

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Experimentelle Forschung Chirurgie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. J. Werner

**Antigen-spezifische memory B-Lymphozyten in der Transplantation -
Immunophänotypisierung im Impfmodell und die Rolle von memory B-
Lymphozyten in der Immunantwort**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Simon Johannes Theiner

aus

München

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. Alexandr Bazhin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Anne Krug
Prof. Dr. med. Antje Habicht
Prof. Dr. med. Edgar Meinel
Prof. Dr. med. Michael Fischereder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Julian N. Bucher

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2022

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abkürzungsverzeichnis	7
3	Einleitung.....	12
3.1	Transplantation	12
3.2	Transplantationsimmunologie	14
3.2.1	Das Immunsystem	14
3.2.1.1	Phänotypisierung durch Cluster of Differentiation	15
3.2.1.2	Das angeborene Immunsystem.....	15
3.2.1.2.1	Makrophagen	16
3.2.1.2.2	Granulozyten	16
3.2.1.2.3	Dendritische Zellen.....	16
3.2.1.2.4	Natürliche Killerzellen	17
3.2.1.3	Das adaptive Immunsystem	17
3.2.1.3.1	T-Zellen.....	18
3.2.1.3.1.1	T-Helfer-Zellen.....	18
3.2.1.3.1.2	Zytotoxische T-Zellen	19
3.2.1.3.1.3	IFN- γ in T-Zellen.....	19
3.2.1.3.2	B-Zellen.....	20
3.2.1.3.2.1	Immunglobuline und die humorale Immunantwort	20
3.2.1.3.2.2	Antibody Secreting Cells: Plasmablasten und Plasmazellen	21
3.2.1.3.2.3	B-Zell Immungedächtnis.....	22
3.2.2	Impfung	22
3.2.3	Immunologie des Transplantationspatienten	24
3.2.3.1	Einteilung der Transplantatabstoßung der Niere	24
3.2.3.2	Reaktion des angeborenen Immunsystems auf das Allograft.....	24
3.2.3.3	Reaktion des adaptiven Immunsystems auf das Allograft	25
3.2.3.3.1	T-Zell vermittelte Transplantatabstoßung	25
3.2.3.3.2	B-Zell bzw. antikörpervermittelte Transplantatabstoßung.....	26
3.2.3.3.3	Interaktion von B und T Zellen bei der antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion	28

3.2.4	Ausgewählte Immundiagnostik in der Transplantationsmedizin zur Diagnostik von DSA im Empfänger	28
3.2.4.1	Luminex	28
3.2.4.2	Crossmatch-Assay.....	29
3.2.4.3	HLA-Antikörper ELISA	29
3.2.4.4	HLA-spezifischer ELISpot	30
3.2.5	Immunsuppressive Therapie	30
3.3	Zielsetzung.....	32
4	Material und Methoden.....	34
4.1	Materialien	34
4.1.1	Laboraausstattung FACS und ELISA.....	34
4.1.2	Laboraausstattung ELISpot.....	34
4.1.3	Lösungen und Flüssigkeiten.....	35
4.1.4	Reaktionsgefäße und Verbrauchsmaterial	36
4.1.5	ELISpot	37
4.1.6	FACS-Antikörper und Farbstoffe	37
4.1.7	Stimulationsreagenzien und FACS-Kompensationsbeads	37
4.1.8	MACS	38
4.1.9	Software	39
4.2	Methoden.....	40
4.2.1	Ethikantrag	40
4.2.2	Präparation der Zellen.....	40
4.2.2.1	Präparation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation	40
4.2.2.2	Präparation mononukleärer Zellen aus Spendermilzen.....	41
4.2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	42
4.2.2.4	Kryokonservierung	42
4.2.2.5	Bestrahlung von Milz-PBMC.....	43
4.2.3	Total-IgG ELISpot	43
4.2.3.1	Funktionsweise des Spender- bzw. HBs-Antigen-spezifischen total-IgG ELISpots....	43
4.2.3.2	Vorstimulation für den ELISpot-Assay.....	44

4.2.3.3	Durchführung des total-IgG ELISpot-Assay	45
4.2.3.4	Auswertung	48
4.2.4	Direkte Analyse der PBMC Subpopulationen über Fluorescence-Activated Cell Sorting 48	
4.2.4.1	Stimulationsschritte	48
4.2.4.1.1	Antigenspezifische Langzeitstimulation	48
4.2.4.1.2	Asservation der Zellkulturmedien und Kurzzeitstimulation für den funktionellen Interferon- γ Assay	49
4.2.4.1.3	Timeshift.....	50
4.2.4.2	FACS-Analyse	50
4.2.4.2.1	Funktionsweise der Durchflusszytometrie.....	50
4.2.4.2.2	Etablierung eines neuen Panels	52
4.2.4.2.2.1	Erstellung des Panels.....	52
4.2.4.2.2.2	Kompensation	53
4.2.4.2.2.3	Titration.....	54
4.2.4.2.3	Färbung für die FACS-Analyse	54
4.2.5	IgG-ELISA.....	55
4.2.6	MACS-Beads Separation	57
4.2.6.1	Anreicherung von B-Zellen	57
4.2.6.2	Memory B-Cell Selektion	58
4.2.7	Statistik.....	58
5	Ergebnisse.....	60
5.1	Präparation der PBMC bei beständig hoher Vitalität.....	60
5.2	Der verwendete ELISpot-Assay scheint zur Identifizierung von Spender-spezifischen memory B-Lymphozyten nicht geeignet	61
5.3	Etablierung und Anpassung des B- und T-Zell Panels mit funktionellem IFN- γ Assay	65
5.3.1	Suche nach passender Antikörpermenge in der FACS-Färbung.....	65
5.3.2	Festlegung der Gatingstrategie	68
5.4	Festlegung des endgültigen Messzeitpunktes	71
5.4.1	Die Zellvitalität bleibt innerhalb des Beobachtungszeitraums stabil	72
5.4.2	Keine signifikanten Unterschiede in den T-Lymphozyten im Verlauf der Zeit und zwischen den Stimulationen	74

5.4.3	Die B-Lymphozyten und ihre Subpopulation zeigen sich vom Faktor Zeit unabhängig, jedoch abhängig von der verwendeten Stimulation	77
5.4.3.1	Subpopulationen der B-Lymphozyten.....	78
5.4.3.1.1	Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen	78
5.4.3.1.2	Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells.....	78
5.4.3.1.3	B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells.....	80
5.4.4	Funktioneller Assay zeigt eine intrazelluläre IFN- γ Produktion in allen Zellpopulationen	83
5.4.4.1	Die IFN- γ Produktion wird in T-Lymphozyten Subpopulationen durch Stimulation mit Il-2 und R848 schon ab d1 gesteigert	83
5.4.4.2	Die IFN- γ Produktion ist in B-Lymphozyten Subpopulationen ebenfalls stimulationsabhängig	86
5.5	Antigenspezifische Stimulation der PBMC	92
5.5.1	Stimulation mit Engerix-B führt zu einem konzentrationsabhängigen Zelluntergang ..	92
5.5.2	Adjuvansfreies HBs-Antigen führt in vivo zu einer antigenspezifischen Stimulation der PBMC	93
5.5.2.1	Verbesserung der Vitalität unter adjuvansfreiem HBs-Antigen	93
5.5.2.2	Analyse der stimulierten T-Lymphozyten.....	94
5.5.2.2.1	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Subpopulationen der T-Lymphozyten	95
5.5.2.3	Nach Stimulation mit Il-2 und R848 können vermehrt B-Lymphozyten gemessen werden	96
5.5.2.3.1	Die beobachteten Subpopulationen der B-Lymphozyten reagieren auf die antigenspezifische Stimulation.....	97
5.5.2.3.1.1	Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen	98
5.5.2.3.1.2	Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells.....	99
5.5.2.3.1.3	B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells.....	100
5.5.2.4	Das Zytokin IFN- γ wird vermehrt in stimulierten PBMC angereichert	103
5.5.2.4.1	IFN- γ Produktion in T-Lymphozyten Subpopulationen ist unter Stimulation nach 96h weiterhin gesteigert	103
5.5.2.4.2	Die IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten und ihren Subpopulationen wird durch die Stimulantien beeinflusst.....	104
5.6	Der IgG-ELISA zeigt eine individuelle IgG Produktion in der Stimulation mit Il-2 und R848	110
5.7	Memory B-Lymphozyten haben einen Einfluss auf die Effekte der Stimulationen in den PBMC-Fraktionen	111

5.7.1	Die Analyse der T-Lymphozyten in den Isolationsfraktionen zeigt nur einen geringen Einfluss der Stimulantien.....	112
5.7.1.1	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Subpopulationen der T-Lymphozyten	113
5.7.2	Durch die Stimulantien werden bei den B-Lymphozyten in den beiden PBMC-Fraktionen unterschiedliche Antworten erreicht.....	115
5.7.2.1	Bei den Subpopulationen der B-Lymphozyten wird durch die Depletion die zelluläre Antwort beeinflusst.....	117
5.7.2.1.1	Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen	117
5.7.2.1.2	Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells.....	119
5.7.2.1.3	B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells.....	121
5.7.3	Der funktioneller Assay zeigt eine Veränderung durch die Isolation auf zellulärer Ebene	123
5.7.3.1	IFN- γ Produktion in T-Lymphozyten Subpopulationen	123
5.7.3.2	IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten und deren Subpopulationen wird durch Anreicherung und Depletion nur geringfügig beeinflusst.....	125
5.8	Vergleich der PBMC vs. memB vs. non-memB durch Ratios.....	131
5.8.1	T-Lymphozyten werden durch die memB Zell Separation beeinflusst	131
5.8.1.1	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Subpopulationen der T-Lymphozyten bleiben anteilig stabil.....	132
5.8.2	Die Separation hat bei den B-Lymphozyten verschiedene Einflüsse	133
5.8.2.1	Subpopulationen der B-Lymphozyten.....	134
5.8.2.1.1	Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen	134
5.8.2.1.2	Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells.....	136
5.8.2.1.3	B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells.....	137
5.8.3	Der funktionelle Assay zeigt Unterschiede in der Stimulationsantwort	139
5.8.3.1	IFN- γ Produktion in T-Lymphozyten Subpopulationen	139
5.8.3.2	IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten und deren Subpopulationen	141
6	Diskussion.....	144
7	Zusammenfassung.....	152
8	Summary.....	153
9	Literaturverzeichnis.....	154
10	Abbildungsverzeichnis.....	165
11	Tabellenverzeichnis.....	170

12	Danksagung	171
13	Affidavit	172
14	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.

2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	alpha
Abb.	Abbildung
ABMR	Antikörpervermittelte Abstoßung, antibody-mediated rejection
AF700	Alexa Fluor 700
ANOVA	Varianzanalyse, analysis of variance
APC	Antigenpräsentierende Zellen, antigen-presenting cells
APC-Cy 7	Allophycocyanine-cyanine-7
ASC	Antikörper-sekretierende Zelle, antibody-secreting cells
β	beta
BCR	B-Zell Rezeptor, B-Cell receptor
BM	Knochenmark, bone marrow
BSA	Bovines Serum Albumin
BUV 395/496	Brilliant Ultraviolet 395/496
BV 421/510/605/650/711/786	Brilliant Violet 421/510/605/650/711/786
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CNI	Calcineurin-Inhibitoren
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin

cs B Cell	isotypengewechselte B-Zelle, class-switched B Cell
cs mem B Cell	isotypengewechselte B-Gedächtniszelle, class switched memory B Cell
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSA	Spender-spezifischer Antikörper, Donor-specific Antibody
DSO	Deutsche Stiftung Organspende
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
et al.	und andere
ETAR	Endothelin Typ A Rezeptor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales Rinderserum, Fetal Bovine Serum
F _c	Kristallines Fragment, crystalline fragment
FCS	Fetales Kälberserum, Fetal Calve Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMO	Fluorescence Minus One
FSC	Forward Scatter
FVS	Fixable Viability Stain
g	Gramm
g	Gravität Zentrifuge
γ	gamma
Gy	Gray
8	

