



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Tracing T cell differentiation by genetic barcoding

Heijst, J.W.J. van

Citation

Heijst, J. W. J. van. (2010, June 24). *Tracing T cell differentiation by genetic barcoding*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15721>

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/1887/15721>

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

Nederlandse samenvatting

Introductie

Zoals de titel aangeeft, gaat dit proefschrift over het bestuderen van T cel differentiatie door middel van genetische barcoding. Ik ben mij er terdege van bewust dat alleen al deze titel als behoorlijk complex kan worden beschouwd. Voor een beter begrip van het doel van mijn promotieonderzoek zal het essentieel zijn om in ieder geval te begrijpen I) wat T cellen zijn en wat T cel differentiatie precies inhoudt en II) wat genetische barcoding is en hoe je daarmee T cel differentiatie zou kunnen bestuderen. Het doel van deze samenvatting is om in eerste instantie de begrippen T cel differentiatie en genetische barcoding te verduidelijken. Na deze introductie in de T cel biologie zal ik vervolgens uitleggen wat ik precies bestudeerd heb in dit proefschrift en hoe de gevonden resultaten kunnen bijdragen aan het verbeteren van de gezondheid van de mens.

Wat zijn T cellen?

Iedereen heeft wel eens gehoord van witte bloedcellen. Deze cellen maken samen met rode bloedcellen en bloedplaatjes de drie groepen cellen uit die in ons bloed te vinden zijn. Daar waar rode bloedcellen belangrijk zijn voor het transport van zuurstof en bloedplaatjes voor bloedstolling zorgen, vormen witte bloedcellen de kern van het immuunsysteem. Deze cellen zijn onmisbaar in de afweer tegen schadelijke virussen en bacteriën. Als je witte bloedcellen onder een microscoop bekijkt, kom je er al snel achter dat het niet om één soort cellen gaat, maar dat er ongeveer tien verschillende soorten witte bloedcellen zijn. Elk van deze soorten heeft zo zijn eigen uiterlijk en heeft ook andere functies. Deze taakverdeling binnen het immuunsysteem is belangrijk, aangezien het lichaam tegen zeer veel verschillende ziekteverwekkers weerstand moet kunnen bieden.

Onder de verschillende soorten witte bloedcellen bevinden zich ook de T cellen, welke ongeveer 25% van het totaal uitmaken. T cellen heten zo omdat ze zich ontwikkelen in de thymus (ook wel zwezerik genoemd). Hoewel alle bloedcellen oorspronkelijk in het beenmerg

geboren worden, komen T cellen niet in het bloed terecht voordat ze ook een tijdje in de thymus hebben doorgebracht. In de thymus vinden er twee belangrijke processen plaats die essentieel zijn om tot volwassen T cel te kunnen uitgroeien. Als eerste maken de zich ontwikkelende T cellen hier hun T cel receptor. Receptoren zijn eiwitten op het celmembraan waaraan een specifiek molecuul kan binden, vergelijkbaar met een slot waarin alleen een bepaalde sleutel past. Deze T cel receptor speelt een essentiële rol in het vermogen van de T cel om ziekteverwekkers te herkennen. Elke cel van het lichaam bevat namelijk de zogenaamde MHC moleculen, waarmee een cel op zijn oppervlak kan laten zien welke eiwitten er allemaal in de cel gemaakt worden. Deze MHC moleculen doen dat door aan de binnenkant van de cel kleine stukjes eiwit te binden en die vervolgens op het oppervlak van de cel te 'presenteren'. Zo wordt er dus aan de buitenkant van de cel een overzicht gegeven van alle eiwitten die er binnenin de cel gemaakt worden. Door dit mechanisme is een cel die geïnfecteerd is door een ziekteverwekker in staat om dit aan andere cellen te laten weten. Namelijk, in dat geval zullen de MHC moleculen stukjes eiwit afkomstig van virussen of bacteriën bevatten.

