



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Assessing T cell differentiation at the single-cell level

Gerlach, C.

Citation

Gerlach, C. (2012, January 17). *Assessing T cell differentiation at the single-cell level*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18361>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18361>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



NEDERLANDSE SAMENVATTING

CURRICULUM VITAE

LIST OF PUBLICATIONS



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Deze samenvatting heeft tot doel om in niet-specialistische taal het onderwerp van dit proefschrift uit te leggen, hoe het onderzoek daarnaar gedaan is en wat de uitkomsten van het onderzoek zijn.

Kort samengevat heb ik in dit proefschrift onderzocht hoe individuele T-cellen (een bepaald type afweercellen) op een infectie reageren. In het verleden is veel kennis vergaard over de reactie van een grote groep T-cellen op infectie, maar aangezien niet noodzakelijkerwijs elk lid van een groep hetzelfde gedrag vertoont, wilde ik weten in welk opzicht de individuele groepsleden gelijk zijn of verschillen. Immers, de constatering dat Duitsers 'Bratwurst' eten betekent nog niet dat elke Duitser Bratwurst eet, of dat de Duitsers die Bratwurst eten dit tijdens elke maaltijd doen.

Inleiding

Ons lichaam wordt voortdurend blootgesteld aan ziekteverwekkers die meestal via ons voedsel, een ongewassen hand, of een hoest of nies afkomstig van een medemens in onze mond of neus terecht komen. Om te voorkomen dat deze ziekteverwekkers zich zo sterk in ons lichaam vermenigvuldigen dat het niet meer goed kan functioneren bezit het menselijke lichaam een afweersysteem tegen infecties. Dit afweersysteem wordt ook wel het immuunsysteem genoemd en bestaat grotendeels uit witte bloedcellen. Zodra ziekteverwekkers zoals bacteriën, virussen of parasieten ons lichaam binnen dringen komen de cellen van het afweersysteem in actie. B-cellen en T-cellen zijn de bekendste afweercellen, maar het immuunsysteem bestaat uit meer dan 10 verschillende celtypes die allemaal een specialistische rol vervullen en daarbij samenwerken in de afweer tegen infecties. T-cellen zijn onderverdeeld in CD4⁺ T-cellen ('T-helpercellen') en CD8⁺ T-cellen ('T-killercellen'). Dit proefschrift richt zich enkel op de reactie van CD8⁺ T-cellen op een infectie. CD8⁺ T-cellen staan ook bekend als 'killercellen' omdat ze de eigenschap bezitten om geïnfecteerde lichaamscellen op te sporen en deze vervolgens tot zelfmoord te dwingen. Aangezien virussen en sommige bacteriën zich vermenigvuldigen in geïnfecteerde lichaamscellen is het belangrijk dat deze geïnfecteerde cellen gedood worden, om verspreiding van het virus of de bacterie in ons lichaam te voorkomen.

T-cellen herkennen een geïnfecteerde lichaamscel met behulp van de zogenaamde T-celreceptor, die ook bepaalt welke infectie door deze T cel herkend kan worden (de 'specificiteit' van de T-cel). Niet alle T-cellen kunnen namelijk alle infecties herkennen, integendeel: er is voor elke infectie maar een kleine fractie (ongeveer 0.001%) van alle T-cellen die deze kan herkennen. Dit komt doordat T-cellen een vastgelegde specificiteit hebben, en doordat er talloze verschillende virussen, bacteriën en parasieten bestaan die het afweersysteem allemaal moet kunnen herkennen.



Voor een succesvolle T-cel reactie die tot bestrijding van een infectie leidt is een aantal processen van belang:

