachtet werden. Die Ko-Stimulation mit CD27 verstärkt diesen regulatorischen Effekt auf den IL7R α zusätzlich. Eine Re-Expression des Rezeptors konnte in diesem Modell nur für Dynabead-stimulierte Zellen gezeigt werden.

3.6.2. Gesteigertes Reaktivierungspotential naiver T Zellen nach Vorstimulation mit CD27 im Re-Stimulations-Assay

Im „*Two-Hit*“ Re-stimulations-Assay wurden isolierte naive T Zellen zu zwei Zeitpunkten stimuliert und im Anschluss die Reaktivierung der Zellen gemessen. Die Stimulation erfolgte an Tag 1 und erneut nach 7 Tagen jeweils mit und ohne Ko-Stimulation von CD27 (0,25 μ g/ml) (siehe 2.2.10). Die Zellen wurden zusätzlich jeweils mit denselben Mengen CD3- (0,5 μ g/ml) und CD28-Antikörpern (0,25 μ g/ml) stimuliert. Es wurde die Expression von CD40L als früher Aktivierungsmarker der Zellen und die Zytokine IFN γ und TNF α mittels Durchflusszytometrie gemessen. CD4⁺ und CD8⁺ naive T Zellen wurden separat analysiert. Erfolgreich aktivierte naive T Zellen wurden als doppelt positive Zellen festgelegt. Als doppelt positiv galten CD40L⁺IFN γ ⁺ oder CD40L⁺TNF α ⁺ T Zellen. Die Positivkontrolle waren naive T Zellen, welche zu beiden Zeitpunkten mit Dynabeads stimuliert wurden. Die Negativkontrolle wurde zu keinem Zeitpunkt stimuliert.

CD4⁺ naive T Zellen wiesen eine insgesamt geringe Produktion von TNF α auf. Diese blieb auch nach der Reaktivierung so niedrig, dass kein Unterschied in der Reaktivierung der verschiedenen vorstimulierten Zellen gemessen werden konnte (nicht abgebildet). Für CD40L⁺IFN γ ⁺ Zellen konnten jedoch ein Unterschied in der Reaktivierung festgestellt werden. CD4⁺ naive T Zellen, welche an Tag 1 mit CD27-Antikörper ko-stimuliert wurden, zeigten eine deutlich höhere Reaktivierung. Im Vergleich zu den naiven T Zellen, die nicht mit dem CD27-Antikörper vorstimuliert worden sind, lag ein signifikant höherer Anteil an CD40L⁺IFN γ ⁺ Zellen nach der Re-Stimulation vor (Abb.19, links).

Die Analyse der CD8⁺ naiven T Zellen zeigte nach einer Vorstimulation mit CD27 als Ko-Stimulator sowohl einen erhöhten Anteil an CD40L⁺TNFα⁺ als auch an CD40L⁺IFNγ⁺ Zellen am Tag der Re-Stimulation. Der Anteil an CD8⁺ CD40L⁺IFNγ⁺ exprimierenden Zellen war nach CD27-Vorstimulation erhöht, zeigte sich in der statistischen Analyse jedoch als nicht signifikant (nicht abgebildet). Nach initialer Ko-Stimulation mit CD27 wiesen CD8⁺ naive T Zellen am Tag der Re-Stimulation einen signifikant höheren Anteil an CD40L⁺TNFα⁺ exprimierenden Zellen auf als die Zellgruppe, welche an Tag 1 ohne CD27 stimuliert worden war (Abb. 19, rechts).

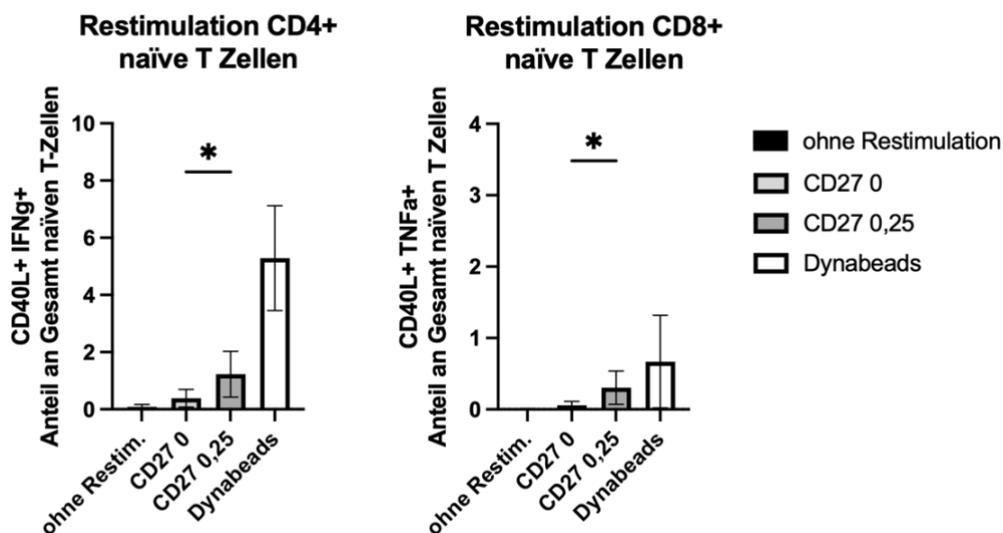


Abb. 19 "Two-Hit"-Re-stimulations Assay.

Stimulation naiver CD4⁺/CD8⁺ T Zellen an Tag 1 und Re-stimulation nach 7 Tagen. Stimulation an Tag 1 („Vorstimulation“) mit 0,5μg/ml CD3-AK, 0,25μg/ml CD28-AK und mit/ohne CD27 0,25μg/ml. Re-stimulation an Tag 7 mit CD3 und CD28 aber ohne CD27-AK. Anteil von CD40L⁺IFNγ⁺/CD40L⁺TNFα⁺ Zellen an Gesamt Naiven CD4⁺/CD8⁺T-Zellen in % (n=3). Statistische Auswertung mittels Welch Test. * = p<0,05 (signifikant). Quelle: Eigene Abbildung

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Experimente darauf hin, dass eine initiale Ko-Stimulation mit CD27 sich positiv auf die weitere Aktivität der T Zellen auswirkt. Nach CD27 Ko-Stimulation zu Beginn zeigten die naiven T Zellen ein deutlich erhöhtes Reaktivierungspotential im Sinne einer gesteigerten Zytokinproduktion.