T cellen kunnen door middel van hun T cel receptor de MHC moleculen op een cel afsporen op zoek naar stukjes eiwit van ziekteverwekkers die ze herkennen. Op het moment dat een dergelijk stukje eiwit door een T cel wordt herkend, noemen we dat stukje eiwit een antigeen en de T cel die het herkent een antigeen-specifieke T cel. Omdat er veel verschillende antigenen zijn, is het nodig om ook veel verschillende T cel receptoren te maken. Door het combineren van verschillende stukjes DNA in de kern van de T cel, wordt er in iedere cel een unieke DNA code opgebouwd, welke vervolgens wordt gebruikt als blauwdruk om de T cel receptor te kunnen maken. Het resultaat is dat iedere T cel op deze wijze een unieke receptor krijgt. Door het maken van veel T cellen met elk een unieke receptor is het lichaam dus in staat om veel verschillende ziekteverwekkers

te kunnen herkennen.

Echter, er ontstaat hierdoor wel een probleem. Omdat het samenstellen van de T cel receptor gebeurt door willekeurig bepaalde stukjes DNA aan elkaar te plakken is de uitkomst hiervan onvoorspelbaar. Het gevolg is dat de T cel receptoren die hierdoor ontstaan niet alleen eiwitten herkennen afkomstig van virussen of bacteriën, maar ook eiwitten die van het lichaam zelf afkomstig zijn. Als deze T cellen in het bloed terecht zouden komen, zouden ze het eigen lichaam aan kunnen vallen. Om dit te voorkomen, vindt er in de thymus nog een tweede belangrijk proces plaats. In de thymus zijn er namelijk gespecialiseerde cellen aanwezig die via hun MHC moleculen aan T cellen kunnen laten zien welke eiwitten er allemaal in het lichaam voorkomen. Doordat in de thymus alle lichaamseigen (of zelf-) antigenen gepresenteerd worden, kunnen alle T cellen die deze zelf-antigenen herkennen meteen worden vernietigd. Zo komen alleen die T cellen in het bloed terecht die lichaamsvreemde antigenen afkomstig van virussen of bacteriën kunnen herkennen. T cellen die zich in het bloed bevinden maar nog niet in aanraking zijn gekomen met lichaamsvreemde antigenen worden naïeve T cellen genoemd.

Wat is T cel differentiatie (T cel verandering)?

Omdat er zoveel verschillende T cellen zijn, met elk weer een andere T cel receptor, is het aantal T cellen dat één bepaald antigeen kan herkennen zeer klein, ongeveer 1 op de 100.000 T cellen. Op het moment dat een ziekteverwekker het lichaam binnendringt, staat het lichaam daarom voor een grote uitdaging. Het lichaam moet namelijk proberen om die enkele antigeen-specifieke T cellen op te sporen die nodig zijn voor de afweerreactie tussen een enorme berg aan T cellen die de ziekteverwekker niet herkennen en waar het lichaam op dat moment niks aan heeft. Het is dus zoeken naar een speld in een hooiberg. Omdat het lichaam niet weet waar die enkele antigeen-specifieke T cellen zich bevinden, zit er niks anders op dan alle T cellen één voor één te testen. Hiervoor maakt het lichaam gebruik van een ander soort witte bloedcellen, de zogenaamde dendritische cellen. Deze cellen zijn gespecialiseerd in het opsporen

van geïnfecteerde cellen en zodra ze die vinden, kunnen ze de eiwitten uit die geïnfecteerde cellen opnemen en presenteren in hun eigen MHC moleculen. Als er in die geïnfecteerde cellen dus virus of bacterie eiwitten aanwezig zijn, dan zal de dendritische cel deze overnemen en presenteren op zijn eigen oppervlak. T cellen weten dit en speuren daarom continue het celoppervlak van dendritische cellen af om te kijken of ze lichaamsvreemde antigenen presenteren. Maar omdat antigeen-specifieke T cellen zo zeldzaam zijn, zal een dendritische cel gemiddeld door 100.000 T cellen onderzocht moeten worden, voordat daar één T cel tussen zit die het antigeen herkent.