- I. Eerst moeten de infectie-specifieke 'naïeve' T-cellen geactiveerd worden. Deze cellen moet als het ware verteld worden dat 'hun' infectie plaats heeft gevonden en dat ze daarom in actie moeten komen.
- II. De geactiveerde T-cellen (ze zijn nu dus niet meer 'naïef') gaan vervolgens delen om grote aantallen T-cellen te genereren die de infectie kunnen bestrijden.
- III. Ook verlaten de geactiveerde T-cellen de lymfeklier en/of de milt waar ze geactiveerd werden om naar de plek in het lichaam te migreren waar de infectie zich bevindt.
- IV. Om geïnfecteerde lichaamscellen te kunnen doden moeten de geactiveerde en delende T-cellen nog een ontwikkeling ('differentiatie') tot 'effector'-T-cel doormaken. Alleen effectorcellen kunnen namelijk de moleculen produceren en uitscheiden die de geïnfecteerde lichaamscellen tot zelfmoord kunnen dwingen.
- V. Ook maken sommige geactiveerde T-cellen een ontwikkeling door tot 'memory'-T-cel. Terwijl een groot aantal effector-T-cellen sterft nadat de infectie bestreden is blijven enkele geactiveerde T-cellen leven. Deze cellen worden memory-T-cellen of geheugencellen genoemd, aangezien zij de herinnering vormen van de infecties die het lichaam eerder heeft meegemaakt. Zodra er een nieuwe infectie met dezelfde bacterie of hetzelfde virus plaatsvindt, kunnen de memorycellen hier snel op reageren, vaak zonder dat de geïnfecteerde persoon zich ziek voelt. Dit is ook de basis van vaccinatie: vaccinatie creëert memory-T-cellen (en memory-B-cellen) die je beschermen tijdens een toekomstige infectie.



Hoewel we weten dat deze processen cruciaal zijn voor een effectieve afweerreactie, zijn een groot aantal aspecten van de ontwikkeling van T-cel reacties nog steeds onbekend.

Het doel en nut van dit onderzoek

We weten dat het aantal effectorcellen welke we hebben, bepaalt hoe goed we een infectie kunnen bestrijden, en dat het aantal memorycellen bepaalt hoe goed we beschermd zijn tegen herhaalde infecties. Echter het is nog grotendeels onbekend 1) hoe het lichaam de aantallen effector- en memorycellen reguleert en 2) wanneer en hoe memorycellen precies ontstaan.

Kunnen we meer effectorcellen krijgen door T-celactivatie efficiënter te maken? Of is het juist nuttiger om de deling van de effectorcellen te bevorderen om meer effectorcellen te verkrijgen?

Hebben sommige naïeve T-cellen na activatie alleen maar effectorcellen als nakomelingen en andere naïeve T-cellen alleen maar memory-nakomelingen, of ontstaan beide celtypes uit dezelfde naïeve T-cellen? Moeten we dus, als we memorycellen willen genereren, specifiek de naïve T-cellen die memory-nakomelingen maken identificeren en daarna activeren, of maakt het niet uit welke naïeve T cellen we activeren aangezien ze toch allemaal memorycellen kunnen produceren?

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om deze en andere fundamentele vragen te beantwoorden die betrekking hebben op de grootte van CD8⁺ T-celreacties en het ontstaan van CD8⁺ memory-T-cellen. Een gedetailleerde kennis van deze fundamentele processen zal helpen bij de ontwikkeling van nieuwe vaccins of therapieën die erop gericht zijn de T-celreactie te verbeteren. Daarnaast vind ik het ook simpelweg leuk om een complex systeem, zoals het afweersysteem te leren begrijpen.

De onderzoeksvragen

In hoofdstuk 7 stellen we de vraag hoe efficiënt de activatie van T-cellen verloopt. Hoe efficiënt worden de specifieke T-cellen tussen de grote aantallen aspecifieke cellen gevonden en vervolgens geactiveerd? Doet 100% van de specifieke T-cellen mee aan de T-celreactie, of misschien maar 1%? En is dit percentage hetzelfde bij verschillende infecties? Sommige infecties leiden namelijk tot een veel sterkere T-celreactie dan andere. Wij wilden bepalen of dit komt doordat een hoger percentage van de specifieke T-cellen meedoet aan de T-celreactie, of doordat de geactiveerde T-cellen meer nakomelingen hebben.

In hoofdstuk 8 onderzoeken we hoe vergelijkbaar de reacties van individuele T-cellen zijn. We weten dat er enkele honderden T-cellen op een willekeurige infectie kunnen reageren, maar reageren deze cellen allemaal op een uniforme manier? Krijgt iedere geactiveerde T-cel evenveel nakomelingen? Of bestaat het grootste gedeelte van de T-celreactie uit nakomelingen van een paar T-cellen, terwijl er veel meer geactiveerd werden?