3.7. Ergebnisse im Überblick

In der vorliegenden Arbeit ließ sich für naive T Zellen eine insgesamt höhere Aktivierungsschwelle im Vergleich zu einer gemischten T Zell Population (PBMCs) erkennen. Als Aktivierungsmarker wurden die Zytokinproduktion sowie die veränderte Expression der Oberflächenrezeptoren, wie in Abb.2 abgebildet, festgelegt. Trotz der Verbesserung der Stimulationsbedingungen durch das Antikörper-Coating blieb die Aktivierungsrate der naiven T Zellen gering und es fand lediglich eine Teilaktivierung der Zellen statt. Es konnte keine

vollständige Aktivierung mit Veränderung aller definierten Parameter erreicht werden. Die Zytokinproduktion der naiven T Zellen zeigte sich insgesamt gering. Die Oberflächenrezeptoren CD25 sowie CD45RA blieben konstant, lediglich der IL7R α zeigte den erwarteten Effekt nach der T Zell Aktivierung.

Die Verwendung des CD27 Antikörpers führte zu einer Steigerung der Zytokinproduktion von naiven T Zellen. Der regulatorische Effekt der T-Zell-Aktivierung auf die Expression des IL7R α auf PBMCs konnte ebenfalls für naive T Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte ein Zusammenhang der CD27-Stimulation mit dem Expressionslevel des IL7R α nachgewiesen werden. Die gesteigerte Stimulation des CD27 Ko-Rezeptors führte zu einer verminderten Expression des IL7R α an der Oberfläche der naiven T Zellen. Somit erwies die CD27-Stimulation in diesem *in vitro* Modell einen regulatorischen Effekt auf IL7R α . Im Re-Stimulationsmodell wurde der Einfluss von CD27 auf die Aktivierung der T Zellen bestätigt. Die Vorstimulation des Ko-Rezeptors bewirkte ein gesteigertes Reaktivierungspotential der naiven T Zellen im Sinne einer gesteigerten Zytokinproduktion nach Re-Stimulation. Um die Auswirkung der Abwesenheit von CD27 auf die Aktivität der T Zellen zu untersuchen, wurde ein Transduktionsmodell mit kommerziell erwerblichen shRNAs getestet. Aufgrund fehlender Effektivität der shRNAs konnten Konsequenzen der Abwesenheit von CD27 in diesem Modell nicht weiter aufgezeigt werden.

4. Diskussion

Patienten mit Tuberkulose weisen eine geringere Expression von CD27 auf den T Zellen auf. [74] Da T Zellen in der Pathogenese der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen, sind Veränderungen der Oberflächenrezeptoren und damit verbunden eine abweichende Funktionalität der Zellen von Bedeutung. Die verminderte Expression von CD27 bringt verschiedene Folgen mit sich. Unterschiedliche Studien belegten eingehend eine insgesamt verminderte Aktivität der T Zellen in Form einer verringerten Zytokinproduktion. [72-74] Dies resultiert in einer geringeren Rekrutierung weiterer Immunzellen wie Makrophagen und folglich einer verminderten Immunantwort. Die Dysfunktionalität der T Zellen fördert die Fähigkeit der Tuberkulosebakterien sich zu verbreiten und Gewebe zu zerstören. [64]

4.1. Lentivirale Transduktion als Tool zur Expressionskontrolle von CD27

Um weitere Aspekte der Abwesenheit von CD27 auf die Aktivierung der T Zellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Transduktion von shRNAs durchgeführt. Dieser Ansatz wurde in der Vergangenheit verwendet, um die Expression spezifischer Proteine zu verändern. [80] Güler et al. haben bereits Transduktionsexperimente nach demselben Verfahren wie in dieser Arbeit durchgeführt. Die Transduktion erfolgte an CD4⁺ T Zellen und das Zielprotein der Arbeitsgruppe war SOCS3. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten eine

ähnlich effektive Transduktion von shRNAs wie in den hier beschriebenen Ergebnissen. Im Vergleich zur Transduktion in dieser Arbeit (Transduktionsrate bis zu 45%) konnten sie eine Transduktionsrate von bis zu 57% erreichen. Die Transduktion erwies sich als erfolgreich und führte zum *knock-out* von SOCS3 und einer damit veränderten Funktionalität und Rezeptorexpression der T Zellen. [32]

In dieser Arbeit wurden für die Transduktion naive T Zellen verwendet. Das Ziel war eine verminderte Expression von CD27 auf den Zellen zu erreichen. Obwohl die Transduktion der shRNA-Klone erfolgreich war, konnte bei keinem der Klone eine Veränderung der CD27-Expression beobachtet werden. Der vorhergesagte Effekt der erworbenen shRNAs wurde nicht erreicht. Somit kann bei einer etablierten Methodik mit einer positiven Transduktion am ehesten von fehlerhaften shRNAs als Ursache für die nicht erfolgreiche Herunterregulation von CD27 ausgegangen werden.

Da eine alterierte T Zell Funktionalität in der Pathogenese der Tuberkulose eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, sind weitere Experimente essenziell, um die Konsequenzen einer verminderten CD27 Expression auf die Funktionalität der T Zellen in einem Modellsystem für die Tuberkulose weiter aufzuklären. Dies könnte sowohl die Testung weiterer shRNAs als auch die Testung anderer Ansätze zur Herunterregulierung des CD27 auf den T Zellen beinhalten.

4.2. Stimulationsbedingungen führten zu geringer Aktivierung naiver T Zellen mit niedriger Zytokinproduktion verglichen mit PBMCs

Die Kurzzeitstimulationsversuche zeigten eine insgesamt geringe Zytokinproduktion der naiven T Zellen. Diese konnte durch Optimierung der Stimulationsbedingungen zwar gesteigert werden, fiel jedoch verglichen mit PBMCs als Kontrolle weiterhin niedrig aus. Auch während der Langzeitstimulation zeigten die naiven T Zellen verglichen mit den PBMCs eine geringere Aktivierung. Diese konnte in Form von ausbleibenden Veränderungen der CD25 und der CD45RA/RO Expression erwiesen werden. Lediglich die IL7R α Expression verminderte sich wie erwartet nach der Stimulation. Die Herunterregulation des IL7R α nach Aktivierung der naiven T Zellen fiel jedoch geringer aus als auf der Oberfläche der PBMCs.