Op het moment dat een naïeve T cel zijn antigeen vindt, gaat die cel een stabiele binding aan met de antigeen-presenterende dendritische cel. Tijdens deze binding krijgt de naïeve T cel instructies hoe hij het beste de aanwezige ziekteverwekker kan gaan opsporen en vernietigen. Hierbij zijn twee aspecten cruciaal voor het slagen van de afweerreactie. Ten eerste zal de naïeve T cel heel veel moeten gaan delen, want in zijn eentje kan een antigeen-specifieke T cel weinig beginnen tegen de miljoenen virusdeeltjes of bacteriën die aanwezig kunnen zijn tijdens een infectie. Omdat alle nakomelingen van deze ene naïeve T cel hetzelfde DNA erven, zullen deze dochter T cellen dezelfde T cel receptor gaan maken als de naïeve T cel en zullen ze dus allemaal hetzelfde antigeen kunnen herkennen. Zo wordt in korte tijd van één antigeen-specifieke T cel een bestrijdingsleger van een paar duizend antigeen-specifieke T cellen opgebouwd. Het proces waardoor naïeve T cellen beginnen met delen wordt T cel activatie genoemd. Naast het maken van veel antigeen-specifieke T cellen is nog een tweede aspect erg belangrijk voor het succes van de afweerreactie. De delende T cellen zullen namelijk ook nieuwe functies moeten krijgen, welke nodig zijn voor het opsporen en vernietigen van geïnfecteerde cellen. Het proces waarbij de nakomelingen van naïeve T cellen verschillende functies ontwikkelen wordt T cel differentiatie genoemd.

T cellen met een verschillend lot (een verschillende bestemming)

Hoe de T cel differentiatie precies verloopt, ligt niet bij voorbaat vast, maar hangt sterk af van de signalen die de antigeen-presenterende dendritische cel doorgeeft. Het differentiatie proces van een T cel kan daardoor tot verschillende uitkomsten leiden. Zo zal een groot deel van het T cel bestrijdingsleger dat tijdens de afweerreactie ontstaat, weer verdwijnen nadat de ziekteverwekker is opgeruimd, simpelweg omdat deze cellen niet langer nodig zijn in zulke grote aantallen. De T cellen die dood gaan na het opruimen van de infectie worden kortlevende 'effector' T cellen genoemd en maken ongeveer 90% uit van het totale bestrijdingsleger van antigeen-specifieke T cellen op het moment dat dit leger op zijn grootst is (ongeveer 1 week na infectie). 10% van de antigeen-specifieke T cellen blijft echter wel aanwezig nadat de ziekteverwekker is verdwenen. Deze cellen worden langlevende 'geheugen' T cellen genoemd en zorgen ervoor dat wanneer dezelfde ziekteverwekker later terugkeert, het lichaam nog sneller en beter kan reageren. Het aanmaken van geheugen T cellen vormt tevens de basis van vaccinatie. Tijdens vaccinatie maak je immers geheugen T cellen aan tegen een geïnactiveerd virus of bacterie, zodat op het moment van echte infectie, de ziekteverwekker zeer snel kan worden uitgeschakeld.

Tijdens differentiatie van antigeen-specifieke T cellen kunnen er dus T cellen ontstaan met een verschillende bestemming. Deze verschillen in bestemming worden ook wel het lot van de T cel genoemd. Zo ontstaan er dus T cellen van wie het lot een kort dan wel een lang leven is. Naast een verschil in levensduur kunnen geactiveerde T cellen nog andere bestemmingen krijgen. Zo kunnen T cellen ook geholpen worden in hun zoektocht naar de locatie van de ziekteverwekker. Als er bijvoorbeeld een infectie plaats vindt in het darmstelsel, dan kunnen de antigeen-presenterende dendritische cellen instructies geven om de T cellen gericht naar het darmstelsel te sturen. Dit wordt selectieve T cel migratie genoemd. Aan de andere kant, als een infectie zich over het hele lichaam verspreid heeft, dan hebben T cellen meer baat bij instructies voor een willekeurige zoektocht naar

de ziekteverwekker. Zo kunnen geactiveerde antigeen-specifieke T cellen dus ook een ander migratie lot krijgen.