HBs-Antigen	Hepatitis-B Surface-Antigen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigene, human-leucozyte-antigen
HRP	Horseradish-Peroxidase
i.S.	im Serum
IFN	Interferon
IFN- α , - β , - γ	Interferon Alpha, Beta, Gamma
Ig	Immunglobulin
IgA, D, E, G, M	Immunglobulin Klasse A, D, E, G, M
IL	Interleukin
IL-2, -6, -12, -18	Interleukin 2, 6, 12, 18
IMPDH	Ionosinmonophosphat-Dehydrogenase
LAC	Leukozyten Aktivierungscocktail, Leucocyte Activation Cocktail
L-Glut	L-Glutamin
mAb	monoklonaler Antikörper, monoklonal antibody
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MFI	Mean Fluorescence Intensity
μ g	Mikrogramm
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 1/2, major histocompatibility complex I/II
min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimol

mm ²	Quadratmillimeter
µm	Mikrometer
mTor	mechanistic target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaN ₃	Natriumazid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
non-cs mem B Cells	B-Gedächtniszellen ohne Isotypenwechsel, non-class switched memory B Cells
non-HLA	kein humanes Leukozytenantigene, non human-leucozyte-antigen
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster, pathogen-associated molecular patterns
Pb	Plasmablast, Plasmablast
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
Pc	Plasmazelle, Plamacell
PE	Phycoerythrin
PE-Cy 5/7	Phycoerythrin-cyanine 5/7
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein complex-cyanin 5.5
PMT	Photomultipliertube
PMT-Voltage	Spannung des Photomultipliers
PRR	Muster erkennende Rezeptoren, pattern-recognition receptors

R848	Resiquimod
rpm	Umdrehungen pro Minute, revolutions per minute
RPMI	Zellkulturmedium nach Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur (21°C)
s.o.	siehe oben
SD	Standardabweichung
SOP	standard operating procedure
SSC	Side Scatter
stim	stimulierte Zellen
Tab.	Tabelle
TCMR	T-Zell vermittelte Abstoßung, T-Cell mediated rejection
TCR	T-Zell Antigen Rezeptor, T-cell antigen receptor
T _{cyto}	cytotoxische T-Zelle
T _{effector}	T-Effektor-Zelle
T _{FH}	Follikuläre T-Helfer-Zelle
T _{H1,2,17}	Unterklassen 1,2,17 der T-Helfer-Zellen
T _{helper}	T-Helfer-Zelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
UAW	unerwünschte andere Wirkungen
unstim	unstimulierte Zellen
UV	Ultraviolett
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

3 Einleitung

Die vorliegende wissenschaftlichen Arbeit handelt von den immunologischen Interaktionen des Immunsystems in der Transplantationsmedizin. Dabei werden nicht nur die Effekte in transplantierten Patienten untersucht, sondern auch in gesunden Probanden. Zum Verständnis und Einordnung der erhobenen Daten und der Bewertung der Ergebnisse sollen zunächst die Transplantationsmedizin, das Immunsystem und bestehende Therapieoptionen beleuchtet werden.

3.1 Transplantation

Nachdem im Verlauf des 20. Jahrhunderts bereits einige Versuche der Transplantation solider Organe vorgenommen worden waren, wurde durch Joseph Edward Murray 1954 die erste erfolgreiche Nierentransplantation bei eineiigen Zwillingen durchgeführt (Mayer et al. 2015, Jurkiewicz 1990). Obwohl durch intensive Erforschungen und technische Ersatzverfahren die Therapiemöglichkeiten verbessert wurden, stellt die Transplantation solider Organe in der modernen Medizin weiterhin die beste Therapie für Patienten mit terminalem Organversagen dar (Black et al. 2018, Abecassis et al. 2008, Kaufman et al. 2000).

In Abbildung 1 ist die Verteilung der transplantierten Organe in Deutschland für die Jahre 2017 bis 2019 dargestellt.

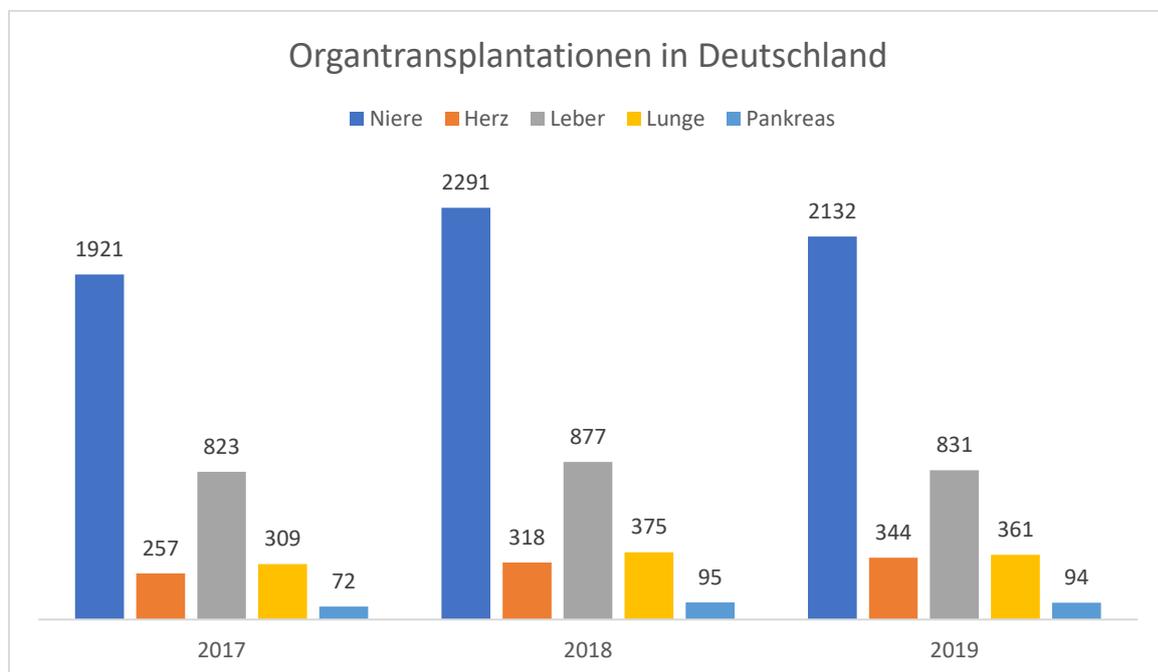


Abbildung 1: Organtransplantationen in Deutschland

Darstellung der Organtransplantationen in Deutschland inklusive Lebendspenden mit Angabe der Organe. Aus Gründen der Übersicht wurden Dünndarmtransplantationen (2017: 3, 2018: 3, 2019: 5) ausgenommen. (Statistisches_Bundesamt 2020)

Trotz häufiger Durchführung von Transplantationen an spezialisierten Zentren und einer europaweiten Kooperation über Euro-Transplant, zeigt sich unverändert eine hohe Zahl an Patienten auf den organspezifischen Wartelisten. Stand 31.12.2019 befanden sich auf der Warteliste für eine Nierenspende 7148 Patienten (DSO 2019a).

Dem gegenüber steht eine nur geringe Zahl an postmortalen Organspendern. Ebenfalls ließ sich im Verlauf der letzten Jahre ein zunächst negativer Trend beobachten (Abb. 2). Diese Tendenz wurde multifaktoriell beeinflusst, jedoch besteht bei allen beteiligten Fachdisziplinen das Interesse, die klinischen Abläufe und primär auch die Erkennung eines potentiellen Spenders zu verbessern. (Brauer et al. 2019, Braun et al. 2020, DSO 2019b)

Ebenfalls wurde durch das Bundesministerium für Gesundheit und seiner Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung eine Reform, sowie vermehrte Kampagnen auf den Weg gebracht. Dadurch soll die Spendenbereitschaft der Bevölkerung erhöht werden (Bundesregierung 2017, Braun et al. 2020).

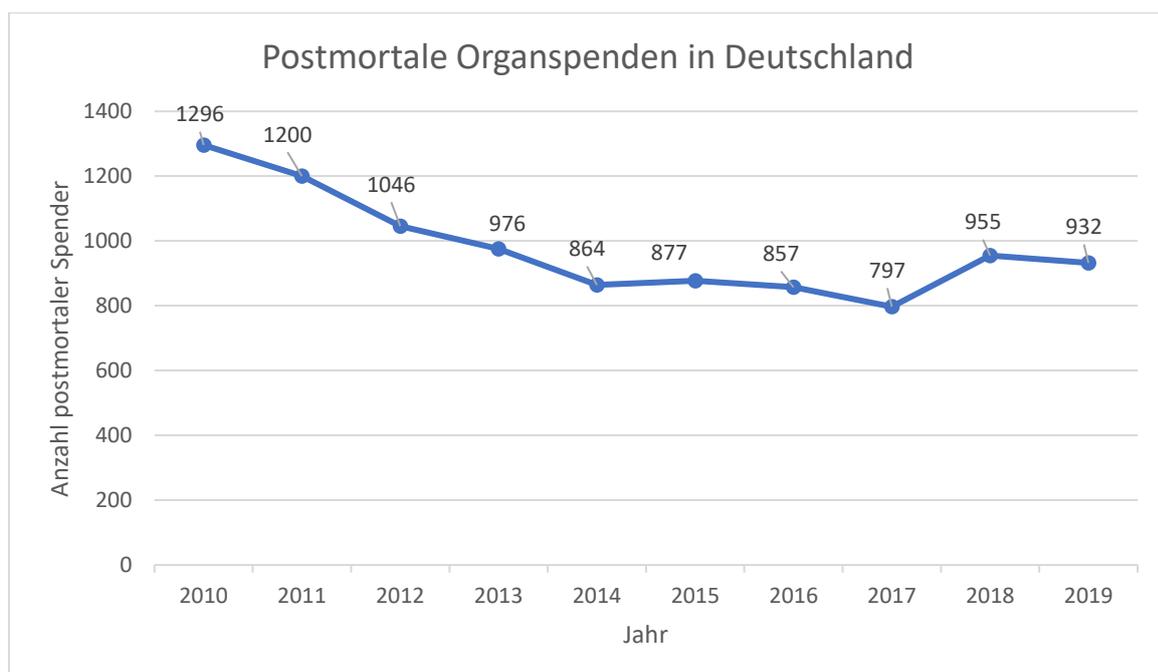


Abbildung 2: Postmortale Organspenden in Deutschland

Darstellung der postmortalen Organspenden in Deutschland im Verlauf der Jahre 2010 bis 2019.
(Quelle: modifiziert nach (DSO 2019b))

Da die genannten Maßnahmen bis dato nur eine Erhöhung der postmortalen Organspenden erreichen konnten, ist folglich ein möglichst langes Transplantatüberleben bei guter Funktion anzustreben. Durch Verbesserungen in der chirurgischen Technik, der intensivmedizinischen

Betreuung, einer differenzierten Spender-Empfänger Paarung und der medikamentösen immunsuppressiven Therapie konnten bereits große Fortschritte im Kurzzeitüberleben erzielt werden. Weiterhin versagen jedoch im Bereich der Nierentransplantationen 30-40 % der Spenderorgane innerhalb von 10 Jahren, bei einem mittleren Transplantatüberleben von 13 Jahren. Den Hauptgrund für deren Versagen stellt die immunvermittelte Abstoßung, trotz der Behandlung mit modernen Immunsuppressiva dar, weshalb deren Mechanismen weiterer Erforschung bedürfen. (Braun et al. 2020, Lamb et al. 2011, Levitsky 2011, Gaston et al. 2010)

3.2 Transplantationsimmunologie

Zum Verständnis der immunologischen Vorgänge im Organismus eines Transplantationspatienten, soll zunächst das Immunsystem eines gesunden Menschen beschrieben werden.