De hoofdstukken 3, 5 en 6 gaan over de ontwikkeling van geactiveerde T-cellen tot effector- en memory-T-cellen. Eén van de kernvragen is wanneer een T-cel 'besluit' of hij zich gaat ontwikkelen tot een effectorcel die zeer efficiënt is in het doden van geïnfecteerde lichaamscellen (maar die ook sterft zodra de infectie opgeruimd is), of toch tot een langlevende memorycel die bescherming biedt zodra het lichaam opnieuw besmet raakt met dezelfde infectie? In hoofdstuk 5 onderzoeken we of dit besluit al plaatsvindt op het moment van T-celactivatie. Er bestaan namelijk verschillende theorieën over hoe en wanneer T-cellen in hun ontwikkeling vastleggen wanneer ze een effector- of memorycel worden. Hoofdstuk 3 beschrijft deze theorieën en bespreekt hoe sterk de bewijzen hiervoor zijn. Een van de theorieën stelt dat de sterkte waarmee een T-cel geactiveerd wordt, lutsbepalend is en dus vastlegt of alle nakomelingen van deze cel effector- of juist memory-T-cellen worden. Een andere theorie gaat ervan uit dat direct ná T-celactivatie, dus tijdens de eerste celdeling, bepaald wordt dat de ene dochtercel het effector-lot en de andere het memory-lot toebedeeld krijgt. Dit zou een mechanisme zijn waarmee gegarandeerd kan worden dat tijdens elke infectie effector- en memory-T-cellen gegenereerd worden. Deze theorie onderzoeken we in hoofdstuk 6.



De aanpak

De overeenkomst tussen deze onderzoeksvragen is dat we om een antwoord te vinden het lot van individuele T-cellen gedurende een infectie moeten kunnen volgen. Met de bestaande technieken was dit echter nog niet op grote schaal mogelijk.

Naïeve T-cellen met een unieke barcode

Om het lot van individuele T-cellen te kunnen volgen hebben we dus een nieuwe techniek moeten ontwikkelen, die we 'cellular barcoding' genoemd hebben (hoofdstuk 2+4). Net zoals in de supermarkt elk product een unieke streepjescode (barcode) heeft, krijgen individuele T-cellen met deze techniek een unieke 'barcode'. Deze barcodes zijn DNA-stukjes die we met behulp van een virus in de T-cellen aanbrengen. Sommige virussen kunnen namelijk hun eigen DNA in het DNA van een cel inbrengen. Van deze eigenschap maken we hier gebruik: we verwijderen een groot gedeelte van het virus-DNA en vervangen het door onze barcode-DNA-stukjes. Elk virusdeeltje draagt hierdoor een uniek barcode-DNA-stukje. Als we vervolgens de T-cellen met het barcodevirus in contact brengen, zorgt het virusdeeltje ervoor dat het barcode-DNA in het DNA van de T-cel wordt ingebouwd.

Helaas kunnen de barcode-virusdeeltjes het barcode-DNA alleen inbrengen in delende cellen. Dit vormde initieel een probleem, omdat wij het barcode-DNA in naïeve (dus nog ongeactiveerde) T-cellen wilden inbrengen en naïeve cellen niet delen. Daarom hebben we eerst nog een andere techniek moeten ontwikkelen die het mogelijk maakt om naïeve T-cellen te genereren die wel het barcode-DNA bevatten (hoofdstuk 5). Deze techniek werkt als volgt: we introduceren het barcode-DNA niet direct in T-cellen, maar in de voorlopercellen van naïeve T-cellen, omdat deze voorlopers wel delen. De voorlopercellen bevinden zich in de thymus, een klier boven het hart die ook wel zwezerik genoemd wordt. Om ervoor te zorgen dat elke voorlopercel een unieke barcode meekrijgt, brengen we de voorlopercellen in contact met zo weinig virusdeeltjes dat elke voorlopercel gemiddeld door slechts één virusdeeltje geïnficeerd wordt. Vervolgens moeten de voorlopercellen met barcodes zich verder ontwikkelden tot naïeve T-cel. Dit proces vindt normaalgesproken in de thymus plaats en daarom spuiten we de barcode-bevattende voorlopercellen in de thymus van een muis, zodat ze zich daar in de natuurlijke omgeving kunnen ontwikkelen tot naïeve T-cellen. Zodra de barcode-bevattende voorlopercellen de ontwikkeling tot naïeve T-cel hebben volbracht, isoleren we deze uit de milt en de lymfeklieren van de muis. Zo hebben we wat we wilden – een aantal uniek gelabelde naïeve T-cellen – en kunnen we het lot van individuele T-cellen volgen.