Het bestuderen van T cel differentiatie door genetische barcoding

Hoewel het dus duidelijk is dat T cellen tijdens hun differentiatie een verschillend lot kunnen krijgen, is het momenteel nog onduidelijk hoe T cellen met een verschillend lot precies ontstaan. Het is belangrijk om dit te bestuderen, omdat we hierdoor beter in staat zullen zijn om T cellen met het meest geschikte lot voor een bepaalde therapie of vaccinatie op te wekken. Grofweg zijn er twee mogelijkheden waardoor T cellen met een verschillend lot kunnen ontstaan. Om bijvoorbeeld zowel kortlevende effector als langlevende geheugen T cellen te doen ontstaan, is de eerste optie dat één geactiveerde naïeve T cel alleen effector T cellen voortbrengt, terwijl een andere geactiveerde naïeve T cel alleen geheugen T cellen als nageslacht geeft. Echter, een tweede optie is dat één geactiveerde naïeve T cel zowel effector als geheugen T cellen voortbrengt. Om experimenteel onderscheid te kunnen maken tussen deze twee scenario's, is een methode nodig die kan aantonen welke dochter T cellen van welke geactiveerde naïeve T cel afkomstig zijn, vergelijkbaar met hoe een vaderschapstest bij mensen kan aantonen welke kinderen van welke ouder afkomstig zijn.

Om het proces van T cel differentiatie beter te leren begrijpen hebben wij in dit proefschrift een vaderschapstest voor witte bloedcellen ontwikkeld. Deze experimentele methode houdt in dat er in iedere naïeve antigeen-specifieke T cel een uniek stukje DNA wordt ingebracht. Deze unieke stukjes DNA worden DNA barcodes (streepjescodes) genoemd, omdat ze gebruikt kunnen worden om verschillende cellen van elkaar te onderscheiden. Dit werkt als volgt: DNA bestaat uit vier verschillende bouwstenen, de zogenaamde A, C, G en T nucleotiden. Door deze nucleotiden in verschillende volgordes te plaatsen, kunnen unieke codes worden gevormd, net zoals dezelfde letters van het alfabet geplaatst in andere volgordes ook andere woorden kunnen vormen. Door cellen van deze unieke DNA barcodes te voorzien, krijgt elk van deze cellen dus een uniek identificatielabel, wat

ze onderscheidt van alle andere cellen. Hierbij is een vergelijking met de supermarkt snel gemaakt, waar barcodes gebruikt worden om verschillende producten van elkaar te kunnen onderscheiden.

Om naïeve T cellen van DNA barcodes te kunnen voorzien, zijn we begonnen met 5000 verschillende stukjes DNA te maken. Vervolgens hebben we deze DNA barcodes ingebouwd in virussen waarmee we naïeve T cellen kunnen infecteren. Hierdoor zijn we in staat om 5000 naïeve T cellen elk van een uniek DNA label te voorzien. Omdat deze DNA barcodes in het eigen DNA van de T cel worden ingebouwd, zal tijdens celdeling deze DNA barcode ook aan alle dochter T cellen worden doorgegeven. De groep dochter T cellen die dezelfde barcode bevatten zijn dus allemaal afkomstig van één geactiveerde naïeve T cel. In andere woorden, door barcodes met elkaar te vergelijken kun je bepalen welke cellen familie van elkaar zijn. De experimentele procedure waarbij door middel van DNA barcodes verwantschap tussen cellen wordt bestudeerd wordt genetische barcoding genoemd.

Hoe kunnen we nu met genetische barcoding bepalen hoe effector en geheugen T cellen ontstaan? In het geval dat effector en geheugen T cellen afstammen van verschillende naïeve T cellen zullen beide celtypes verschillende barcodes bevatten. Omgekeerd, als effector en geheugen T cellen afstammen van dezelfde naïeve T cellen, dan zullen beide celtypes dezelfde barcodes bevatten. Gebaseerd op deze theoretische redenering hebben we in dit proefschrift genetische barcoding gebruikt om een aantal vooraanstaande vragen op het gebied van T cel differentiatie te bestuderen. Hieronder zal ik die vraagstukken en de antwoorden die we daarop gevonden hebben elk kort bespreken.