Diese Ergebnisse lassen auf eine Teilaktivierung der naiven T Zellen schließen. Diese lässt sich auf eine erhöhte Aktivierungsschwelle der naiven T Zellen im Vergleich zu PBMCs zurückführen. In PBMCs befinden sich neben naiven T Zellen, auch bereits aktivierte Effektor oder Gedächtnis T Zellen und APCs. Diese präsentieren zusätzliche stimulationssteigernde Faktoren wie aktivierende Oberflächenrezeptoren und produzieren stimulierender Zytokine. [81] Auch CD70 als Bindungspartner für CD27 wird auf APCs und aktivierten T Zellen

exprimiert. [37] Diese Gründe können zumindest teilweise die geringere Aktivierungsrate der isolierten naiven T Zellen verglichen mit PBMCs erklären.

Ziel dieser Arbeit war es den Effekt der CD27 Ko-Stimulation auf die Aktivierung naiver T Zellen genauer zu charakterisieren. Für die möglichst genaue Beurteilung der CD27 Ko-Stimulation ist es wichtig Störfaktoren aus den Experimenten bestmöglich auszuschließen (siehe 3.2). Dazu gehört insbesondere die Präsenz von CD70 als Bindungspartner. Weitere Faktoren stellen die aktivierten T Zellen und APCs mit zusätzlich stimulierenden Oberflächenproteinen und Zytokinen dar. Aus diesen Gründen wurden naive T Zellen als Zellgruppe für die Experimente verwendet. Dadurch kann die gezielte Stimulation von CD27 mit Hilfe des CD27-Antikörpers und dessen Auswirkung genauer beurteilt werden.

4.3. Antikörper *Coating* als überlegene Methode zur Verbesserung der Stimulationsbedingungen verglichen mit der Verwendung eines sekundären Antikörpers

Zur Steigerung der Aktivierung naiver T Zellen wurden zwei verschiedene Methoden getestet. Beide Ansätze verfolgen das Ziel der Antikörpervernetzung (*antibody cross-linking*). Durch diese Vernetzung kommt es zu einem Anstieg der T Zell Aktivierung durch Interaktion der Oberflächenrezeptoren.

Eine Methode zur Antikörpervernetzung ist die Zugabe eines sekundären Antikörpers, der diese Funktion übernimmt. Die Effektivität des hier verwendeten sekundären Antikörpers (RG7/7.6) wurde in den Arbeiten von Gravestein et al. bereits beschrieben. [41] Der sekundäre Antikörper wurde zusammen mit demselben CD27-Antikörper verwendet, welcher auch in dieser Arbeit als Ko-Stimulator benutzt wurde. Gravestein et al. zeigten eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate der T Zellen bei der Verwendung von CD27 als Ko-Stimulator. Durch die Zugabe des sekundären Antikörpers als *Crosslinker* des TCR zusätzlich zum CD27-AK konnte ein weiterer Anstieg der Proliferationsrate der T Zellen erzielt werden. Dies wurde auf eine gesteigerte Aktivität der T Zellen zurückgeführt. [41] In der vorliegenden Arbeit wurden anstatt der Proliferationsrate typische Veränderungen der Oberflächenrezeptoren als Aktivitätsparameter gewählt. Um einen positiven Effekt des sekundären Antikörpers auf die Aktivität der T Zellen zu erzielen, waren hohe Konzentrationen des Antikörpers notwendig. Diese hohen Konzentrationen von RG7/7.6 besaßen allerdings eine toxische Wirkung auf die naiven T Zellen. Eine negative Auswirkung des sekundären Antikörpers auf das Überleben der T Zellen war bisher nicht beschrieben. Die aufgeführten Ergebnisse zeigten insgesamt keinen ausreichend positiven Einfluss auf die Aktivität der T Zellen und der sekundäre Antikörper wurde als Folge davon für weitere Experimente nicht weiterverwendet.

Eine weitere Möglichkeit zum Erreichen des *Crosslinkings* der Rezeptoren ist das *Coating* der Well-Platten. Ein positiver Effekt dieser Methode konnte bereits von Vitale et al. nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger TCR-Stimulation wurde durch die Ko-Stimulation mit einem CD27-Antikörper (1F5) eine gesteigerte Zytokinproduktion erreicht. Dieser Effekt war jedoch nur bei der Verwendung immobilisierter Antikörper auf *gecoateten* Platten zu beobachten. Bei der Verwendung löslicher Antikörper blieb eine gesteigerte Aktivierung der T Zellen aus. Die *gecoateten* Platten ermöglichten ein *Cross-Linking* der Antikörper, welches notwendig war, um die Steigerung der Zytokinausschüttung der T Zellen zu erzielen. [82] In den Experimenten dieser Arbeit konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Unter der Verwendung von Antikörper benetzten Platten statt gelösten Antikörpern konnte eine gesteigerte Aktivierung der naiven T Zellen beobachtet werden. Dies war in Form einer gesteigerten Zytokinproduktion von IFN γ und TNF α messbar. Aus diesem Grund wurde das Verfahren des Antikörper *Coatings* für die weiteren Experimente verwendet.

4.4. Gesteigerte Aktivierung der T Zellen durch CD27 Ko-Stimulation

Eine wichtige Rolle des Ko-Rezeptors CD27 für die Aktivierung von T Zellen konnte bereits in früheren Arbeiten von Gravestain et al. gezeigt werden. Als Aktivierungsparameter der T Zellen wurde hier die Proliferationsrate benutzt. Unter Verwendung desselben Antikörpers wie in den hier beschriebenen Ergebnissen, konnte die Arbeitsgruppe eine signifikant erhöhte Proliferationsrate der T Zellen nachweisen. In diesem Modell wurde mit optimalen Konzentrationen des CD27-Antikörpers eine bis zu 4fach gesteigerte Proliferationsrate der T Zellen verglichen mit reiner TCR-Stimulation erreicht. Diese Ergebnisse zeigen bereits einen positiven Effekt der CD27 Ko-Stimulation auf die Aktivität der T Zellen. [41, 83]

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten konnte ebenfalls ein Einfluss der CD27 Ko-Stimulation zusätzlich zum TCR auf naive T Zellen dargestellt werden. Nach ihrer Aktivierung schütten T Zellen Zytokine aus. Diese wurden durch Zugabe von Brefeldin intrazellulär gespeichert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Durch zusätzliche Stimulation des CD27 Ko-Rezeptors konnten diese Zytokine vermehrt werden. Die Effektivität des verwendeten Antikörpers konnte in diesem Modell bewiesen und ein positiver Einfluss auf die Aktivierung der naiven T Zellen gezeigt werden. Diese Resultate korrelieren mit denen von Gravestain et al. und unterstützen den beschriebenen positiven Effekt des Ko-Rezeptors auf die Aktivierung von T Zellen.