Uit dit laatste stuk wordt duidelijk dat we dit onderzoek niet met menselijke cellen hebben uitgevoerd, omdat we anders barcode-bevattende voorlopercellen in de thymus van een mens hadden moeten spuiten. Aangezien het afweersysteem van gewervelde dieren (inclusieve de mens) sterk op elkaar lijkt, hebben we dit onderzoek uitgevoerd in muizen en met muizencellen.



Barcodes tellen en vergelijken

Om de reactie van individuele T-cellen op een infectie te bestuderen hebben we de barcode-bevattende naïeve T-cellen in het bloed van muizen gespoten, die vervolgens een *Listeria*- of griepinfectie kregen. Voor deze infecties is gekozen omdat ze door de door ons gebruikte barcode-bevattende T-cellen herkend kunnen worden. Als gevolg van de infectie raken de naïeve T-cellen geactiveerd en gaan ze delen, waarbij de barcode van de naïeve T-cel doorgegeven wordt aan alle dochtercellen. Zodoende dragen alle nakomelingen van een enkele naïeve T-cel (een hele 'T-celfamilie') exact dezelfde barcode.

Deze barcodetechniek heeft het mogelijk gemaakt om een aantal nieuwe aspecten van de T-cel reactie te bestuderen.

Ten eerste kunnen we nu de diversiteit binnen een familie bestuderen: kan een enkele naïeve T-cel zowel nakomelingen hebben die zich ontwikkelen tot effectorcellen als nakomelingen die zich ontwikkelen tot memorycellen, of ontwikkelen alle nakomelingen van een naïeve T-cel zich slechts tot één van beide celtypes (hoofdstuk 5)? Dit hebben we getest door per barcode te vergelijken of deze in beide celtypes of slechts in één van beide voorkwam. Als een barcode in beide celtypes voorkomt, dan heeft deze naïeve T-cel zowel effector- als memory-nakomelingen; komt een barcode maar in één van beide types voor, dan bestaat er geen diversiteit binnen deze T-cel familie.

Ten tweede kunnen we de vergelijking van barcodes in effector- en memorycellen ook gebruiken om te testen of het effector- of memory-lot tijdens de eerste paar celdelingen vastgelegd wordt (hoofdstuk 6). Hiervoor hebben we niet de naïeve cellen, maar de 1-3 keer gedeelde cellen van een unieke barcode voorzien en vervolgens de barcodes in de effector- en memorycellen vergeleken. Als effector- en memorycellen verschillende barcodes bevatten, is het lot van de cel al vastgelegd op het moment van barcode-labeling. Als we daarentegen dezelfde barcodes in beide celtypes vinden, dan kunnen we daaruit afleiden dat het lot later wordt vastgelegd.

Ten derde kunnen we ook tellen hoeveel verschillende barcodes er tijdens een T-celreactie aanwezig zijn. Dit vertelt ons hoeveel T-celfamilies aan de reactie deelnemen en dat is van belang voor de vraag die we in hoofdstuk 7 stellen. Hier willen we bepalen of er tijdens een sterke T-celreactie (waarbij veel infectie-specifieke T-cellen gevormd worden) meer T-celfamilies aan de reactie meedoen, of dat de hoeveelheid T-celfamilies gelijk blijft en alleen het aantal nakomelingen per naïeve T-cel (dus de familiegrootte) toeneemt. Hiervoor hebben we tijdens sterke en minder sterke T-celreacties geteld hoeveel T-celfamilies aan de reactie deelnamen.