Het volgen van T cel migratie

Zoals ik hierboven reeds kort aangaf, kunnen T cellen instructies krijgen om selectief naar een bepaalde locatie in het lichaam te migreren, zoals het darmstelsel als zich daar een ziekteverwekker bevindt. Wat momenteel echter onduidelijk is, is hoe deze T cel migratie verloopt als een ziekteverwekker zich op meerdere plaatsen in het lichaam bevindt, bijvoorbeeld

zowel in de longen als in de darmen. Zal het nageslacht van één geactiveerde T cel specifiek naar de longen gaan en het nageslacht van een andere geactiveerde T cel naar de darmen, of kan het nageslacht van één geactiveerde T cel naar beide geïnfecteerde organen migreren? In hoofdstuk 3 van dit proefschrift hebben we deze vraag bestudeerd door muizen antigeen-specifieke T cellen te geven, die elk voorzien waren van een unieke barcode. Vervolgens hebben we deze muizen geïnfecteerd met een griepvirus in de longen en daarnaast tumorcellen onder de huid getransplanteerd. Zowel het griepvirus als de tumorcellen bevatten het antigeen dat de barcode-gelabelde T cellen kunnen herkennen. Zo werd een situatie gecreëerd waarin geactiveerde T cellen konden kiezen tussen twee ontstoken weefsels, een locale huid ontsteking en de ontstoken longen. Door na een week de barcode-gelabelde T cellen die naar de huid en de longen gemigreerd waren weer uit deze organen te isoleren en de barcodes van deze T cellen te vergelijken, konden we vaststellen dat deze T cellen met een verschillend migratie lot afkomstig waren van dezelfde geactiveerde naïeve T cellen. Deze resultaten hebben aangetoond dat wanneer een infectie op meerdere plaatsen in het lichaam aanwezig is, de geactiveerde T cellen geen selectieve migratie vertonen maar in staat zijn om op meerdere plaatsen tegelijkertijd de infectie te bestrijden. Theoretisch gezien lijkt dit ook de beste strategie om een zich uitbreidende infectie zo snel mogelijk een halt toe te roepen.

De keuze tussen een kort of een lang leven

Zoals eerder hierboven beschreven is een belangrijk vraagstuk binnen de immunologie hoe kortlevende effector en langlevende geheugen T cellen ontstaan. Dit is belangrijk om te weten omdat voor succesvolle vaccinatie het aanmaken van geheugen T cellen essentieel is. In hoofdstuk 4 en 5 van dit proefschrift hebben we deze vraag bestudeerd door gebruik te maken van genetische barcoding. In eerste instantie, hebben we in hoofdstuk 4 getest of effector en geheugen T cellen afkomstig zijn van dezelfde of van verschillende naïeve T cellen. Hiervoor hebben muizen barcode-gelabelde T cellen gekregen en zijn deze muizen vervolgens

geïnficeerd met een bacterie die de T cellen herkennen. Daarna zijn op twee verschillende tijdstippen de barcode-gelabelde T cellen uit het bloed van de muizen geïsoleerd om de verwantschap van effector en geheugen T cellen te kunnen bepalen. Een week na infectie werden de kortlevende effector T cellen geïsoleerd en een maand na infectie de langlevende geheugen T cellen. Vergelijking van de barcodes tussen deze twee T cel populaties toonde aan dat de effector en geheugen T cellen afkomstig waren van dezelfde naïeve T cellen. Hierdoor is duidelijk geworden dat één naïeve T cel tijdens zijn differentiatie dochtercellen kan voortbrengen met een verschillende levensduur.