Auch die Arbeitsgruppe Ramakrishna et al. untersuchten die Auswirkung einer CD27 Ko-Stimulation auf die Aktivität von T Zellen. Sie verwendeten hierfür Varlilumab als weiteren CD27-Antikörper. Im *in-vitro* Modell konnte bei Ko-Stimulation von CD27 zusätzlich zur TCR-Stimulation ebenfalls eine gesteigerte Zytokinantwort nachgewiesen werden. Der Höhepunkt der T-Zell Antwort wurde nach 72h Stimulation erreicht. Bei den Zytokinen handelte es sich

um Th1 Zytokine, welche unter anderem IFN γ und TNF α beinhalten. Zusätzlich zur erhöhten Zytokinausschüttung wurde eine gesteigerte Proliferation der aktivierten Zellen beobachtet. [40] Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen den positiven Effekt der CD27 Ko-Stimulation auf die Proliferation und Aktivierung im Sinne einer erhöhten Zytokinproduktion der T Zellen. Sie stimmen mit den Resultaten dieser Arbeit und denen von Gravestain et al. überein.

4.5. Unterschiedliches Regulationsverhalten des IL7R α in verschiedenen Zellpopulationen

In dieser Arbeit wurde der Unterschied im Regulationsverhalten verschiedener Oberflächenrezeptoren zwischen naiven T Zellen und PBMCs untersucht. PBMCs wiesen nach AK-Stimulation eine deutlich verminderte Expression des IL7R α auf. Ab dem Messzeitpunkt 72h war eine steigende Re-Expression des Rezeptors auf den Zellen zu erkennen. Der regulatorische Effekt der T Zell Aktivierung auf den IL7R α ließ sich auf naiven T Zellen ebenfalls beobachten. Die Regulation des Rezeptors fiel verglichen mit PBMCs aber deutlich geringer aus. Die verminderte Expression des IL7R α auf naiven T Zellen verblieb nach der Stimulation für den gesamten Beobachtungszeitraums stabil, eine Re-Expression zeigte sich nicht. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten von Alves et al., die in ihrer Arbeit eine verminderte Expression von IL7R α auf naiven T Zellen sowohl nach TCR-Stimulation als auch nach Zugabe von IL7 als Substrat zeigten. Die initiale verminderte Expression blieb nach Beendigung der TCR-Stimulation für den gesamten Zeitraum von 72h stabil. Bei Entzug des Stimulus IL7 durch Waschen der Zellen wurde der IL7R α im Gegensatz dazu innerhalb weniger Stunden auf der Zelloberfläche deutlich re-exprimiert. [31]

Güler et al. untersuchten in ihrem Modell die Re-Expression des IL7R α auf PBMCs. Sie überwachten die IL7R α -Expression über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Aktivierung der Zellen über die TCR-Stimulation. Hierbei begann die Re-Expression des IL7R α ab Tag 3-4 und erreichte am Ende beinahe das Ausgangsniveau von vor der Stimulation. [32] Dieses Re-Expressionsmuster konnte in den oben beschriebenen Versuchen auf PBMCs ab 72h ebenfalls beobachtet werden.

In Zusammenschau der verschiedenen Studien und der eigenen Ergebnisse lässt sich ein unterschiedliches Regulationsverhalten der verschiedenen Zellpopulationen vermuten. Auf den gleichen Stimulus reagieren naive T Zellen nicht nur insgesamt mit einer verminderten Aktivierung, sondern besitzen auch einen weniger starken regulatorischen Effekt des IL7R α verglichen mit PBMCs. Naive T Zellen zeigen im Gegensatz zu den PBMCs keine Re-Expression des Rezeptors nach initialer Stimulation.

4.6. CD27-AK beeinflusst die Aktivität naiver T Zellen und die Expression des IL7R α

In den Experimenten dieser Arbeit konnte durch CD27 Ko-Stimulation eine gesteigerte Aktivierung von naiven T Zellen nachgewiesen werden. Messbar war dies anhand einer gesteigerten Zytokinproduktion und an veränderten Oberflächenrezeptoren. Hier spielte IL7R α die wichtigste Rolle, da die weiteren Rezeptoren in dem in dieser Arbeit beschriebenen Stimulationsansatz nur bedingt ihr Expressionsmuster veränderten. Die verminderte Expression des IL7R α deutet auf die gesteigerte Aktivierung der naiven T Zellen nach CD27 Ko-Stimulation hin. Eine gesteigerte Aktivierung der T Zellen nach CD27 Ko-Stimulation zeigten auch Dong et al. in ihren Versuchen. Sie führten in einem Virus-Immunisierungsmodell mit Mäusen Stimulationsansätze von T Zellen durch. Die gesteigerte Aktivierung der T Zellen äußerte sich in diesem Modell zum einen durch erhöhte Aktivierungsmarker und zum anderen als verbesserte Immunabwehr in Form eines verminderten Virustiters. [44, 45]