3.2.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist im Laufe der Zeit vielen Krankheitserregern und Pathogenen ausgesetzt. Durch Eigenschaften wie Wärme, Feuchtigkeit und Angebot von Nährstoffen stellt der Mensch einen idealen Nährboden für eine Vielzahl von pathogenen Organismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten dar. In den unzähligen präformierten oder erworbenen Körperhöhlen werden diese Effekte nochmals verstärkt. Aufgabe des Immunsystems oder auch lymphatischen Systems ist es, die Ausbreitung einzudämmen und pathogene Organismen zu bekämpfen. Am Aufbau des lymphatischen Systems sind verschiedene Organe und Gewebegruppen beteiligt, deren Zusammenspiel einen effektiven Umgang mit körperlichen Fremdstoffen ermöglicht. (Pilsel et al. 2018, Nicholson 2016, Murphy 2011)

Doch nicht nur fremde Organismen sind von dieser Abwehrfunktion betroffen, sondern auch neoplastische Zellen, geschädigte körpereigene Zellen oder Fremdstoffe, die im Zuge einer medizinischen Intervention eingebracht werden. Dazu zählen insbesondere auch solide Organtransplantate zur Therapie einer terminalen Insuffizienz. (Liu et al. 2018, Murphy 2011, Przybilla et al. 2001)

Grundsätzlich lässt sich das Immunsystem in ein angeborenes und ein erworbenes, adaptives Immunsystem unterteilen. Deren gemeinsamer Ursprung sind pluripotente hämatopoetische Stammzellen, deren Differenzierung zu lymphatischen und myeloischen Vorläuferzellen den Grundstein für eine erste Unterscheidung legt. (Nicholson 2016, Murphy 2011, Chaplin 2010)

3.2.1.1 Phänotypisierung durch Cluster of Differentiation

Da eine reine mikroskopische Unterscheidung der Zellen im weiteren Verlauf der Differenzierung schwieriger oder auch unmöglich wird, war eine weitere phänotypische Unterscheidung erst wieder durch die Entdeckung von monoklonalen Antikörpern möglich. Damit konnten bestimmte Moleküle auf der Oberfläche von Leukozyten und anderen Immunzellen identifiziert werden. Die Moleküle werden Cluster of Differentiation (CD) genannt. Durch ein bestimmtes Muster aus CDs können nun die Subpopulationen identifiziert werden. (Clark et al. 2016, Engel et al. 2015, Im et al. 2011)

Beispielsweise zeichnet sich das CD45 Molekül, eine Rezeptorprotein-Tyrosin-Phosphatase, dadurch aus, dass es auf allen gesunden Leukozyten exprimiert wird. Deshalb ist dieses Oberflächenantigen zur Identifizierung der Leukozyten sehr gut geeignet. (Rheinlander et al. 2018, Im et al. 2011, Cassens 1996)

3.2.1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist eine genetisch vorgegebene erste Immunabwehr des Körpers. Es werden primär keine spezifischen Antigene erkannt, sondern pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Diese Muster, wie bakterielle Lipopolysaccharide, Peptidoglykane oder auch bakterielle DNA, gelten als hochgradig konserviert und können bei vielen Mikroorganismen gefunden werden. Bezeichnend ist, dass diese Muster meist nur von pathogenen Mikroorganismen produziert werden, für deren Pathogenität essentiell und bei mehreren Angehörigen einer Pathogenklasse zu finden sind. Diese PAMPs werden mit Hilfe von Muster erkennenden Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRR) detektiert. Bei Penetration eines pathogenen Mikroorganismus durch die körperliche Barriere, die durch das Epithel von Haut und Schleimhaut gebildet wird, trifft dieser zunächst auf antimikrobielle Enzyme und Peptide. Zusätzlich wird das plasmatische Komplementsystem aktiviert, dessen Endstrecke zur direkten Zellyse und zur Aktivierung der zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems führt. Gewebsständige oder zirkulierende Makrophagen erkennen mit ihren PRRs die PAMPs des Pathogens und schütten daraufhin Zytokine und Chemokine aus. Dies führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit vermehrter Durchblutung und über Chemotaxis zur Einwanderung weiterer Immunzellen. Zu diesen gehören unter anderem Monozyten, die zu Makrophagen reifen, große Mengen an neutrophilen Granulozyten und dendritische Zellen. Diese Reaktionen führen meist in den ersten 96 Stunden zu einer Elimination des Pathogens. Sollte dieses jedoch weiter bestehen, wird das erworbene Immunsystem unter anderem durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert. (Murphy 2011, Medzhitov et al. 2000, Chaplin 2010, Kim et al. 2009, Botto et al. 2009, Hoffmann et al. 1999)

3.2.1.2.1 Makrophagen

Wie bereits erwähnt differenzieren sich Makrophagen aus myeloischen Vorläuferzellen. Im Blut zirkulierende Monozyten können sich durch den Einfluss von Zytokinen zu diesen differenzieren. Neben der Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, besteht die Hauptfunktion in der Phagozytose des Pathogens. Makrophagen können daraufhin auch als APC, über das Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 2 Molekül (major histocompatibility complex II, MHC II), für T-Lymphozyten fungieren. Hier wird aber eher von einer Effektorfunktion auf bereits geprägte T-Lymphozyten ausgegangen. Makrophagen können wiederum auch von T_H1 - Zellen aktiviert werden. Dies zeigt die komplexe Vernetzung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. (Gordon et al. 2017, Hirayama et al. 2017, Murphy 2011, Kim et al. 2009)

3.2.1.2.2 Granulozyten

Ebenfalls myeloischen Ursprungs sind Granulozyten die in Neutrophile, Eosinophile und Basophile unterteilt werden können. Diese Unterscheidung erfolgt nach ihren reichhaltig im Zytoplasma enthaltenen Granula und derer histologischer Anfärbung. Die größte Subpopulation mit einem Anteil von bis zu 95% und dem größten Anteil an der Infektionsabwehr, sind die Neutrophilen. Sie sind grundsätzlich nicht in gesundem Gewebe anzutreffen, sondern zirkulieren im Blut in einer schnell aktivierbaren Zwischenstufe zwischen Ruhe und kompletter Aktivierung. Nach Aktivierung wandern Neutrophile in das betroffene Gewebe ein und beginnen mit der Phagozytose. Diese führt anschließend zur Apoptose und diese zu einer verstärkten Inflammation. (Schulze et al. 2018, Murphy 2011, Kobayashi et al. 2009) Die Funktion der Eosinophilen und Basophilen liegt weniger in der Phagozytose, sondern mehr in der Sekretion von zytotoxischen Substanzen, sowie Zytokinen und Chemokinen. (Sheshachalam et al. 2014, Murphy 2011)

3.2.1.2.3 Dendritische Zellen

Die Bezeichnung dieser Zellen beruht auf den verästelten Zytoplasmfortsätzen. Dendritische Zellen sind ebenfalls myeloischen Ursprungs und präsentieren nach Phagozytose und Prozessierung die Antigene von pathogenen Organismen auf ihrer Oberfläche als Peptid-MHC II-Komplexe. Durch ihre Eigenschaft als APC stimulieren und unterstützen sie die Reifung von T- und B-Zellen. Damit stellen sie eines der großen Bindeglieder zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem dar. Zusätzlich können sie jedoch auch Zytokine wie Interferon (IFN) $IFN-\alpha$ und $IFN-\beta$ und die Interleukine

(IL) IL-6, IL-12 und IL-18 sekretieren. (Murphy 2011, Takeuchi et al. 2010, Blanco et al. 2008, Scott et al. 2005)

3.2.1.2.4 Natürliche Killerzellen

Als Zellen des angeborenen Immunsystems stellen Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine Sonderform dar. Sie sind lymphatischen Ursprungs und sekretieren bei Aktivierung Granula, deren zytotoxische Komponenten ähnlich derer der T-Zellen wirken. Zusätzlich wirken sie primär gegen intrazelluläre Erreger, wie Viren. NK-Zellen erkennen über unspezifische keimbahnkodierte Rezeptoren Moleküle auf der Oberfläche infizierter oder maligne veränderter Zellen. Werden diese Zellen erkannt, wird unter anderem eine hohe Menge IFN- γ zur Infektionsabwehr ausgeschüttet, bevor die Produktion dieses Interferons durch T-Zellen erfolgen kann. So können virale Erkrankungen effektiv eingedämmt werden, bevor das adaptive Immunsystem aktiviert ist. (Paul et al. 2017, Murphy 2011, Sinkovics et al. 2005)

3.2.1.3 Das adaptive Immunsystem

An die Immunantwort des angeborenen Immunsystems schließt sich direkt die Antwort des adaptiven Immunsystems an. Dieser Bereich des Immunsystems zeichnet sich dadurch aus, dass er im Vergleich zum angeborenen Immunsystem nicht auf eine möglichst breite und unspezifische Weise Pathogene identifiziert und eliminiert, sondern bei dessen Versagen durch zelluläre Interaktion und Reifung eine effektive und spezifische Immunantwort induziert. Die bereits erwähnten dendritischen Zellen und zu einem geringen Teil auch Makrophagen wandern nach Phagozytose und Prozessierung des Pathogens in die peripheren lymphatischen Organe. Nach dieser Prozessierung wird das Pathogen als Antigen über ein MHC II Molekül auf der Zelloberfläche der APC präsentiert. Durch den Kontakt mit MHC II und weiteren als Kostimulator wirkenden Molekülen wird eine Reifung und Aktivierung der T-Lymphozyten induziert. Dies führt über diverse Zell-Zell-Interaktionen zu einer weiteren Differenzierung von T- und B-Lymphozyten. Diese beiden Lymphozytenpopulationen und deren Subpopulationen bilden in ihrem Zusammenwirken die Grundlage des adaptiven Immunsystems, dessen komplexe Zusammenhänge bis heute nicht zur Gänze verstanden sind. (Marshall et al. 2018, Murphy 2011, Clem 2011, Chaplin 2010, Schoenborn et al. 2007)

3.2.1.3.1 T-Zellen

Die Bezeichnung T-Lymphozyt geht auf die Thymusdrüse als Reifungsort und den lymphatischen Ursprung zurück. Zunächst erfolgt die Bildung der Vorläufer T-Zellen im Knochenmark. Dort entwickeln diese naiven T-Zellen ohne Antigenkontakt, neben verschiedenen anderen Oberflächenmolekülen, das für T-Zellen charakteristische CD3. Dieses Molekül bildet als Dimer mit dem T-Zell Antigen Rezeptor (T-Cell antigen receptor, TCR) den TCR-CD3-Komplex und übernimmt dessen Signalfunktion. Der TCR ist ein hochvariables Heterodimer, weshalb bei der Reifung für jede naive T-Zelle eine unterschiedliche Antigen-spezifität herausgebildet wird. Über Zwischenstufen bilden sich zunächst Thymozyten heraus. Diese tragen CD4 und CD8 auf ihrer Oberfläche. Diese wandern aus dem Knochenmark aus und kommen mit den Stromazellen des Thymus in Kontakt, die sowohl MHC I, das körpereigene Antigene präsentiert, als auch MHC II, das körperfremde Antigene präsentiert, auf ihrer Oberfläche tragen. MHC I ist auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers zu finden. Daraus bilden sich, je nach Reaktivität des TCR-CD3-Komplexes mit dem Antigen-MHC-Komplex $CD3^+/CD4^+/CD8^-$ und $CD3^+/CD4^-/CD8^+$ Lymphozyten heraus. Dies wird als positive Selektion bezeichnet. Besitzen diese jedoch eine zu starke Bindungsaffinität mit dem körpereigenen Antigen, führt dies zu Deletion des naiven Lymphozyten. Dies wird auch als negative Selektion bezeichnet. (Kurd et al. 2016, Resop et al. 2015, Murphy 2011)

Anschließend erfolgt die weitere Entwicklung in den peripheren Organen des lymphatischen Systems. Trifft ein naiver T-Lymphozyt nun auf eine APC, meist dendritische Zellen, die sein spezifisches Antigen präsentiert, wird dessen Differenzierung zur T-Effektor-Zelle ($T_{effector}$) stimuliert. Diese T-Lymphozyten können nun aktiviert werden und an der Immunantwort teilnehmen. Nach erfolgreicher Elimination der pathogenen Zielzelle gehen die meisten dieser T-Effektor-Zellen zugrunde. Ein kleiner Anteil der aktivierten oder $T_{effector}$ T-Zellen differenziert sich zu T-Gedächtnis-Zellen, die proliferieren und als das immunologische Gedächtnis bei Reinfektion eine spezifische Immunantwort bewirken können. (Ratajczak et al. 2018, Farber et al. 2014, Pennock et al. 2013, Murphy 2011)

3.2.1.3.1.1 T-Helfer-Zellen

Die $CD3^+/CD4^+/CD8^-$ T-Lymphozyten werden als T-Helfer-Zellen (T_{helper}) bezeichnet. Deren Funktionsweise besteht in der Aktivierung durch MHC II der APC. Das bezeichnende Molekül CD4 ist ein Korezeptor des TCR-CD3-Komplexes bei der Bindung an MHC II.