In hoofdstuk 5 hebben we vervolgens verder geanalyseerd wanneer tijdens een afweerreactie dochtercellen van een geactiveerde naïeve T cel kiezen voor een bestaan als kortlevende effector of langlevende geheugen T cel. In de vakliteratuur is er één onderzoeksgroep die heeft gesuggereerd dat de eerste celdeling van een geactiveerde naïeve T cel mogelijk niet symmetrisch verloopt, waardoor er twee dochtercellen zouden kunnen ontstaan met een verschillend lot. De ene dochtercel zou vervolgens alleen kortlevende effector T cellen voortbrengen, terwijl de andere dochtercel alleen langlevende geheugen T cellen als nageslacht zou hebben. Om deze hypothese experimenteel te testen hebben we opnieuw gebruik gemaakt van genetische barcoding, maar hebben we dit keer niet de naïeve T cellen van barcodes voorzien, maar de eerste twee dochtercellen die ontstaan na T cel activatie. Door deze barcode-gelabelde dochtercellen vervolgens verder te laten ontwikkelen tot effector en geheugen T cellen, waren we in staat om hun lot te bepalen. Vergelijking van de barcodes tussen effector en geheugen T cellen toonde aan dat ook de eerste twee dochtercellen na T cel activatie nog steeds zowel kort- als langlevende T cellen kunnen voortbrengen. Dit resultaat maakt de hypothese uit de literatuur zeer onwaarschijnlijk en suggereert dat dochter T cellen op een later tijdstip nog extra signalen ontvangen waardoor ze uiteindelijk voor een kort of een lang bestaan kiezen.

De zoektocht naar zeldzame T cellen

Zoals ik eerder heb aangegeven is het aantal T cellen dat één bepaald antigeen kan herkennen zeer klein, ongeveer 1 op de 100.000 T cellen. Omdat een muis in totaal ongeveer 20 miljoen T cellen bevat, zijn er dus ongeveer 200 T cellen specifiek voor één bepaald antigeen. Een vraag die al lang binnen de immunologie bestaat, is hoe goed het immuunsysteem is in het opsporen en activeren van deze zeldzame antigeen-specifieke T cellen wanneer er een infectie plaatsvindt. Deze kennis is belangrijk aangezien het aantal geactiveerde naïeve T cellen mede bepaalt hoe sterk de afweerreactie wordt en dus ook hoe succesvol een bepaalde vaccinatiestrategie zal zijn. In hoofdstuk 6 van dit proefschrift hebben we genetische barcoding gebruikt om het aantal naïeve T cellen dat meedoet aan de afweerreactie te bepalen. We noemen dit het aantal naïeve T cellen wat gerekruteerd wordt tijdens een infectie. Omdat iedere gerekruteerde naïeve T cel een andere barcode bevat, geeft het aantal verschillende barcodes van het totale T cel bestrijdingsleger aan uit hoeveel naïeve T cellen dat leger is ontstaan.

Door muizen te voorzien van barcode-gelabelde T cellen en deze muizen vervolgens te infecteren met verschillende ziekteverwekkers en verschillende infectiedoses, waren we in staat om te kijken I) hoe sterk de afweerreactie werd en II) hoeveel verschillende naïeve antigeen-specifieke T cellen er steeds gerekruteerd werden. Onafhankelijk van hoe sterk of zwak de infectie was, vonden we steeds dat het aantal gerekruteerde naïeve T cellen nagenoeg gelijk bleef, terwijl de kracht van de afweerreactie wel sterk verschild. Deze constantheid konden we verklaren door aan te tonen dat zo goed als alle aanwezige antigeen-specifieke T cellen werden gerekruteerd, zelfs bij een zwakke infectie. Deze resultaten tonen aan dat de zoektocht naar zeldzame antigeen-specifieke T cellen tijdens een infectie verrassend efficiënt verloopt. Bovendien tonen deze resultaten aan dat de kracht van een afweerreactie dus niet wordt bepaald door variatie in het aantal naïeve T cellen dat wordt gerekruteerd, maar veel meer door het aantal keer dat deze naïeve T cellen na rekrutering gaan delen. Voor het verbeteren van vaccinatie strategieën lijkt het dus belangrijk

om er vooral voor te zorgen dat geactiveerde T cellen veel gaan delen, omdat dit ook de natuurlijke manier is waarop de kracht van een afweerreactie tijdens infectie wordt bepaald.