Die Arbeitsgruppe von Dong et al. konnte darüber hinaus einen Zusammenhang der CD27-Kostimulation und der Expression des IL7R α feststellen. Die Stimulation von CD27 zu einem frühen Zeitpunkt führte im Mausmodell nicht zur Beeinflussung des IL7R α . Es konnte für diesen Zeitpunkt der Stimulation lediglich eine gering gesteigerte Aktivierung der T Zellen nachgewiesen werden. Bei Ko-Stimulation von CD27 zu einem späten Zeitpunkt (48h nach initialer Aktivierung und damit bereits verminderter Expression des IL7R α) beobachteten Dong et al. eine vermehrte Re-Expression des IL7R α . [45] In den Experimenten dieser Arbeit konnte ebenfalls ein direkter Einfluss der CD27-Stimulation auf die Expression des IL7R α auf naiven T Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dong et al. führte eine initiale Antikörper-Stimulation von CD27 als Ko-Rezeptor allerdings zur Verringerung der Expression des IL7R α (siehe 3.6.1). Es konnte mit und ohne CD27 Ko-Stimulation keine Re-Expression des Rezeptors auf naiven T Zellen beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern den Kenntnisstand, da die bereits beschriebenen Daten sich nur teilweise mit den Resultaten dieser Arbeit decken. Zwar konnte hier ebenso eine vermehrte Aktivierung der T Zellen nach Ko-Stimulation mit CD27 nachgewiesen werden, so wirkte sich die Aktivierung des Ko-Rezeptors jedoch unterschiedlich auf den IL7R α aus. Eine Ursache dafür könnte in den verschiedenen Stimulationsbedingungen der Arbeiten liegen. Während in dieser Arbeit humane naive T Zellen verwendet wurden, benutzten Dong et al. murine T Zellen. Außerdem wurden alle Versuche dieser Arbeit *in vitro* durchgeführt. Die murinen Zellen wurden nach *in vitro* Stimulation zur Beobachtung der IL7R α Re-Expression *in vivo* zurücktransferiert. Somit lässt sich das Einwirken zusätzlicher Faktoren auf die Re-Expression des Rezeptors *in vivo* nicht ausschließen. Weiterhin bleibt offen, ob der

identifizierte Unterschied hinsichtlich der Expression von IL7R α auf unterschiedliche Regulationsmechanismen in murinen und humanen T Zellen begründet liegt. [44, 45]

4.7. CD27 verändert die sekundäre Immunantwort der T Zellen

Ein weiterer beschriebener Effekt der CD27 Ko-Stimulation ist das Schaffen eines Überlebenssignals für naive T Zellen. Dieses Signal befähigt naive Zellen zu proliferieren und sich zu Effektor T Zellen zu differenzieren. [84] Dieser Effekt ist essenziell für den Erhalt einer sekundären Immunantwort der T Zellen. [85]

Dong et al. konnten einen Einfluss der Stimulation von CD27 auf die sekundäre Immunantwort nachweisen. Die Stimulation des Ko-Rezeptors erfolgte in unterschiedlichen Mausmodellen simultan mit der TCR-Stimulation oder verspätet nach 48h. Durch die Blockade der CD27-CD70 Interaktion stellten sie eine verminderte sekundäre Immunantwort in Form eines erhöhten Virustiters fest (Virus-Immunisierungs-Modell an Mäusen). Damit einhergehend zeigten die Experimente nach simultaner CD27 Ko-Stimulation eine Steigerung der sekundären Immunantwort der CD8⁺ T Zellen und damit eine verbesserte Funktion der T Zellen. [44] Die Abwesenheit von CD27 führte auch in anderen Arbeiten zu einer verminderten Proliferationsrate und zur reduzierten Fähigkeit der T Zellen auf TCR-Stimulation zu reagieren. [86] Durch eine Blockade der CD27-CD70 Achse zeigte sich eine deutlich verminderte, nicht effektive sekundäre Immunantwort auf verschiedene Pathogene. [85, 87]

In dieser Arbeit konnte im „*Two-Hit*“ Re-Stimulations-Assay ebenfalls eine entscheidende Rolle der CD27-Kostimulation für das Reaktivierungspotential der T Zellen nachgewiesen werden. In diesem Modell wurde nach initialer Ko-Stimulation mit CD27 eine signifikant erhöhte sekundäre Immunantwort der T Zellen in Form einer gesteigerten Zytokinproduktion festgestellt. Diese Daten unterstützen die beschriebene wichtige Rolle der CD27-CD70 Interaktion für die Generation einer sekundären Immunantwort. Der Einfluss von CD27 auf die Zytokinproduktion bei Reaktivierung der T Zellen stellt zudem eine weitere möglich Ursache der gestörten sekundären Immunantwort bei Blockade der CD27-CD70 Interaktion dar.

4.8. Möglicher Zusammenhang einer verminderten IL7R α und CD27

Expression auf T Zellen von Patienten mit Tuberkulose

Die Expression des IL7R α auf T Zellen zeigt sich bei unterschiedlichen latenten und chronischen Viruserkrankungen verändert. Eine chronische Aktivierung des Immunsystems führt über die kontinuierliche Aktivierung der T Zellen zu einer verminderten Expression des IL7R α . Die reduzierte Oberflächenpräsentation des IL7R α bedingt eine geringere Aktivierung der Signalkaskade durch IL7. Da IL7 das Überleben der T Zellen durch anti-apoptotische Proteinexpression und das Formen von Gedächtniszellen fördert, fallen diese Funktionen vermindert aus. [88]

Auch für Patienten mit aktiver Tuberkulose konnte ein verändertes Expressionsmuster des IL7R α festgestellt werden. Lundtoft et al. zeigten für diese T Zellen eine geringere Expression des IL7R α an der Membranoberfläche. Gleichzeitig stellte sich ein erhöhter IL7 Spiegel im Plasma der Patienten bei reduzierter Sensitivität der T Zellen für IL7 dar. Gemeinsam führen diese beiden Effekte zu einer weniger starken Aktivierung der IL7-Signalkaskade inklusive der IL7-induzierten Zytokinfreisetzung. Die T Zell Funktion zeigt sich somit als negativ beeinträchtigt im Vergleich zu gesunden Patienten. [70]

Neben der veränderten Expression des IL7R α wurde auf T Zellen von Tuberkulosepatienten eine verminderte CD27-Präsentation festgestellt. Diese wird ebenfalls mit einer Dysfunktion der T Zellen assoziiert. Die Zellen weisen eine verminderte Aktivität, sowie einen proapoptischen Phänotyp auf. Außerdem ist die Zytokinproduktion gestört. [64, 72] Die verminderte Expression beider Parameter legt die Frage nach einem direkten Zusammenhang dieser nahe. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen einen direkten Einfluss der CD27-Stimulation auf die IL7R α -Oberflächenpräsentation von naiven T Zellen nach. Jedoch konnte für die CD27 Stimulation in dieser Arbeit ein negativer Effekt auf die Expression des IL7R α festgestellt werden. Die Ko-Stimulation von CD27 führte zur verstärkten Herunterregulation des IL7R α . Die beiden Rezeptoren verhielten sich gegenteilig. Dieser direkte Zusammenhang erklärt demnach nicht die gleichzeitige Verminderung von CD27 und IL7R α .