Die T_{helper} können auf unterschiedliche Weise die Immunantwort lenken und werden in die fünf

funktionellen Klassen T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} , regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und folliculäre T_{helper} (T_{FH}) aufgeteilt. Die T_{H1} Zellen aktivieren Makrophagen um phagozytierte Erreger zu eliminieren. T_{H2} Zellen aktivieren über Zytokine eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Plasmazellen. T_{H17} Zellen aktivieren neutrophile Granulozyten im frühen Stadium der adaptiven Immunantwort. Diese drei Klassen der frei zirkulierenden T_{helper} tragen ebenfalls zur Aktivierung von B-Zellen bei. T_{FH} sind spezielle, im Lymphgewebe angesiedelte T_{helper} die eine Differenzierung der B-Zellen unterstützen. Diesen aktivierenden T_{helper} stehen die T_{reg} gegenüber. Diese inhibieren die Aktivierung von T-Zellen, um einer überschießenden Immunantwort oder auch Autoimmunität entgegen zu wirken. (Luckheeram et al. 2012, Murphy 2011, Zygmunt et al. 2011)

3.2.1.3.1.2 Zytotoxische T-Zellen

Eine weitere wichtige Subpopulation der T-Lymphozyten sind die $CD3^+/CD4^-/CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (T_{cyto}). Mit dem TCR und CD8 als Korezeptor werden die MHC I Moleküle der Zielzelle erkannt, die veränderte, intrazellulär synthetisierte, Proteine präsentieren. Dies ist bei malignen oder von einem Virus befallenen Zellen der Fall. Diese Aktivierung der T_{cyto} bedarf meist einer stärkeren Stimulation als die der T_{helper} . Die Kostimulation kann entweder durch reife dendritische Zellen oder T_{helper} Zellen erfolgen. Bei Aktivierung wird die Apoptose der Zielzelle durch zytotoxische Granula und Zytokine induziert. Eines dieser Zytokine ist $IFN-\gamma$ das ebenfalls in geringerer Menge von NK-Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzt wird. (Davenport et al. 2020, Durgeau et al. 2018, Murphy 2011)

3.2.1.3.1.3 $IFN-\gamma$ in T-Zellen

Das Zytokin $IFN-\gamma$ ist ein essentieller Bestandteil in der Funktionalität der T-Lymphozyten. Es hat sich gezeigt, dass die intrazelluläre Produktion als Marker für aktivierte T-Lymphozyten genutzt werden kann. Diese wird sowohl in $CD4^+$ T-Lymphozyten, als auch in $CD8^+$ T-Lymphozyten beobachtet. Die Bedeutung von $IFN-\gamma$ besteht nicht nur in der direkten Inhibierung der viralen Replikation, sondern vor allem in seinen regulatorischen und modulatorischen Effekten auf das gesamte Immunsystem. Dies betrifft nicht nur die Abwehr körperfremder Stoffe, sondern auch die Bekämpfung maligner Prozesse. (Green et al. 2013, Schoenborn et al. 2007, Tewari et al. 2007, Rosenzweig et al. 2005)

3.2.1.3.2 B-Zellen

Der erste Nachweis von B-Lymphozyten erfolgte in der Bursa Fabricii im Kloakendach von Hühnern und konnte bereits als wichtiger Bestandteil des Immunsystems beschrieben werden (Sorvari et al. 1977). In der modernen englischen Literatur wird die Bezeichnung B-Lymphozyt häufig auf das Knochenmark (bone marrow, BM) als Reifungsort zurückgeführt (Murphy 2011).

B-Lymphozyten sind dadurch gekennzeichnet, dass sie, neben diversen Rezeptoren, Immunglobuline (Ig) als Teil des B-Zell Rezeptors (B-Cell receptor, BCR) auf ihrer Oberfläche tragen. Während der Reifung im Knochenmark aus einer lymphatischen Vorläuferzelle kommt es, über funktionelle Rekombination der kodierenden Genloki des Immunglobulins, zu einer Vielzahl variabler Bindungsaffinitäten für Antigene. Unreife B-Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche IgM in Verbindung mit dem pre-BCR. Dessen Affinität zu körpereigenen Antigenen wird an Stromazellen überprüft, und die unreife B-Zelle bei Autoreaktivität entweder eliminiert oder zu erneuter Rekombination angeregt. Nach dieser Selektion wandern die unreifen B-Zellen in die peripheren Lymphorgane. Dort erfolgt eine positive Selektion, die bei entsprechend guter Antigenbindung über den pre-BCR zu einer Reifung hin zu naiven B-Zellen mit IgD führt. (Pieper et al. 2013, Murphy 2011, Perez-Andres et al. 2010)

Diese reifen naiven B-Zellen wandern nun zwischen den verschiedenen peripheren Lymphorganen und dem BM über den Blutfluss umher, um dort auf ihr spezifisches Antigen zu treffen. Wird dieses vom BCR gebunden, kann sich die naive B-Zelle unter T_{helper} -Einfluss weiter differenzieren. Es erfolgt eine Proliferation und eine Differenzierung zu Antikörper-sekretierenden Zellen (antibody-secreting cells, ASC), B-Gedächtnis-Zellen ohne Isotypenwechsel (non-class switched memory B cells, non-cs mem B Cells) oder auch B-Zellen des Keimzentrums. (Bordon 2015, Murphy 2011, Perez-Andres et al. 2010)

Aktivierte B-Zellen zeigen jedoch auch weitere Interaktionen mit T-Zellen. Es hat sich gezeigt, dass eine gegenseitige Beeinflussung besteht. B-Zellen können durch Antigenpräsentation und Zytokinsekretion die T-Zell Immunantwort über T-Effektor-Zellen modulieren. (Ballesteros-Tato et al. 2014, Gray et al. 2007)

Zur Differenzierung der B-Zell Population aus den $CD45^+$ Leukozyten kann das Molekül CD19 aus dem BCR-Korezeptor-Komplex identifiziert werden. Dieser setzt sich aus CD19, CD21 und CD81 zusammen. (Clavarino et al. 2016, Murphy 2011, Biosciences 2019)

3.2.1.3.2.1 Immunglobuline und die humorale Immunantwort

Immunglobuline sind lösliche Proteine, die von ASCs produziert und ausgeschüttet werden und eine spezifische Bindungsaffinität auf bestimmte Antigene besitzen. Auch werden sie an der Oberfläche

von B-Zellen einzeln oder als Teil des BCR präsentiert. Es sind fünf Isotypen der Immunglobuline im Menschen bekannt: IgD, IgG, IgM, IgA und IgE. IgD ist neben seiner Funktion in der B-Zell Reifung nur in minimalen Mengen zu finden. IgG und das als Dimer vorkommende IgA sind in den extrazellulären Flüssigkeiten anzutreffen. IgG und das Pentamer IgM finden sich im Blut. IgA ist vornehmlich in den Sekreten zu finden. IgE findet sich meist nur auf Mastzellen und ist vor allem mit allergischen Reaktionen vergesellschaftet. IgG wird transplazentar an den Fetus weitergegeben und stellt in den ersten Lebenswochen den sogenannten Nestschutz dar. Außerdem sind von diesem Immunglobulin 4 weitere Isotypen IgG1-4 bekannt. Im zentralen Nervensystem (ZNS) sind unter physiologischen Umständen keine Immunglobuline nachzuweisen. (Berlot et al. 2015, Murphy 2011, Schroeder et al. 2010)

Die Immunglobuline oder auch Antikörper wirken auf verschiedene Weise in der Immunabwehr. Primär werden über die gebundenen Immunglobuline B-Zellen aktiviert. Zusätzlich besitzen sie jedoch auch direkte Wirkungen auf das Pathogen. Pathogene benötigen zur Penetration von Zellen Bindungsmoleküle. Deren Gegenstück kann im Sinne einer Neutralisation von den Antikörpern bedeckt werden. Diese von Antikörpern bedeckten Pathogene sind nun im Sinne der Opsonierung von Phagozyten besser erkennbar. Auch kann die Antikörperbindung über das angeborene Komplementsystem zu einer Elimination des Pathogens führen. (Murphy 2011, Schroeder et al. 2010, Schwenk et al. 2003, Yang et al. 1989)

3.2.1.3.2.2 Antibody Secreting Cells: Plasmablasten und Plasmazellen

Nach Bindung des Antigens an den BCR wird dieses zunächst internalisiert und an MHC II gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert. Dieses kann nun von T_{helper} Zellen erkannt und die B-Zelle zur Proliferation aktiviert werden. Bei bestimmten Antigenen kann diese Aktivierung auch unabhängig von T-Zellen erfolgen. Zusätzlich erfolgt neben der Proliferation weiter somatische Hypermutation, die zu einer Affinitätssteigerung und unter CD40 Einfluss zu einem Isotypenwechsel der B-Zellen führen kann. Es erfolgt eine Zunahme der Isotypen IgG und IgA. Diese B-Zellen nach Isotypenwechsel können über das Fehlen von IgD und IgM auf ihrer Oberfläche identifiziert werden. Weiterhin besitzen sie das Molekül CD20, das als Oligomer einen Ca²⁺ Kanal bildet, und CD38, eine NAD-Glycohydrolase. (Biosciences 2019, Clavarino et al. 2016, Murphy 2011)

Einige dieser durch Proliferation entstandenen aktivierten B-Zellen differenzieren sich anschließend zu kurzlebigen Antikörper-produzierenden Plasmablasten (Plasmablasts, Pb). Diese produzieren und sekretieren nun in großen Mengen ihr auf der Zelloberfläche präsentiertes Immunglobulin. Die Plasmablasten können sich anschließend weiter zu Plasmazellen (Plasmacells, Pc) differenzieren, die nicht mehr wachsen oder den Isotypen wechseln, aber weiterhin Immunglobuline produzieren.

Außerdem präsentieren sie nicht länger MHC II und ihr Immunglobulin nur in geringen Mengen auf der Oberfläche. Die Plasmablasten gehen nach Ende einer weiteren Stimulation, also einer Elimination oder Verlagerung des Pathogens, innerhalb einiger Tage zugrunde. Die Plasmazellen gehen in großen Teilen in die Apoptose, wandern ins Knochenmark oder verbleiben im peripheren Lymphgewebe. Die isotypengewechselten B-Zellen (class-switched B Cells, cs B Cells) im Lymphgewebe können sich nun entweder zu langlebenden Antikörper-produzierenden Zellen oder isotypengewechselten B-Gedächtniszellen (class switched memory B Cells, cs mem B Cells) differenzieren. (Zhang et al. 2016, Marshall et al. 2011, Murphy 2011, Tangye et al. 2003)

3.2.1.3.2.3 B-Zell Immungedächtnis

Wie bereits beschrieben kann die Differenzierung der B-Zellen vor und nach Antigenkontakt auch zu einer B-Gedächtnis-Zelle führen. Wie bei T-Gedächtnis-Zellen können diese nach erneutem Antigenkontakt reaktiviert werden. Diese Reaktivierung und Differenzierung der memory B-Zellen kann bei virusspezifischen Antigenen ohne T-Zell Interaktion induziert werden, benötigt jedoch für monomere Proteinantigene meist deren Kostimulation. Dabei differenzieren sie sich über aktivierte B-Zellen des Keimzentrums zu ASC, um die initiale humorale Immunabwehr durch langlebige Plasmazellen zu unterstützen. Jedoch unterscheidet sich diese sekundäre Immunantwort von der primären Immunantwort bei erstem Pathogenkontakt. Während die aktivierten B-Zellen, wie bereits beschrieben, bei Erstkontakt eine somatische Hypermutation durchlaufen, ist diese bei memory B-Zellen bereits erstmals geschehen. Folglich sind die nun produzierten Immunglobuline affiner und im Isotypen gewechselt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass bei jeder Reinfektion eine erneute somatische Hypermutation im Stadium der aktivierten B-Zellen stattfindet. Dieser Entwicklung sind vor allem IgM⁺ memory B-Zellen unterworfen. Somit wird der Anteil an spezifischerem IgG im Serum erhöht, während IgM absinkt. (Minton 2015, Kurosaki et al. 2015, Kugelberg 2015, Murphy 2011, Perez-Andres et al. 2010, Hebeis et al. 2004, Tangye et al. 2003)

3.2.2 Impfung

Eine der grundlegenden Nutzungsweisen des adaptiven Immunsystems in der medizinischen Praxis ist die Impfung. Dabei werden dem Immunsystem des Patienten entweder, in ihrer Pathogenität abgeschwächte, sogenannte attenuierte Krankheitserreger, oder aufgereinigtes und angereichertes Antigen toter Krankheitserreger präsentiert. Auch rekombinante Antigene verschiedenen Ursprungs können verwendet werden. Dadurch wird über eine primäre Immunantwort die Bildung von antigenspezifischen memory B-Zellen und langlebigen ASC induziert. Bei erneuter Impfung wird eine

sekundäre Immunantwort im Sinne einer Reinfektion stimuliert und erhöht so, wie bereits beschrieben, die Affinität und Konzentration der spezifischen Immunglobuline durch somatische Hypermutation (Abb. 3). Dies wird als passive Immunisierung bezeichnet. Da langlebige ASC im Körper verbleiben, können zirkulierende antigenspezifische Immunglobuline im peripheren Blut nachgewiesen werden. Diese werden als Titer bezeichnet, der mit der Immunität des Patienten auf eine Infektion mit dem Pathogen korreliert. Sollte dieser wegen ausbleibender Infektion absinken, kann das Immunsystem über eine erneute Impfung geboostet werden. (Clem 2011, Murphy 2011, Soler et al. 2007, Ada 2001)