Ten slotte willen we in hoofdstuk 8 bepalen of alle T-celfamilies die deelnemen aan een reactie even groot zijn. Hiervoor was het niet alleen van belang om het aantal verschillende families dat aan een T-celreactie meedoet te kunnen bepalen, maar ook om het aantal familieleden per familie te tellen. Oftewel, hoeveel cellen in een reactie bevatten dezelfde barcode? Hiervoor konden we geen gebruik maken van de tot nu toe gebruikte 'microarray'-techniek, aangezien deze wel vast kan stellen welke barcodes in een groep cellen aanwezig zijn, maar niet exact hoe vaak de verschillende barcodes



aanwezig zijn. Daarom zijn we overgestapt op een 'deep-sequencing'-techniek die het mogelijk maakt om exact te tellen hoe vaak iedere barcode aanwezig is.

De antwoorden op de onderzoeksvragen

Zorgt een sterke infectie ervoor dat er meer T-celfamilies deelnemen aan de reactie?

We hebben tijdens sterke infecties (grote T-celreacties) en zwakke infecties (kleine T-celreacties) geteld hoeveel verschillende barcodes in de geactiveerde T-cellen aanwezig waren. Daarbij hebben we gevonden dat het aantal T-celfamilies dat deelneemt aan een grote T-celreactie maar marginaal ($\approx 1.5x$) groter is dan tijdens een kleine reactie. Een grote T-cel reactie kan echter tot 10 keer groter zijn dan een kleine reactie. Dit betekent dat de grootte van de T-celreactie primair bepaald wordt door het aantal nakomelingen dat elke geactiveerde T-cel produceert.

Zijn alle T-celfamilies even groot?

De combinatie van onze barcode techniek en de deep-sequencing-techniek heeft het mogelijk gemaakt om te bepalen hoe groot alle T-celfamilies op een bepaald tijdstip tijdens de T-celreactie zijn. Deze analyse liet zien dat de T-celreactie gedomineerd wordt door een kleine fractie van de deelnemende T-celfamilies: ongeveer 20% van de T-celfamilies maakt samen 90% uit van de totale T-celreactie. Deze scheve verhouding blijft gedurende de gehele T-celreactie grofweg behouden. We hebben ook laten zien dat dit verschil in familie grootte toeneemt als de T cellen minder sterk gestimuleerd worden.



Maakt elke T-celfamilie zowel effector- als memory-T-cellen?

Door naïeve T-cellen van een unieke barcode te voorzien en na infectie te vergelijken welke barcodes in de effector- en de memoryceltypes aanwezig waren hebben we vastgesteld dat elke T-celfamilie effector- én memorycellen voortbrengt. Dit betekent dat het lot van een T-cel (of het een effector- of memorycel wordt) niet al tijdens de activatie van naïeve T-cellen vastgelegd wordt. Daarmee worden eerdere theorieën verworpen die stelden dat de sterkte van T-celactivatie lotsbepalend is.

Wordt het lot van een T-cel vroeg tijdens de reactie vastgelegd?

Als het effector- of memory-lot niet al tijdens T-celactivatie vastgelegd wordt, wordt het dan misschien tijdens de eerste celdeling vastgelegd? Volgens een theorie gebeurt dit door middel van een proces dat asymmetrische celdeling genoemd wordt. Asymmetrische celdeling betekent dat tijdens de celdeling beide dochtercellen een ander lot toebedeeld krijgen.

Door cellen die al 1-3 delingen hebben ondergaan met een unieke barcode te labelen en vervolgens per barcode te kijken of deze in effector- én memorycellen of maar in één van beide celtypes terecht kwam, hebben we vastgesteld dat T-cellen die 1-3 keer gedeeld hebben nog geen vastgelegd lot hebben. Het overgrote deel

van deze cellen had namelijk zowel effector- als memory-nakomelingen. Wij tonen hiermee aan dat het 'besluit' of een T-cel een effectorcel of een memorycel wordt, relatief laat in de T-celreactie plaatsvindt.

Conclusie

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift toont aan dat de grootte van de CD8⁺ T-celreactie hoofdzakelijk bepaald wordt door het gemiddelde aantal nakomelingen dat elke geactiveerde T-cel produceert. Hierbij is het opmerkelijk dat de hoeveelheid nakomelingen per geactiveerde T-cel sterk verschilt. Dit betekent, dat als wij door middel van b.v. vaccinatie de grootte van de T-celreactie willen verhogen (en dus meer effectorcellen genereren), het nuttig zal zijn om de T-cellen die nu weinig nakomelingen hebben zodanig te stimuleren dat ze meer nakomelingen krijgen.