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten andere Studien eine positive Korrelation beider Rezeptoren darlegen. Diese wurde in Form der gesteigerten Re-Expression des IL7R α gezeigt. Durch CD27 Ko-Stimulation 48h nach initialer Aktivierung wurde die Re-Expression des IL7R α verstärkt. Als Rückschluss würde die verminderte Expression von CD27 in Tuberkulosepatienten zu einer geringeren Präsentation von IL7R α führen. Diese Ergebnisse wurden im *in vivo* Mausmodell beobachtet. [44, 45] Die verminderte Oberflächenpräsentation der beiden Rezeptoren könnte durch weitere *in vivo* vorhandene Faktoren beeinflusst werden, die nach Isolation und *in vitro* Stimulation fehlen. Außerdem könnte das veränderte Expressionsmuster der Rezeptoren durch die insgesamt veränderte T Zell Funktion in Tuberkulosepatienten hervorgerufen werden und somit nicht nur Ursache, sondern auch Folge der T Zell Dysfunktion sein.

4.9. Limitationen

Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit ist aufgrund der gewählten Methodik mit Limitationen behaftet, die im Folgenden diskutiert werden. In den beschriebenen Modellen mit naiven T Zellen wurden nur suboptimale Stimulationsbedingungen erreicht. Der *Coating*-Ansatz führte zu einer Verbesserung der Bedingungen und einer gesteigerten Aktivierungsrate der naiven T Zellen. Trotz dessen konnte weiterhin nur eine Teilaktivierung der Zellen erzielt werden. Durch die *in vitro* Stimulation konnte nur die IL7R α Expression, nicht jedoch die von

CD25 und CD45RA beeinflusst werden. Die Aktivierungsschwelle der naiven T Zellen liegt, wie oben beschrieben, deutlich höher als bei PBMCs. Mithilfe der beschriebenen *in vitro* Modelle kann der Einfluss einzelner Faktoren, wie die CD27 Ko-Stimulation, mit möglichst wenigen Störfaktoren untersucht werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass auch *in vivo* weitere Zelltypen mit inhibierenden oder aktivierenden Oberflächenrezeptoren vorliegen, welche mit dem CD27 Rezeptor interagieren können.

Für die vorliegenden Ergebnisse wurden humane T Zellen von gesunden Spendern verwendet. Für die Aussagekraft der *in vitro* durchgeführten Versuche stellt dies kein Problem dar. Um jedoch einen genauen Zusammenhang zur Pathogenese der Tuberkulose herstellen zu können, sollten weitere Versuche mit T Zellen dieser Spendergruppe durchgeführt werden.

Für die Auswertung wurde die durchflusszytometrische Analyse gewählt. Mit dieser Methode können die einzelnen Zellen auf verschiedenste Marker genau untersucht werden. Allerdings können die Zellen nur einmalig für die Messung im Durchflusszytometer verwendet und im Anschluss nicht weiter inkubiert werden. Im Langzeitstimulationsmodell müssen somit für jeden Messzeitpunkt verschiedene Platten mit denselben Antikörperkonzentrationen verwendet werden. Es wurden im Verlauf gleiche Zellpopulationen unter den gleichen Bedingungen für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Es handelt sich somit nicht um genau dieselben Zellen über den gesamten Messzeitraum. Messungenauigkeiten führen so zu einer erhöhten Variabilität im *Readout* und der finalen statistischen Analyse. Durch möglichst sorgfältiges Arbeiten lassen sich diese Fehler geringhalten. Ein Einfluss auf die Ergebnisse durch diese Methodik lässt sich jedoch nicht vollständig ausschließen.

4.9.1. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte ein Einfluss der CD27 Ko-Stimulation auf naive T Zellen festgestellt werden. Die Aktivierung des Ko-Rezeptors führte zu einer erhöhten Aktivierungsrate der naiven T Zellen. Es wurde zudem ein direkter Zusammenhang zwischen der CD27 Stimulation und der Expression des IL7R α nachgewiesen. Die vermehrte Aktivierung des Ko-Rezeptors führte zur Herunterregulation des IL7R α auf der Oberfläche der naiven T Zellen. Die beeinträchtigte Expression beider Rezeptoren auf T Zellen von Tuberkulosepatienten kann dadurch nicht erklärt werden. Allerdings wurde ein gesteigertes Reaktivierungspotential durch initiale Ko-Stimulation von CD27 erreicht. Bei Minderexpression von CD27 auf T Zellen von Tuberkulosepatienten kann dies im Umkehrschluss zur Dysfunktionalität der Zellen beitragen. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Rolle der verminderten CD27 Expression in der Pathogenese der Tuberkulose nahe. Die Stimulation des Ko-Rezeptors nimmt entscheidenden Einfluss auf die Aktivität und Funktionalität der T Zellen. Um den genauen Mechanismus des CD27-Einflusses auf die Immunpathogenese der Tuberkulose zu klären, sind weitere Experimente mit Zellen dieser Spendergruppe essenziell. Die vorliegende Arbeit konnte somit

zur Erweiterung des Wissenstandes über den Einfluss der CD27 Ko-Stimulation auf die primäre und sekundäre Aktivität naiver T Zellen und die Regulation des IL7R α beitragen. Sie liefert damit eine gute Ausgangsposition für weitere Studien zur Bestimmung der Rolle des CD27 Ko-Rezeptors in der Pathogenese der Tuberkulose.

5. Literaturverzeichnis

1. Murphey, K., Weaver C., *Janeway Immunologie*. Vol. 9. 2018, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
2. Levelt, C.N., R. Carsetti, and K. Eichmann, *Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes*. *J Exp Med*, 1993. **178**(6): p. 1867-75.
3. Mousset, C.M., et al., *Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry*. *Cytometry A*, 2019. **95**(6): p. 647-654.
4. Li, Y., et al., *Cytokine production by highly purified human CD8+ T cells*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **107**(1-3): p. 354-5.
5. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 925135.
6. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
7. Lefrancois, L. and A.L. Marzo, *The descent of memory T-cell subsets*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(8): p. 618-23.
8. Tao, X., et al., *Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation*. *J Immunol*, 1997. **159**(12): p. 5956-63.
9. Azuma, M., *Co-signal Molecules in T-Cell Activation : Historical Overview and Perspective*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1189**: p. 3-23.
10. Azuma, M., et al., *CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1992. **175**(2): p. 353-60.
11. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. *Cytokine*, 2015. **74**(1): p. 5-17.
12. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 2-17.
13. Casamayor-Palleja, M., M. Khan, and I.C. MacLennan, *A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex*. *J Exp Med*, 1995. **181**(4): p. 1293-301.
14. Malek, T.R. and I. Castro, *Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity*. *Immunity*, 2010. **33**(2): p. 153-65.
15. Stauber, D.J., et al., *Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(8): p. 2788-93.
16. Kim, H.P., J. Kelly, and W.J. Leonard, *The basis for IL-2-induced IL-2 receptor alpha chain gene regulation: importance of two widely separated IL-2 response elements*. *Immunity*, 2001. **15**(1): p. 159-72.
17. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(5): p. 426-32.
18. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 6571-6.
19. Sudo, T., et al., *Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(19): p. 9125-9.

20. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
21. Pellegrini, M., et al., *Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 528-36.
22. Pellegrini, M., et al., *IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology*. Cell, 2011. **144**(4): p. 601-13.
23. Henriques, C.M., et al., *IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3269-77.
24. Park, J.H., et al., *Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 289-302.
25. Rane, L., et al., *Alternative splicing of interleukin-7 (IL-7) and interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis (MS)*. J Neuroimmunol, 2010. **222**(1-2): p. 82-6.
26. Rheinlander, A., B. Schraven, and U. Bommhardt, *CD45 in human physiology and clinical medicine*. Immunol Lett, 2018. **196**: p. 22-32.
27. Mason, D., *Subsets of CD4+ T cells defined by their expression of different isoforms of the leucocyte-common antigen, CD45*. Biochem Soc Trans, 1992. **20**(1): p. 188-90.
28. Akbar, A.N., et al., *Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells*. J Immunol, 1988. **140**(7): p. 2171-8.
29. Wills, M.R., et al., *Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45ROhigh to CD45RAhigh in vivo: CD45RAhighCD8+ T cells comprise both naive and memory cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7080-7.
30. Hassan, J. and D.J. Reen, *Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1970-6.
31. Alves, N.L., et al., *Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5201-10.
32. Guler, A., et al., *Suppressor of cytokine signalling 3 is crucial for interleukin-7 receptor re-expression after T-cell activation and interleukin-7 dependent proliferation*. Eur J Immunol, 2020. **50**(2): p. 234-244.
33. Hintzen, R.Q., et al., *Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2426-35.
34. Hintzen, R.Q., et al., *Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the TNF gene family*. J Immunol, 1994. **152**(4): p. 1762-73.
35. de Jong, R., et al., *Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors*. J Immunol, 1991. **146**(8): p. 2488-94.
36. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.
37. Tesselaar, K., et al., *Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 33-40.
38. Lens, S.M., et al., *Antigen-presenting cell-derived signals determine expression levels of CD70 on primed T cells*. Immunology, 1997. **90**(1): p. 38-45.
39. Huang, J., et al., *Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 expression on CD8+ T cells: importance for the therapeutic effectiveness of cell transfer immunotherapy*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7726-35.

40. Ramakrishna, V., et al., *Characterization of the human T cell response to in vitro CD27 costimulation with varililumab*. J Immunother Cancer, 2015. **3**: p. 37.
41. Gravestain, L.A., et al., *Novel mAbs reveal potent co-stimulatory activity of murine CD27*. Int Immunol, 1995. **7**(4): p. 551-7.
42. Dolfi, D.V., et al., *Late signals from CD27 prevent Fas-dependent apoptosis of primary CD8+ T cells*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 2912-21.
43. Remedios, K.A., et al., *CD27 Promotes CD4(+) Effector T Cell Survival in Response to Tissue Self-Antigen*. J Immunol, 2019. **203**(3): p. 639-646.
44. Dong, H., et al., *CD27 stimulation promotes the frequency of IL-7 receptor-expressing memory precursors and prevents IL-12-mediated loss of CD8(+) T cell memory in the absence of CD4(+) T cell help*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3829-38.
45. Dong, H., et al., *Frontline Science: Late CD27 stimulation promotes IL-7Ralpha transcriptional re-expression and memory T cell qualities in effector CD8(+) T cells*. J Leukoc Biol, 2019. **106**(5): p. 1007-1019.
46. Hashimoto-Okada, M., et al., *The CD70-CD27 interaction during the stimulation with dendritic cells promotes naive CD4(+) T cells to develop into T cells producing a broad array of immunostimulatory cytokines in humans*. Int Immunol, 2009. **21**(8): p. 891-904.
47. Turner, R.D. and G.H. Bothamley, *Cough and the transmission of tuberculosis*. J Infect Dis, 2015. **211**(9): p. 1367-72.
48. Loudon, R.G. and R.M. Roberts, *Droplet expulsion from the respiratory tract*. Am Rev Respir Dis, 1967. **95**(3): p. 435-42.
49. Balasubramanian, V., et al., *Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization*. Tuber Lung Dis, 1994. **75**(3): p. 168-78.
50. Bloom, B.R. and C.J. Murray, *Tuberculosis: commentary on a reemergent killer*. Science, 1992. **257**(5073): p. 1055-64.
51. Vynnycky, E. and P.E. Fine, *Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis*. Am J Epidemiol, 2000. **152**(3): p. 247-63.
52. Arend, S.M., et al., *Repeatedly negative tuberculin skin tests followed by active tuberculosis in an immunocompetent individual*. Neth J Med, 2001. **58**(2): p. 76-81.
53. Lillebaek, T., et al., *Molecular evidence of endogenous reactivation of Mycobacterium tuberculosis after 33 years of latent infection*. J Infect Dis, 2002. **185**(3): p. 401-4.
54. Gengenbacher, M. and S.H. Kaufmann, *Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 514-32.
55. Sakula, A., *Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882*. Thorax, 1982. **37**(4): p. 246-51.
56. van Soolingen, D., et al., *A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa*. Int J Syst Bacteriol, 1997. **47**(4): p. 1236-45.
57. (WHO), W.H.O., *Global tuberculosis report 2021*. 2021.
58. MacNeil, A., et al., *Global Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets - Worldwide, 2018*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2020. **69**(11): p. 281-285.
59. Wolday, D., et al., *Low CD4+ T-cell count and high HIV viral load precede the development of tuberculosis disease in a cohort of HIV-positive Ethiopians*. Ethiop Med J, 2003. **41 Suppl 1**: p. 67-73.