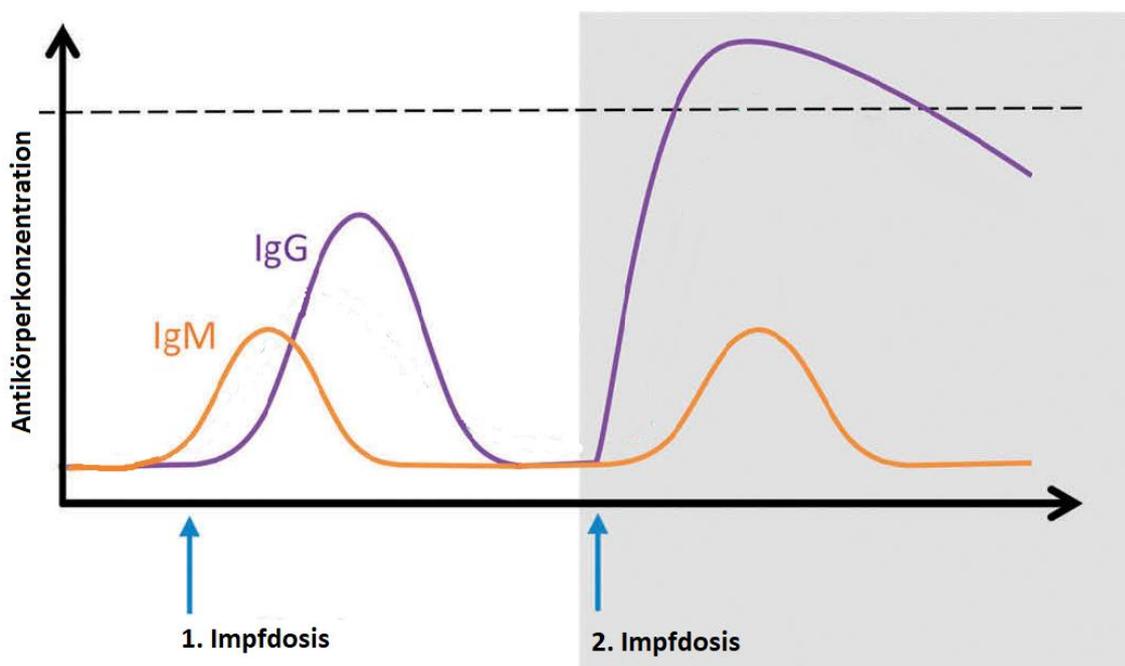


Abbildung 3: Konzentration und Affinität der Immunglobuline nach Impfung

Dargestellt ist die Konzentration an zirkulierendem IgM und IgG nach 1. und 2. Immunisierung. (modifiziert nach (Ndungo et al. 2020))

Ebenfalls erwähnt sei die passive Impfung, bei der dem Patienten für einen schnellen Schutz Antikörperkonzentrate gegen den Krankheitserreger injiziert werden. Dies ist beispielsweise bei ungeimpften Personen nach einem tollwutsuspekten Tierbiss von Nöten, da eine aktive Immunisierung zu langsam wirken würde und der Patient von einer letal verlaufenden Krankheit bedroht ist. (El-Sayed 2018, Slifka M. K. 2018, Ada 2001)

3.2.3 Immunologie des Transplantationspatienten

3.2.3.1 Einteilung der Transplantatabstoßung der Niere

Für eine Transplantatabstoßung der Niere gibt es diverse klinische Parameter. Diese führt meist zu einem Transplantatversagen. Bei Verdacht auf eine Abstoßung sollte jedoch fast immer eine Biopsie zur histopathologischen Beurteilung durchgeführt werden. Ein Verdacht besteht bei einem akuten Anstieg der GFR oder des Kreatinins im Serum (i.S.), Zeichen einer langfristigen Funktionsverschlechterung über Wochen oder dem Neuauftreten einer Albuminurie oder glomerulären Hämaturie. Es zeigt sich meist eine interstitielle Entzündungsreaktion mit eingewanderten Immunzellen, Tubulitis, Doppelwandung von Membranen bei Komplement- oder Immunglobulinablagerungen und weitere Endothelschädigung. (Suwelack et al. 2018, Haas et al. 2018)

Für die Transplantatnephropathie werden diese histologischen Kriterien nach der Banff-Klassifikation eingeteilt. Mithilfe dieser Klassifikation werden die Befunde der Nierenbiopsien im klinischen Alltag vereinheitlicht, um Therapieentscheidungen besser treffen zu können. Eine erste Klassifikation wurde 1997 als Banff 97 vorgestellt, wurde jedoch im Verlauf angepasst, verbessert und bestimmte Kategorien gestrichen. (Loupy et al. 2020, Haas et al. 2018, Racusen et al. 1999)

Grundlage der Klassifikation ist die Einteilung des histologischen Befundes in vier Kategorien. Kategorie 1: Normal oder unspezifische Veränderungen; Kategorie 2: Antikörpervermittelte Veränderungen (ABMR); Kategorie 3: Borderline Veränderungen; Kategorie 4: T-Zell vermittelte Abstoßung (TCMR). Bei der ABMR wird nach verschiedenen Kriterien in eine aktive oder chronische, bei der TCMR in eine akute bzw. chronische Abstoßungsreaktion unterschieden. (Loupy et al. 2020, Haas et al. 2018)

3.2.3.2 Reaktion des angeborenen Immunsystems auf das Allograft

Wie bei jedem Fremdkörper, der die körperliche Barriere durchdringt, wird zunächst das angeborene Immunsystem aktiviert. Zunächst führt der ischämische Stress auf das Allograft vor und bei Reperfusion zu einer Freisetzung von Komplementfaktoren. Zusätzlich werden durch den nicht zu vermeidenden Zelluntergang Entzündungsmediatoren freigesetzt. Diese beiden Faktoren führen zu einer Einwanderung von Zellen des angeborenen Immunsystems, der Phagozytose von Zellmaterial und der anschließenden Präsentation für die Zellen des adaptiven Immunsystems. Diese beiden Bereiche des Immunsystems beschleunigen sich gegenseitig durch Freisetzung von Zytokinen. (Ochando et al. 2020)

3.2.3.3 Reaktion des adaptiven Immunsystems auf das Allograft

Die adaptive Immunreaktion nach einer Transplantation verläuft ähnlich einer Impfung. Während bei der Impfung eine Immunabwehr induziert werden soll, ist diese im Setting der Transplantation medikamentös zu verhindern. Auch hier erfolgt die Erkennung der körperfremden Zellen durch Identifizierung von Alloantigenen. Die bereits beschriebenen MHC Klasse 1 und 2 Moleküle werden beim Menschen als humane Leukozytenantigene (human-leucozyte-antigen, HLA) bezeichnet und gemäß ihrer Grundstruktur eingeteilt. HLA-A, -B und -C entsprechen der HLA oder MHC Klasse 1, während HLA-DR, -DP und -DQ der HLA oder MHC Klasse 2 entsprechen. HLA-A, HLA-B und HLA-DR haben sich im Zusammenhang mit Transplantationen als kritische Antigene erwiesen. (Zou et al. 2010, Choo 2007, Opelz et al. 1994)

Ebenfalls zeigte sich, dass auch andere Strukturen des Transplantats als Antigen erkannt und bekämpft werden. Diese werden im Kontrast zu den HLA-Antigenen als nicht-HLA (non-HLA) Antigene bezeichnet. Zu diesen zählen die Zellen des vaskulären Endothels wie der Endothelin Typ A Rezeptor (ETAR), das intermediäre Filament Vimentin, das C-terminale Fragment von Perlecan, der Angiotensin Typ 1 Rezeptor, Bestandteile der glomerulären Filtrationsbarriere und weitere. Es zeigte sich, dass auch diese non-HLA Antikörper mit einem verkürzten Transplantatüberleben assoziiert sind. (Zhang et al. 2016, Dragun et al. 2016, Dragun et al. 2009, Cai et al. 2006)

3.2.3.3.1 T-Zell vermittelte Transplantatabstoßung

Die akute und direkte T-Zell Abstoßung erfolgt bei HLA Inkompatibilität innerhalb kurzer Zeit. Ist die Inkompatibilität jedoch vor Transplantation ausgeschlossen worden, kann es dennoch durch die Präsentation der intrazellulären Proteine trotzdem zu einer Stimulation der T-Zellen kommen. Dies wird dadurch erklärt, dass sich diese durch polymorphe Strukturen interindividuell unterscheiden. In der durch APC stimulierten T-Zell Immunantwort lassen sich zwei Wege unterscheiden. Die direkte und die indirekte Fremderkennung. (Hughes et al. 2018, Murphy 2011, Issa et al. 2010)

In der direkten Fremderkennung kommt es über APC des Spenders zu einer Stimulation naiver T-Zellen. Diese APC werden im Zuge der Transplantation aus dem Spenderorganismus mit übertragen und über die Blutbahn in die peripheren Lymphorgane transportiert. Der durch diese T-Effektor-Zellen ausgelöste Abstoßungsreaktion sollte, aufgrund ihres frühen Auftretens und Stärke, durch entsprechende „Säuberung“ des Transplantats vorgebeugt werden. (Murphy 2011, Carbone et al. 1998, Talmage et al. 1976)

Die indirekte Fremderkennung erfolgt durch die APC über den bekannten Weg. Dabei werden HLA Moleküle und andere Antigene von APC aufgenommen und den naiven T-Zellen in den peripheren

Lymphorganen präsentiert. Diese Immunreaktion kann langfristig zu einer chronischen Abstoßung führen. (Murphy 2011, Baker et al. 2001, Lakkis et al. 2000)

3.2.3.3.2 B-Zell bzw. antikörpervermittelte Transplantatabstoßung

Neben der Induktion einer T-Zell Immunantwort, zeigt sich auch eine Abstoßung die von B-Zellen und deren Antikörpern vermittelt wird. Manche Empfänger besitzen aus unterschiedlichen Gründen wie vorheriger Schwangerschaft, stattgefundenen Bluttransfusionen oder vorherigen Transplantationen bereits präformierte Alloantikörper aus langlebigen ASC. Diese können gegen HLA- und nicht-HLA-Antigene gerichtet sein. Solche Spender-spezifischen Antikörper (Donor Specific Antibody, DSA) führen meist zu einer hyperakuten bis subakuten Abstoßung und sollten deshalb vor Transplantation und auch nach Transplantation über verschiedene Methoden wie ein Luminex Assay oder Crossmatch ausgeschlossen werden. (Zhang 2018, Heck et al. 2015, Chong et al. 2015, Murphy 2011, Li 2010)

Auch kann es zu einer de novo Synthese kommen. Hochgradige HLA Inkompatibilität, fehlerhafte oder ausbleibende Einnahme der Immunsuppressiva oder Entzündungsvorgänge im Organ stellen dafür Risikofaktoren dar. Durch die DSA können drei bereits beschriebene immunologische Reaktionen hervorgerufen werden (Abb. 4). Zum einen kann das Komplementsystem und somit die zelluläre Abwehr aktiviert werden. Zum anderen kann es zur Bindung an Endothelzellen kommen. Im immunzellvermittelten Weg kommt es daraufhin zu einer Stimulation von NK-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen durch deren Reaktion auf das F_c-Fragment des DSA. Dem gegenüber steht der nicht-immunzellvermittelte Weg, bei dem es zur Zellschädigung und Endothelproliferation kommt. Diese beiden nicht-komplementvermittelten Mechanismen führen eher zu einer subakuten bis chronischen Gewebeschädigung. (Lee et al. 2018, Zhang 2018, Kauke 2017)

Es können jedoch nicht nur langlebige ASCs durch ihre Produktion von DSA zur verstärkten Alloreaktion beitragen, sondern auch memory B-Zellen. Diese können durch T-Zellen bei Antigenkontakt reaktiviert werden. Es zeigte sich bei Patienten mit stabiler Funktion der Transplantatniere unter medikamentöser T-Zell Suppression, keine Verringerung der memory B-Zellen, sondern eine bleibende Reduktion der Plasmablasten. Eine Reaktivierung kann jedoch auch T-Zell unabhängig erfolgen und ist deshalb nicht durch alleinige Suppression der T-Zellen zu verhindern. Die Identifizierung dieser präformierten Spender-spezifischen memory B-Zellen aus dem Pool der protektiven memory B-Zellen stellt eine große Herausforderung dar. Dadurch könnte mit gezielter Immuntherapie ein längeres Transplantatüberleben erzielt werden. (Schlosser et al. 2017, Kurosaki et al. 2015, Chong et al. 2015, Li 2010)