Verder laat dit onderzoek zien dat elke naïeve CD8⁺ T-cel na activatie effector- en memory-nakomelingen produceert, en dat het effector- en memory-lot nog niet is vastgelegd na 3 celdelingen. Dit betekent dat CD8⁺ T-cellen pas op latere momenten in de T-celreactie 'besluiten' of ze sterven nadat de infectie bestreden is of ontwikkelen tot een langlevende memorycel. Als wij willen begrijpen hoe memorycellen ontstaan is het daarom zinvol om op de latere fases van de T-celreactie te focussen.





CURRICULUM VITAE

Carmen Gerlach werd geboren op 4 December 1980 te Hamburg in Duitsland en verhuisde op zesjarige leeftijd naar Nederland. In 2000 behaalde zij het Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife aan het Gymnasium van de Deutsche Schule Den Haag. In hetzelfde jaar begon zij aan de studie Biomedische Wetenschappen aan de Universiteit Leiden, waarvoor zij in 2003 cum laude het Bachelordiploma en in 2005 het Masterdiploma behaalde. Tijdens de Bachelorfase bracht zij zes maanden door als uitwisselingsstudente aan het Karolinska Institutet in Stockholm, Zweden en werd zij geselecteerd voor het Excellente Studenten Traject van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), in het kader waarvan zij gedurende 6 maanden naast haar studie onderzoek verrichte onder begeleiding van Dr. Marianne van Stipdonk op de afdeling Immunohematologie en Bloedtransfusie, sectie Tumorimmunologie van het LUMC. Tijdens het Masterprogramma liep zij twee wetenschappelijke stages. Het eerste onderzoek vond plaats in de groep van Dr. Anton Polderman op de afdeling Parasitologie van het LUMC en bevatte 3 maanden veldonderzoek in de regio Garu, Ghana. Hierop volgde de afstudeerstage onder begeleiding van Dr. Marianne van Stipdonk in de groep van Dr. Rienk Offringa en Prof. Kees Melief op de afdeling Immunohematologie en Bloedtransfusie, sectie Tumorimmunologie van het LUMC. Na het behalen van haar Masterdiploma begon zij in oktober 2005 aan haar promotieonderzoek onder begeleiding van Prof. Ton Schumacher op de afdeling Immunologie van het Nederlands Kanker Instituut in Amsterdam, waarvan het in dit proefschrift beschreven onderzoek het resultaat is. Vanaf eind 2011 zet zij haar wetenschappelijke loopbaan voort als post-doc in de onderzoeksgroep van Prof. Ulrich von Andrian aan de Harvard Medical School in Boston, USA. Ze heeft hiervoor een Rubicon beurs van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek ontvangen.





LIST OF PUBLICATIONS

C. Gerlach, J.W. van Heijst and T.N. Schumacher. The descent of memory T cells. **Ann N Y Acad Sci.** 1217 (2011) 139-53

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

C. Gerlach, J.W. van Heijst, E. Swart, D. Sie, N. Armstrong, R.M. Kerkhoven, D. Zehn, M.J. Bevan, K. Schepers and T.N. Schumacher. One naïve T cell, multiple fates in CD8⁺ T cell differentiation. **J Exp Med.** 207 (2010) 1235-46

F.M Wensveen, K.P. van Gisbergen, I.A. Derks, C. Gerlach, T.N. Schumacher, R.A. van Lier, E. Eldering. Apoptosis threshold set by Noxa and Mcl-1 after T cell activation regulates competitive selection of high-affinity clones. **Immunity.** 32 (2010) 754-65

J.W. van Heijst, C. Gerlach, E. Swart, D. Sie, C. Nunes-Alves, R.M. Kerkhoven, R. Arens, M. Correia-Neves, K. Schepers and T.N. Schumacher. Recruitment of antigen-specific CD8⁺ T cells in response to infection is markedly efficient. **Science.** 325 (2009) 1265-9.

K. Schepers, E. Swart, J.W. van Heijst, C. Gerlach, M. Castrucci, D. Sie, M. Heimerikx, A. Velds, R.M. Kerkhoven, R. Arens, and T.N. Schumacher. Dissecting T cell lineage relationships by cellular barcoding. **J Exp Med.** 205 (2008) 2309-18.