60. Cooper, A.M., et al., *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2243-7.
61. Khan, N., et al., *T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects*. Crit Rev Microbiol, 2017. **43**(2): p. 133-141.
62. Sakamoto, K., *The pathology of Mycobacterium tuberculosis infection*. Vet Pathol, 2012. **49**(3): p. 423-39.
63. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
64. Day, C.L., et al., *Patients with tuberculosis disease have Mycobacterium tuberculosis-specific CD8 T cells with a pro-apoptotic phenotype and impaired proliferative capacity, which is not restored following treatment*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94949.
65. Jurado, J.O., et al., *Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 116-25.
66. Harling, K., et al., *Constitutive STAT3 phosphorylation and IL-6/IL-10 co-expression are associated with impaired T-cell function in tuberculosis patients*. Cell Mol Immunol, 2019. **16**(3): p. 275-287.
67. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
68. Sieling, P.A., et al., *IL-7 in the cell-mediated immune response to a human pathogen*. J Immunol, 1995. **154**(6): p. 2775-83.
69. Maeurer, M.J., et al., *Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2962-70.
70. Lundtoft, C., et al., *Aberrant plasma IL-7 and soluble IL-7 receptor levels indicate impaired T-cell response to IL-7 in human tuberculosis*. PLOS Pathogens, 2017. **13**(6): p. e1006425.
71. De Jong, R., et al., *The CD27- subset of peripheral blood memory CD4+ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo*. Eur J Immunol, 1992. **22**(4): p. 993-9.
72. Jiang, J., et al., *Reduced CD27 expression on antigen-specific CD4+ T cells correlates with persistent active tuberculosis*. J Clin Immunol, 2010. **30**(4): p. 566-73.
73. Nikitina, I.Y., et al., *Mtb-specific CD27low CD4 T cells as markers of lung tissue destruction during pulmonary tuberculosis in humans*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43733.
74. Adankwah, E., et al., *CD27 expression of T-cells discriminates IGRA-negative TB patients from healthy contacts in Ghana*. Microbes Infect, 2020. **22**(1): p. 65-68.
75. Pai, M. and M. Behr, *Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(5).
76. Kapina, M.A., et al., *CD27low CD4 T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27high precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 976-85.
77. Dinter, A. and E.G. Berger, *Golgi-disturbing agents*. Histochem Cell Biol, 1998. **109**(5-6): p. 571-90.
78. Kleinsteinuber, K., et al., *SOCS3 promotes interleukin-17 expression of human T cells*. Blood, 2012. **120**(22): p. 4374-82.
79. Denoed, J. and M. Moser, *Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(2): p. 195-203.

80. Paddison, P.J., et al., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. *Genes Dev*, 2002. **16**(8): p. 948-58.
81. Bolen, C.R., M. Uduman, and S.H. Kleinstein, *Cell subset prediction for blood genomic studies*. *BMC Bioinformatics*, 2011. **12**: p. 258.
82. Vitale, L.A., et al., *Development of a human monoclonal antibody for potential therapy of CD27-expressing lymphoma and leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(14): p. 3812-21.
83. Gravestien, L.A., et al., *CD27 cooperates with the pre-T cell receptor in the regulation of murine T cell development*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 675-85.
84. Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao, *CD27 and CD70 in T cell and B cell activation*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(3): p. 275-81.
85. Hendriks, J., et al., *CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(5): p. 433-40.
86. Dolfi, D.V. and P.D. Katsikis, *CD28 and CD27 costimulation of CD8+ T cells: a story of survival*. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **590**: p. 149-70.
87. Welten, S.P., et al., *CD27-CD70 costimulation controls T cell immunity during acute and persistent cytomegalovirus infection*. *J Virol*, 2013. **87**(12): p. 6851-65.
88. Crawley, A.M. and J.B. Angel, *The influence of HIV on CD127 expression and its potential implications for IL-7 therapy*. *Semin Immunol*, 2012. **24**(3): p. 231-40.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Antikörper zur Reinheitsbestimmung naïver T Zellen.....	22
Tabelle 2 Antikörper extrazelluläre Marker.....	29
Tabelle 3 Antikörper intrazelluläre Färbung.....	29
Tabelle 4 Antikörper zur extrazellulären Färbung nach Langzeitstimulation	29
Tabelle 5 Antikörper des „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assay	30
Tabelle 6 Antikörper zur Messung nach shRNA-Transduktion.....	33

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der diversen Ko-Rezeptoren und deren Bindungspartner	6
Abb. 2 Schematische Darstellung der T Zell Aktivierung	6
Abb. 3 Der IL2R in seinen zwei verschiedenen Formen.....	7
Abb. 4 Der IL7 Rezeptor als heterodimerer Rezeptor	8
Abb. 5 Schematische Darstellung des Coatings.....	23
Abb. 6 „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assay (Stimulation mit später Re-Stimulation).....	26
Abb. 7 Flowchart als Übersicht über die Antikörperfärbung nach den verschiedenen Stimulationsmodellen	28
Abb. 8 Gatingstrategie für die Auswertung der Kurzzeitstimulation.....	35
Abb. 9 Gatingstrategie für die Auswertung der Langzeitstimulation	36
Abb. 10 Gatingstrategie für die Auswertung des „Two-Hit“ Re-Stimulations-Assays ...	37
Abb. 11 Gatingstrategie für die Auswertung der Transduktion	38
Abb. 12 Bestimmung der Transduktionsrate sowie der CD27-Expression.....	39
Abb. 13 Transduktion naïver T Zellen mittels shRNAs.....	41
Abb. 14 Vergleich löslicher Antikörper und gecoatete Platten	44
Abb. 15 Stimulation isolierter naïver T Zellen mit gelösten Antikörpern sowie einem sekundären Antikörper.....	46
Abb. 16 Kurzzeitstimulation naïver T Zellen zur Testung des CD27-Antikörpers.....	48
Abb. 17 Vergleich PBMCs und naïver T Zellen über einen Stimulationszeitraum von 144h.	50
Abb. 18 CD127 Expression (IL7R α) auf der Oberfläche isolierter naïver T Zellen in Langzeitstimulation über 144 h.....	52
Abb. 19 “Two-Hit”-Re-stimulations Assay.....	54

Danksagung

Mein Dank geht an die gesamte AG Jacobsen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, insbesondere an Herrn Prof. Dr. Marc Jacobsen, Dr. Julia Seyfarth sowie Ju-Young Kim. Weiterhin möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die durchgehende Unterstützung danken.