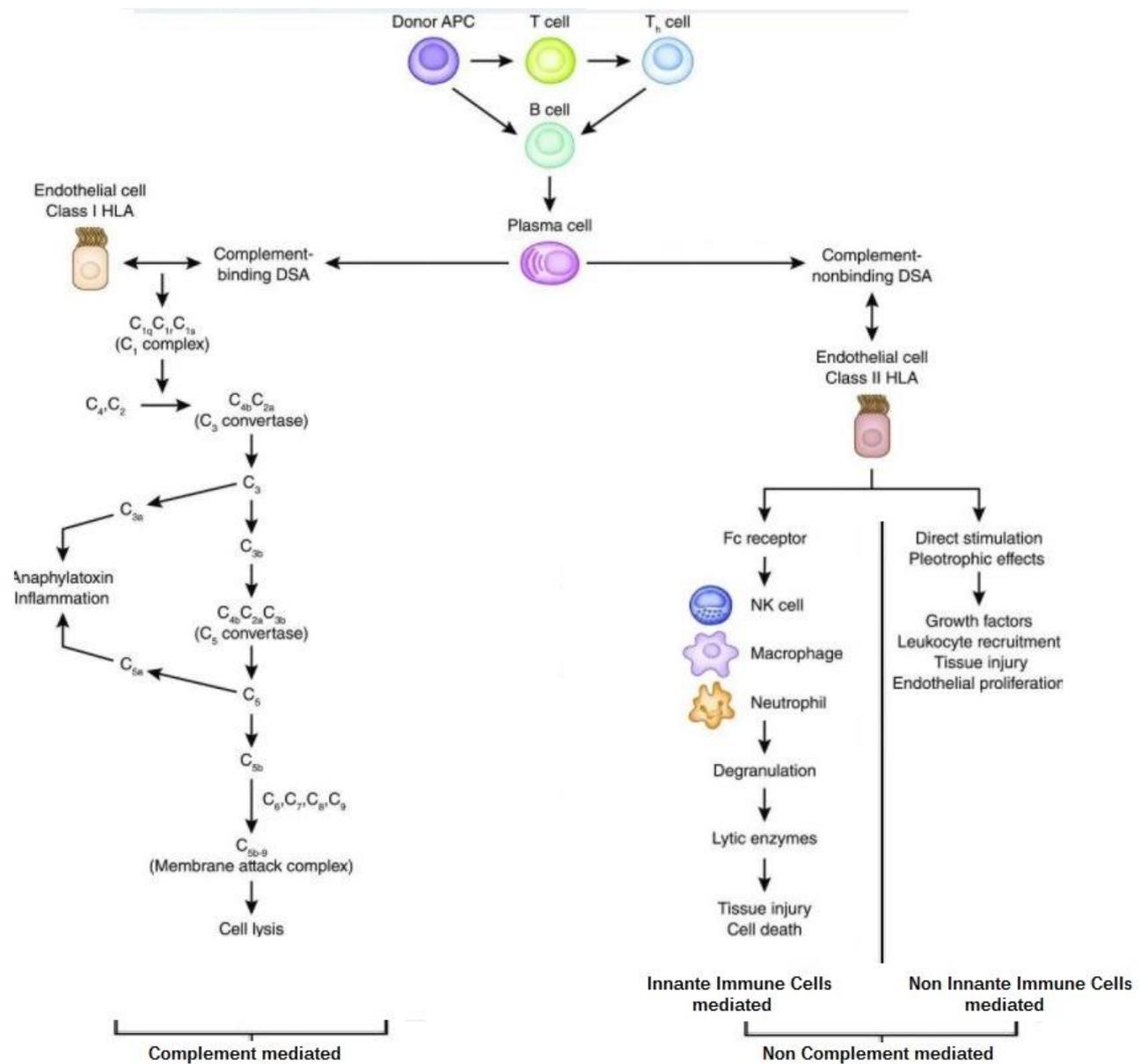


Abbildung 4: Die DSA vermittelte Transplantatabstoßung

Dargestellt sind die drei Wege der Pathogenese der DAS vermittelten Transplantatabstoßung. Linksseitig zeigt sich der über Komplementfaktoren vermittelte Weg. Rechtsseitig ist der nicht-komplementvermittelte Wirkungsweg der DSA mit seinen beiden Endpunkten, der immunzellvermittelten und nicht immunzellvermittelten Zellelimination, dargestellt. (modifiziert nach (Zhang 2018))

3.2.3.3.3 Interaktion von B und T Zellen bei der antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion

Wie bereits erwähnt zeigt sich eine gegenseitige Beeinflussung der Lymphozytenpopulationen. Auch im Zusammenhang mit der Transplantation von soliden Organen konnten diese beobachtet werden. Dabei zeigen sich nicht nur Interaktionen im Sinne einer B-Zelle als APC oder ASC, sondern auch eine Suppression und Immunregulation über Zytokine auf die anti-Spender Alloreaktion der T-Zellen. Damit könnten Subpopulationen der B-Zellen für die Verhinderung einer chronischen antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion, und das Verständnis derer, essentiell sein. (Sawitzki et al. 2020, Shiu et al. 2015, Valujskikh 2015, Rosser et al. 2015, Li 2010)

3.2.4 Ausgewählte Immundiagnostik in der Transplantationsmedizin zur Diagnostik von DSA im Empfänger

3.2.4.1 Luminex

Eine bereits genannte und weltweit häufigste Methode zur Detektion von HLA-Antikörpern stellt der Festphasenassay Luminex dar. Dabei wird zu speziellen Microbeads aus Polystyrol Serum des Empfängers gegeben. Auf diesen Beads befinden sich zum einen ein Mix aus zwei fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome), die mit einem Laser angeregt werden können Licht zu emittieren. Durch die Zusammensetzung der beiden Fluorochrome lassen sich viele verschiedene Beads kodieren. Zum anderen befindet sich auf den Beads jeweils ein HLA-Antigen für HLA der Klasse I (HLA-A, -B, -C) oder der Klasse II (HLA-DR, -DQ, -DP). Binden nun präformierte Immunglobuline der Gruppe G aus dem Serum des Empfängers an besagte Antigene, kann an diese IgG ein sekundärer anti-human Antikörper mit einem dritten Fluorochrom konjugiert werden (Abb. 5). Nun kann durchflusszytometrisch die Zusammensetzung des emittierten Lichts der drei Fluorochrome gemessen und analysiert werden. Dadurch können vorhandene HLA-Antikörper nachgewiesen werden, die anschließend mit dem Spender verglichen werden. Ein solcher Assay vor Transplantation und im weiteren Verlauf könnte die Transplantatabstoßung vorhersagen. Damit könnte eine Indikation zur intensivierten Therapie gestellt werden. Oft erfolgt diese post-operative Überwachung in

Verbindung mit dem Lymphozytentoxizitäts-Assay. (Lachmann et al. 2013, Mehra et al. 2013, Gloor et al. 2010, Gibney et al. 2006)

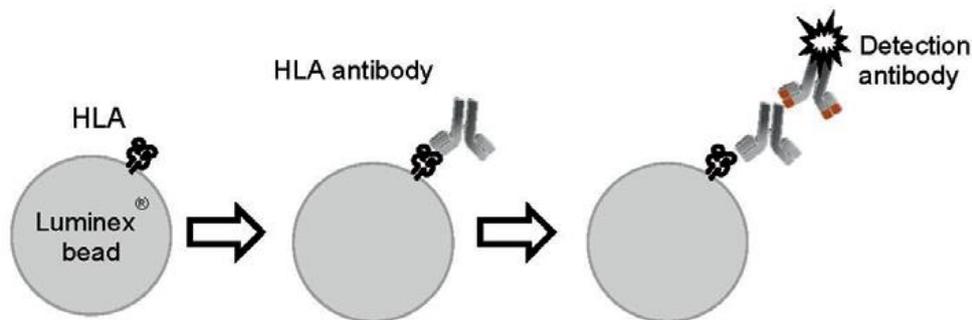


Abbildung 5: Funktionsweise des Luminex Assays

Dargestellt ist ein Luminex Bead mit einem beliebigen rekombinanten HLA-Antigen. Anschließend erfolgt die Bindung eines vorhandenen HLA-Antikörpers und dessen Nachweis mit einem sekundären Antikörper. (modifiziert nach (Lachmann et al. 2013))

3.2.4.2 Crossmatch-Assay

Ein weniger spezifischer, aber schon länger etablierter zellulärer Test auf HLA-spezifische, komplementaktivierende Antikörper im Serum des Empfängers stellt der komplementabhängige Lymphozytentoxizitäts-Assay dar. Bei präformierten DSA erfolgt eine Bindung an Spender-Lymphozyten. Deshalb werden isolierte Lymphozyten des Spenders auf einer Nachweisplatte mit Empfängerserum und zugesetztem Komplement vermischt. Durch die DSA Bindung und die folgende Komplementaktivierung kommt es zur Zellyse. Nach Zugabe eines Farbstoffs können diese toten Zellen nun angefärbt und ausgewertet werden. Durch diese Methode können jedoch nur komplementaktivierende DSA im Empfänger nachgewiesen werden, für eine initiale Risikobewertung ist die Aussagekraft dieses Assays jedoch gegeben. (Kauke 2017, Pena et al. 2013, Ellis et al. 2012)

3.2.4.3 HLA-Antikörper ELISA

Eine weitere Methode zur Identifizierung von DSA im Serum stellt der ELISA dar. Dabei wird das Serum des Empfängers auf eine Nachweisplatte gegeben. Darauf gebunden sind HLA-Klasse 1 und - Klasse 2 Antigene. Daran können nun die HLA-spezifischen Antikörper binden und über einen sekundären Antikörper mit Hilfe eines Farbstoffes nachgewiesen werden. Es wird anschließend die Absorption gemessen und anhand einer Standardkurve der Cut-Off an HLA-spezifischen Antikörpern berechnet. Limitierend zeigt sich hier eine geringe Sensitivität und Spezifität. Zusätzlich kann nur eine Aussage über die Anwesenheit, aber nicht die Konzentration an DSA getroffen werden. (Mehra et al. 2013, Monien et al. 2006)

3.2.4.4 HLA-spezifischer ELISpot

Die vorangegangenen Methoden beschränken sich jeweils auf den Nachweis von DSA im Serum des Empfängers. Jedoch kann es, wie bereits beschrieben, über die Differenzierung von memory B-Zellen zu einer vorher nicht messbaren DSA Produktion kommen. Auch kann es durch Bindung der DSA im Transplantat zu einem falsch negativen Ergebnis kommen. Deshalb werden beim HLA-spezifischen ELISpot isolierte Lymphozyten zunächst stimuliert. Dabei sollen sich alle vorhandenen memory B-Zellen zu ASC differenzieren. Anschließend werden die vorstimulierten Zellen auf eine mit HLA-Monomeren beschichtete Platte gegeben. ASC können nun über ihren BCR an diese binden und als Spots mit Anti-human IgG nachgewiesen werden. Über die daraus gemessene Absorption und Spotanzahl können Rückschlüsse auf die Frequenz an donorspezifischen memory B-Zellen im Empfänger geschlossen werden. Es ist jedoch zu beachten, dass bei diesem Assay nur HLA-spezifische Antikörper detektiert werden können. (Heidt et al. 2012b)

3.2.5 Immunsuppressive Therapie

Dadurch, dass das Immunsystem darauf ausgelegt ist, körperfremdes Material zu erkennen und effektiv zu eliminieren, mussten Möglichkeiten gefunden werden diese Immunantwort zu supprimieren oder zu modulieren. Dies wird in der modernen Transplantationsmedizin durch eine medikamentöse Therapie erreicht, in der verschiedene Stoffklassen kombiniert werden, um toxische Nebenwirkungen bei entsprechender Wirkung möglichst gering zu halten (Tab. 1). Allgemein zeigen sich bei Patienten nach Nierentransplantationen deutlich erhöhte Hospitalisierungsraten aufgrund urologischer, kardiovaskulärer, infektiöser und pulmologischer Erkrankungen. Eine der häufigsten stellt dabei die Infektion mit dem Influenzavirus dar. Jedoch zeigt jede der folgenden Stoffklassen spezifische unerwünschte andere Wirkungen (UAW). (Lam et al. 2020, Chong et al. 2015, Jiang et al. 2013, Duncan et al. 2005)

Die Therapie direkt nach Transplantation wird zunächst eine Induktionstherapie eingeleitet, die anschließend durch eine langfristige Erhaltungstherapie abgelöst wird. Bei Hinweisen auf eine Abstoßung des Allografts kann diese intensiviert werden. In der Induktionstherapie wird zunächst die T-Zell Immunantwort über den monoklonalen Anti-CD25 Antikörper Basiliximab supprimiert. Es stehen weitere monoklonale Antikörper zur Verfügung, um bestimmte Zellpopulationen gezielt behandeln zu können. Bei einem zusätzlichen Risiko kann der polyklonale Anti-T-Lymphozyten Antikörper Thymoglobulin gegeben werden. Polyklonale Antikörper zeigen als UAW neben der Infektanfälligkeit ein häufigeres Auftreten einer Leukopenie oder Thrombozytopenie. (Suwelack et al. 2018, Enderby 2015, Muntean et al. 2013)