Differentiatie bestuderen buiten het immuunsysteem

In de methode die in hoofdstuk 3 t/m 6 is gebruikt om T cel differentiatie te bestuderen, worden cellen voorzien van DNA barcodes door middel van virussen. Hoewel deze methode zeer krachtig is voor het bestuderen van differentiatie binnen het immuunsysteem heeft hij ook een belangrijk nadeel. Omdat de introductie van barcodes door middel van virussen alleen efficiënt verloopt in een kweekschachtje, moeten de cellen die worden bestudeerd eerst uit het lichaam worden geïsoleerd en vervolgens, nadat ze voorzien zijn van barcodes, weer worden teruggespoet in het lichaam. Deze methode van barcode labeling kan daarom niet worden gebruikt om differentiatie van cellen buiten het immuunsysteem te bestuderen, zoals cellen afkomstig van de longen of lever. Voor deze cellen is het simpelweg niet mogelijk om ze uit het lichaam te halen, ze in een kweekschachtje te manipuleren en vervolgens weer terug te spuiten in het bloed in de hoop dat ze hun normale functie weer zullen uitoefenen.

Om een volgende stap te maken in de toepassing van genetische barcoding hebben we in hoofdstuk 7 van dit proefschrift een nieuwe onderzoeksmethode ontwikkeld. Deze methode maakt gebruik van een zogenaamde transgene muis. Dit is een muis die in al zijn cellen een extra stukje DNA meedraagt, waarmee een speciale functie kan worden uitgevoerd. Wij hebben dit stukje DNA zo in elkaar gezet dat hiermee unieke barcodes in iedere cel kunnen worden gemaakt. Door deze transgene "barcode muis" te injecteren met het stofje tamoxifen, wordt recombinatie van het extra stukje DNA in gang gezet, wat uiteindelijk in iedere cel tot een andere barcode zal leiden. Dit proces is zeer vergelijkbaar met hoe T cellen steeds weer een andere T cel receptor maken (zoals eerder uitgelegd). Omdat via deze transgene muis cellen in het lichaam zelf van een unieke barcode kunnen worden voorzien, is het nu mogelijk om differentiatie te bestuderen zonder cellen uit hun

natuurlijke omgeving te hoeven isoleren.

Omdat het behoorlijk wat tijd heeft gekost om dit nieuwe model van genetische barcoding te ontwikkelen, bevindt dit onderzoek zich momenteel nog in een vroeg stadium. We hebben al wel kunnen aantonen dat door injectie van het stofje tamoxifen, recombinatie van het extra stukje DNA in gang kan worden gezet in cellen van zowel de longen als de lever. Analyse van het DNA heeft laten zien dat er zich inderdaad unieke barcodes in deze gerecombineerde long en lever cellen bevinden. Deze resultaten zijn zeer hoopgevend en suggereren dat deze onderzoeksmethode in de toekomst een belangrijke bijdrage kan leveren om ook de differentiatie van andere celtypen in het lichaam beter te leren begrijpen.

Conclusies

Een belangrijk doel van dit proefschrift was om nieuwe experimentele technieken te ontwikkelen om zodoende T cel differentiatie beter te kunnen bestuderen. Om dit proces te doorgronden zijn er onderzoeksmethoden nodig die het mogelijk maken om het lot van individuele cellen te kunnen volgen. Door gebruik te maken van genetische barcoding heeft dit proefschrift meer inzicht gegeven in hoe geactiveerde T cellen op zoek gaan naar de locaties van ziekteverwekkers en hoe ervoor wordt gezorgd dat gelijktijdig kortlevende effector en langlevende geheugen T cellen ontstaan. Tevens heeft dit proefschrift laten zien hoe efficiënt de rekrutering van zeldzame antigeen-specifieke T cellen verloopt, waardoor we nu beter begrijpen hoe de kracht van een afweerreactie wordt bepaald. Als laatste is er een nieuwe experimentele methode ontwikkeld, die ons in de toekomst in staat moet stellen om ook buiten het immuunsysteem differentiatie beter te bestuderen. Gezamenlijk bieden deze resultaten belangrijke nieuwe inzichten om het immuunsysteem optimaal in te kunnen zetten in de strijd tegen infectieziekten en kanker.