Wirkstoffgruppe	Beispiel	Wirkweise	Therapiestufe
IMPDH-Inhibitoren	Mycophenolsäure, Mycophenolat-Mofetil	Hemmung der Proliferation der Leukozyten	Induktionstherapie Erhaltungstherapie
mTor-Inhibitoren	Everolimus, Sirolimus	Hemmung der Zytokinese	Induktionstherapie Erhaltungstherapie
T-Zell Costimulations Inhibitoren	Belatacept	Hemmung der Kostimulation von T- Lymphozyten	Erhaltungstherapie
Purinanaloga	Azathioprin	Inhibition der DNA-Synthese	Erhaltungstherapie
CNI-Inhibitoren	Tacrolimus, Cyclosporin A	Inhibition der Genexpression	Induktionstherapie Erhaltungstherapie Rejektionstherapie
Steroide	Methylprednisolon	Unspezifische Hemmung von Zytokinen in T-Lymphozyten und APC	Induktionstherapie Erhaltungstherapie Rejektionstherapie
T-Lymphozyten Antikörper	Basiliximab, Thymoglobulin	Depletion von T-Lymphozyten	Induktionstherapie Rejektionstherapie
Spezifische Antikörper	Rituximab, Eculizumab, Tocilizumab, Bortetomib	Depletion spezifischer Leukozytenpopulationen	Rejektionstherapie

Tabelle 1: Überblick über in der Praxis verwendete Immunsuppressiva

Dargestellt sind ausgewählte Wirkstoffe mit Wirkstoffgruppe, Beispiele für Wirkstoffe, Wirkweise und die Therapiestufe, in der die Immunsuppressiva zum Einsatz kommen. Die Therapiestufen und primär verwendeten Medikamente unterscheiden sich in den Transplantationszentren und werden an die Studienlage angepasst. Die Herangehensweisen sind jedoch ähnlich.

In der Erhaltungstherapie werden verschiedene weitere Stoffklassen wie Calcineurin-Inhibitoren (CNI), Steroide, Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH)-Inhibitoren, mTor-Inhibitoren oder T-Zell Costimulations-Inhibitoren genutzt. Diese werden zunächst in Kombination gegeben, um im Verlauf eine Reduktion vorzunehmen. (Suwelack et al. 2018)

CNI wie Tacrolimus oder Cyclosporin A, wirken über eine Inhibition der Expression verschiedener Gene, auf denen Zytokine zur T-Zell Aktivierung kodiert sind. Als UAW zeigen sich, zusätzlich zu den allgemeinen UAWs, eine ausgeprägte Nephro-, Neuro- und Hepatotoxizität. Auch ist das Risiko für einen Diabetes mellitus, arteriellen Hypertonus und maligne Erkrankungen erhöht. Kosmetisch störend können eine Hypertrichose, Gingivahyperplasie oder Gynäkomastie auftreten. (Suwelack et al. 2018, Enderby 2015, Muntean et al. 2013)

Steroide wirken unspezifisch über die Hemmung verschiedener immunologisch relevanter Zytokine. Sie werden in der Medizin vor allem wegen ihrer entzündungshemmenden und immunsuppressiven Eigenschaften genutzt. Es zeigen sich jedoch einige UAWs wie erhöhte Infektneigung, Hyperglykämien, Hypertonus, Hyperlipidämie, erhöhtes Risiko für gastrointestinale Ulzera, Osteoporose oder psychische Erkrankungen. Auch zeigen sich bei langfristiger hochdosierter Gabe Störungen des endokrinen Systems. (Suwelack et al. 2018, Ramamoorthy et al. 2016, Enderby 2015, Duncan et al. 2005)

Als IMPDH-Inhibitor wirkt Mycphenolsäure oder ihr Prodrug Mycophenolat-Mofetil. Durch die Inhibition der Ionosinmonophosphat-Dehydrogenase und damit der Bildung des Purins Guanosin, wird die Proliferation von T- und B-Zellen gehemmt. Als UAWs sind vor allem gastrointestinale Komplikationen, aber auch Leukopenie, Thrombozytopenie oder Anämie zu nennen. (Enderby 2015, Bunnapradist et al. 2008)

Durch mTOR Inhibitoren wie Everolimus und Sirolimus wird Zellteilung von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen beeinflusst. Neben einer erhöhten Infektanfälligkeit und möglicher Tubulotoxizität, zeigt sich bei der Therapie ein erhöhtes Auftreten von malignen Erkrankungen. Auch kommt es unter Therapie vermehrt zu Wundheilungsstörungen, oralen Ulzerationen oder Lymphozelenbildung. (Enderby 2015, Muntean et al. 2013)

Belatacept wirkt als Co-Stimulationsinhibitor über die Bindung and CD80 und CD86 auf APC. Dadurch bleibt eine Kostimulation von T-Zellen aus. Es kann im Verlauf der Therapie zu peripheren Ödemen, Hypertonus, Hyper-/Hypokaliämie, gastrointestinalen oder neurologischen Nebenwirkungen kommen. (Enderby 2015, Wojciechowski et al. 2012)

Als weiteres Immunsuppressivum kann Azathioprin genutzt werden. Dieses wirkt als Purinanalogon inhibierend auf die DNA-Synthese und somit auf die Proliferation von Lymphozyten. Als Nebenwirkung zeigt sich folglich ein ähnliches Profil wie bei den IMPDH-Inhibitoren. (Maltzman et al. 2003)

Aufgrund der vielfältigen Wirkweisen und Nebenwirkung ist für jeden Patienten eine personalisierte Therapie erforderlich. Auch werden spezifischere oder alternative Möglichkeiten der Immuntherapie erforscht und entwickelt. Auch wird die Möglichkeit einer Immuntoleranz erforscht. (Sawitzki et al. 2020, Benvenuto et al. 2018, Enderby 2015)

3.3 Zielsetzung

Zusammenfassend zeigt sich also, dass die erfolgreiche Therapie einer terminalen Niereninsuffizienz durch die Transplantation eines soliden Organs nach dem operativen Eingriff vielfache immunologische Prozesse in Gang setzt. Obwohl die medikamentöse Therapie teilweise sehr spezifisch auf diese Vorgänge einwirken kann, gibt es immer wieder neue Erkenntnisse welche Zellentität für bestimmte Abstoßungsreaktionen auslösend ist. Ebenso wäre es aufgrund der unerwünschten Nebenwirkungen im Interesse des Patienten, prätransplantatorisch kritische Konstellationen für eine zukünftige Abstoßungsreaktion noch besser identifizieren und folglich gezielter therapieren zu können.

In der Antikörper-Diagnostik werden derzeit nur spezifische Antikörper und deren ASC identifiziert. Durch die Vielzahl der Antigene im Transplantat können jedoch nicht alle Antikörper abgedeckt werden. Deshalb sollen in einem Spender-spezifischen total-IgG ELISpot präformierte oder im Verlauf neu gebildete spenderreaktive memory B-Lymphozyten nachgewiesen und anschließend mit dem klinischen Outcome der Transplantationspatienten verglichen werden. Somit könnte eine Konstellation identifiziert werden, die auf eine drohende Abstoßungsreaktion hinweist.

Zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge soll ebenfalls eine durchflusszytometrische Immunophänotypisierung im Setting der Organtransplantation durchgeführt werden. Dazu werden zunächst die PBMC (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) geimpfter Probanden nach Stimulation mit dem Hepatitis-B Surface-Antigen (HBs-Ag) untersucht. Dieses Modell soll Antigen-spezifische memory B-Lymphozyten stimulieren und zelluläre Interaktionen nachweisbar machen.

Neben der reinen direkten und indirekten Aktivierung von B-Gedächtniszellen bei Antigenexposition wollen wir untersuchen, welchen Effekt diese Subpopulation auf weitere Lymphozytenpopulationen und deren Immunreaktion hat. Es soll die Hypothese überprüft werden, dass memory B-Lymphozyten sich nicht nur zu ASC differenzieren, sondern auch Einfluss auf T-Lymphozyten und andere B-Zell Subpopulationen ausüben.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Laborausstattung FACS und ELISA

Beschreibung	Gerätebezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge	Rotina 48 R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge	Zentrifuge 5430	Eppendorf
Kühlschrank	Labo	Liebherr
Kühlschrank	ProfiLine	Liebherr
Gefrierschrank -20 °C	Premium	Liebherr
Gefrierschrank -20 °C	Arctis 132	AEG
Accujet	accu-jet pro	Eppendorf
Pipetten 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Reference 2	Eppendorf
Pipetten 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Research plus	Eppendorf
Pipetten 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Typ unbekannt	Brandt
Multistepper	Multipette plus	Eppendorf
Vortex	VX 100	Labnet
Vortex	K-550-GE	Bender & Hobein AG
Durchflusszytometer	Fortessa	BD
Inkubator CO ₂	Modell C 170	Binder
Mikrozentrifuge	Mastercycler Gradient	Eppendorf
Feinwaage	FX-40	AND Electronic Balance
Warmwasserbad	WNB basic	Memmert
Autoklav	Unisteri	MMM Group
Einfrierhilfe	Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Thermo Scientific
Magnetseparator für LD Säule	MidiMACS	Miltenyi Biotec
Magnetseparator für MS Säule	MiniMACS	Miltenyi Biotec

Tabelle 2: Laborausstattung für FACS und ELISA

4.1.2 Laborausstattung ELISpot

Beschreibung	Gerätebezeichnung	Hersteller
ELISpot Reader Alfa	ImmunoSpot S6 ALFA	Cellular Technology Ltd.
Pipetten 0.1-10 µl, 2-20 µl, 50-200 µl	Pipetman P	Gilson
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf reference	Eppendorf
Accujet ELISpot	Accu-jet pro	Brandt
Pipette 8-Kanal 30-300 µl	Sartorius 8-Kanalpipette	Fisher Scientific
Spritzflasche 250 ml	Spritzflasche PE-LD 250 ml	behr Labor-Technik
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf
Sicherheitswerkbank	Herasafe KS	Thermo Scientific

Beschreibung	Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heracell VIOS 160i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific
Vortex ELISpot	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Mikroskop	Lichtmikroskop	Olympus
Stickstofftank	Arpege 170	Air Liquide
Bestrahlungsgerät	rs225	Xstrahl Medical & Life Sciences

Tabelle 3: Laborausstattung ELISpot

4.1.3 Lösungen und Flüssigkeiten

Name/Bestandteile	Hersteller	Katalognummer
DPBS	PAN Biotech	P04-36500
PBS	Sigma-Aldrich	TMS-012-A
RPMI 1640	Gibco	21875-034
RPMI 1640	Lonza Biowhittaker	BE12-702F
RPMI 1640	Merck Millipore	SLM-140-B
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich	F7524
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	S 0115
Fetales Rinderserum (FBS)	PAN-Biotech	P40-49500
Penicillin/Streptomycin 5.000U/5mg	Sigma-Aldrich	P4458
Penicillin/Streptomycin 5.000U/5mg	Thermo Scientific	15070063
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma	E6511
HEPES Puffer (1M) 50x	Merck-Millipore	L1613-BC
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomol	01400.1
L-Glutamine Solution	Sigma	G7513
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare	GE17-1440-02
Trypan Blue Stain 0.4%	Gibco	15250061
Permeabilization Buffer 10x	eBioscience	00-8333-56
IC Fixation Buffer	eBioscience	00-8222-49
FACSClean	BD	340345
FACSRinse	BD	340346
Millipore	Abteilung Anästhesie	-
Aqua dest	Braun	0082479E
Ibidi Freezing Medium Classic	Ibidi	80022
Ethanol absolut	Fisher Chemical	10542382
Gigasept	Schülke	10629
Medium FACS		
RPMI 1640	s.o.	
10% FCS	s.o.	
1% Pen/Strep	s.o.	
FACS-Puffer		
DPBS 1l	s.o.	
Natriumacid (10%) 2 ml	Morphisto	1.355.300.100
BSA 5g	s.o.	
MACS-Puffer		

Name/Bestandteile	Hersteller	Katalognummer
DPBS 500 ml	s.o.	
EDTA (2mM) 292,25 mg	s.o.	
BSA (0.5%) 2,5 g	s.o.	
L-Glutamine	s.o.	
HEPES-Puffer	s.o.	
Medium ELISpot		
RPMI 1640 500 ml	Merck Millipore	
HEPES-Puffer (1M)	s.o.	
FBS 50 ml	s.o.	
Pen/Strep 5 ml	s.o.	
L-Glutamine	s.o.	

Table 4: Solutions and Liquids

4.1.4 Reaction Vessels and Consumables

Beschreibung	Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäß 0.5, 1.5, 2.0 ml	Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Stripette 2, 5, 10, 25, 50 ml	Corning Costar Stripette	Sigma
6-Well Platte	Nunc Delta Surface	Thermo Scientific
FACS-Röhrchen	12x75mm, 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Falcon
Multistepaufsatz 100 µl	Combitips plus 5 ml	Eppendorf
Multistepaufsatz 1 ml	Combitips plus 50 ml	Eppendorf
Vakuumfiltrationsflaschen 500 ml	rapid-Filtermax	TPP Techno Plastic Products AG
Falcon 15 ml	Zentrifugenröhrchen 15ml konisch	TPP Techno Plastic Products AG
Falcon 50 ml	Falcon konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Fisher Scientific
FACS-Racks versch. Größen	n.a.	n.a.
Falcon-Rack versch. Größen	n.a.	n.a.
Laborhandschuhe	Eco Nitrile PF 250 M/L	SHIELD Scientific
ELISpot Zellsieb	MACS Filter Smart Strainers 30µm	Miltenyi Biotech
Falcon 15 ml	Sarstedt Schraubröhre mit Spitzboden	Sarstedt
Falcon 50 ml	Cellstar Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One
Gefriervials	CryoTube Vials	Thermo Scientific
Safe-Lock Tube 1.5 ml	Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Pipettenspitze 0.1-10 µl	Filterspitzen steril 0.1-10 µl	Brand
Pipettenspitze 2-20, 2-200, 100-1000 µl	Filterspitze steril	Sarstedt
Stripette 5, 10, 25 ml	Corning Costar	Sigma
Neubauer Zählkammer	C-Chip Neubauer Improved	NanoEnTek
Petrischale	Petrischale 92x16mm ohne Nock	Sarstedt
6-Well Platte	6 Well Platte, unbehandelt, transparent	CytoOne
24-Well Platte	24 Well Platte, transparent	Greiner Bio-One
Parafilm	Parafilm M	Parafilm
Einmal-Skalpell	Surgical Disposable Scalpel	Braun
Einmal-Pinzette	Pinzette nach Semken	Fuhrmann

Table 5: Reaction Vessels and Consumables

4.1.5 ELISpot

Name/Bestandteile	Hersteller	Katalognummer
TMB substrate for ELISpot	Mabtech	3651-10
Human IgG ELISpot BASIC	Mabtech	3850- 2H
Monoclonal antibodies MT91/146, Conc.: 0.5mg/ml	Mabtech	-
Biotinylated monoclonal antibodies MT78/145, Conc.: 0.5 mg/ml	Mabtech	-
Straptavidin-Horseradish Peroxidase	Mabtech	-

Tabelle 6: Materialien des ELISpot

4.1.6 FACS-Antikörper und Farbstoffe

Bezeichnung	Fluoro- chrom	Hersteller	Produk- t-Nr.	Klon	Größe/ Tests	Isotyp
IFN- γ , PE	PE	BD Pharmingen	554552	4S.B3	0.1mg	mouse IgG, k
CD38, PE-Cy5	PE-Cy5	BD Pharmingen	555461	HIT2	100	mouse IgG, k
IgG, FITC	FITC	BD Pharmingen	555786	G18-145	100	mouse IgG, k
CD45, APC-Cy7	APC-Cy7	BD Pharmingen	557833	2D1	100	mouse IgG, k
HLA-DR, PerCP Cy5.5	PerCP Cy5.5	BD Pharmingen	560652	L243	50	mouse IgG, k
IgM, BV510	BV510	BD Horizon	563113	G20-127	50	mouse IgG, k
CD20, BV711	BV711	BD Horizon	563126	2H7	50	mouse IgG, k
CD3, BV605	BV605	BD Horizon	563217	SK7	25	mouse IgG, k
CD27, BV650	BV650	BD Horizon	563228	L128	100	mouse IgG, k
CD40, BV421	BV421	BD Horizon	563396	5C3	50	mouse IgG, k
IgD, BUV395	BUV395	BD Horizon	563813	IA6-2	50	mouse IgG, k
CD8, BV786	BV786	BD Horizon	563823	RPA-T8	100	mouse IgG, k
CD19, BUV496	BUV496	BD Horizon	564655	SJ25C1	100	mouse IgG, k
CD4, PE-Cy7	PE-Cy7	BD Pharmingen	564997	SK3	100	mouse IgG, k
FVS, AF700	AF700	BD	557852		100 μ g	

Tabelle 7: FACS-Antikörper und Farbstoffe

4.1.7 Stimulationsreagenzien und FACS-Kompensationsbeads

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer	Bestandteile
Golgistop	BD Biosciences	554724	Protein Transport Inhibitor Monensin
Leucocyte Activation	BD Biosciences	550583	phorbol ester, PMA (Phorbol 12-Myristate

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer	Bestandteile
Cocktail, with BD GolgiPlug			13-Acetate), a calcium ionophore (Ionomycin) and the protein transport inhibitor BD GolgiPlug™ (Brefeldin A)
R848	Mabtech	3611-5x	Polyclonal activator: R848, Conc.: 1 mg/ml
Interleukin-2	Mabtech	-	Lyophilisiertes, rekombinantes humanes Interleukin-2
Engerix-B Erwachsene	GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG	PZN 07504643	Hepatitis-B-Oberflächenantigen 20 µg (Adsorbiert an hydratisiertes Aluminiumhydroxid Gesamt: 0,50 Milligramm Al ³⁺ , Hergestellt in Hefezellen (Saccharomyces cerevisiae) durch rekombinante DNATEchnologie), Natriumchlorid, Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat, 0,5 mg (0,25 mg) Aluminiumhydroxid, Natriumdihydrogenphosphat, Wasser für Injektionszwecke
BD CompBeads Anti-Mouse Ig k /Negative Control Compensation Particles Set	BD Biosciences	552843	Anti-Mouse Ig k Compensation Particles and Negative Control Compensation Particles
Adjuvansfreies Hepatitis-B Surface Antigen	Institut für Virologie Fakultät für Medizin Technische Universität München		HBs-Antigen

Tabelle 8: Stimulationsreagenzien und FACS-Beads

4.1.8 MACS

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer	Bestandteile
Memory B Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec	130-093-609	2 mL B Cell Biotin-Antibody Cocktail, human: Cocktail of biotin-conjugated monoclonal antibodies against CD2, CD14, CD16, CD36, CD43, and CD235a (Glycophorin A). 2x2 mL Anti-Biotin MicroBeads: MicroBeads conjugated to monoclonal

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer	Bestandteile
			anti-biotin antibodies (isotype: mouse IgG1). 2 mL CD27 MicroBeads, human: MicroBeads conjugated to monoclonal anti-human CD27 antibodies (isotype: mouse IgG1).
LD Columns	Miltenyi Biotec	130-042-901	LD MACS Säule
MS Columns	Miltenyi Biotec	130-042-201	MS MACS Säule

Tabelle 9: Materialien des MACS

4.1.9 Software

Bezeichnung	Hersteller
MS Office Paket Professional Plus 2016	Microsoft Corporation
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc.
FACSDiva V8.0.1	BD Biosciences
Endnote	
ELISpot- Reader Software ImmunoSpot. SC Suite Immuno Capture 6.5.5.	Cellular Technology Ltd.

Tabelle 10: Software

4.2 Methoden

4.2.1 Ethikantrag

Unter dem Ethikantrag mit der Nummer 425-16 wurde die Patientenstudie und die FACS-Experimente mit den PBMC gesunder und freiwilliger Probanden durch die Ethikkommission der LMU München genehmigt. Für die prospektiv und beobachtend angelegte Studie zur „Etablierung und Validierung eines Spender-spezifischen B-Zell ELISpot-Assays zum Immunmonitoring nach Nierentransplantation“ wurden insgesamt 12 Patienten eingeschlossen, die zwischen 04/2016 und 06/2017 im Klinikum Großhadern in München eine Nierentransplantation erhielten. Für die Etablierung des FACS-Panels, die Antigen-spezifischen Stimulationen und die Isolationsuntersuchungen der memory B-Lymphozyten wurden 14 gesunde und freiwillige Probanden eingeschlossen.

4.2.2 Präparation der Zellen

4.2.2.1 Präparation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation

Da unsere Untersuchungen mehrtägige Inkubationsschritte vorsehen, wurde eine Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nach laborinterner SOP an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz durchgeführt.

Durch die Dichtegradientenzentrifugation wird eine Auftrennung des Blutes über ein TrennungsmEDIUM in bestimmte Zellkompartimente erreicht. (Gressner et al. 2019)

Das Blut freiwilliger Spender wurde direkt nach der venösen Abnahme in 8 ml CPDA-Monovetten im Verhältnis 1:1 mit sterilem DPBS gemischt. Anschließend wurde dieses im Verhältnis 2:1 auf das bereits in einem 50 ml Falcon vorgelegte Biocoll überschichtet. Das als TrennungsmEDIUM verwendete Biocoll weist eine Dichte von 1,077 g/ml auf und wegen der deutlich ausgeprägten Zelltoxizität ist hier eine Vermischung zu vermeiden. Nachfolgend erfolgt die Zentrifugation mit 1200xg über 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse.

Humane Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine höhere, Lymphozyten und Monozyten, sowie das Plasma mit darin enthaltenen Thrombozyten eine geringere Dichte als das verwendete Biocoll. Deshalb legt sich die Schicht aus Lymphozyten und Monozyten, im weiteren als PBMC bezeichnet, als weißlicher Ring zwischen dem Plasma und TrennungsmEDIUM, während die schwereren Blutbestandteile am Boden des Falcons als Pellet zu erkennen sind. Da diese Schicht auf dem Biocoll

aufschwimmt und sich bei ruckartigen Bewegungen wieder vermischen würde, sind diese zu vermeiden und auf eine Bremse bei der Zentrifugation zu verzichten.

Der beschriebene Interphase-Ring kann nun, ohne das darüberliegende Plasma, mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Falcon überführt werden. Anschließend erfolgen zwei Waschschriffe, um die PBMC weiter aufzureinigen. Dies erfolgt beim ersten Schritt durch eine Auffüllung des Falcons mit neuem DPBS auf 50ml mit anschließender Zentrifugation mit 500xg über 5min bei Raumtemperatur mit Bremse. Der Überstand wird vorsichtig abgossen, das die PBMC enthaltende Zellpellet aufgelockert und für den zweiten Waschschriff in 25ml DPBS resuspendiert. Anschließend erfolgt auch hier die Zentrifugation, Abnahme des Überstands, Auflockerung des Zellpellets und die Resuspension in 1 ml DPBS.

4.2.2.2 Präparation mononukleärer Zellen aus Spendermilzen

Um antigenpräsentierende Immunzellen des Spenders zu erhalten, wurden mononukleäre Zellen aus Milzproben isoliert. Die in unseren Untersuchungen eingesetzten Zellen waren nicht benötigte Zellen aus dem klinisch indizierten, präoperativen Crossmatch. Die Isolation erfolgte nach laborinterner SOP an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz.

Zunächst wurden die Milzproben in eine Petrischale mit 20 ml RPMI-Medium (10% FCS, 1% HEPES-Puffer, 1% Pen/Strep, 1% L-Glut) gegeben. In dieser wurde anschließend die Milzkapsel mit Hilfe einer anatomischen Pinzette und eines Skalpells eingeritzt, ohne das Parenchym tiefergehend zu penetrieren. Dadurch ließen sich die Immunzellen der Milz (Milz-PBMC) unter Schwenken herauslösen. Dies war an einer Eintrübung des Kulturmediums zu erkennen. Anschließend wurde die Milz verworfen und die Zellsuspension aus der Petrischale auf einen Filter mit einer Porengröße von 30 µm gegeben, um zurückgebliebene Parenchym- oder Kapselreste herauszufiltern. Die Petrischale wurde nochmals mit 20 ml Kulturmedium gespült, um zurückgebliebene Zellen zu mobilisieren und die zweite Zellsuspension ebenfalls auf den Filter gegeben. Das Filtrat wurde in einem 50 ml Falcon aufgefangen und konnte anschließend im Verhältnis 2:1 auf das bereits in einem 50 ml Falcon vorgelegte Ficoll-Paque überschichtet werden. Das in diesem Labor verwendete Ficoll-Paque besitzt die gleichen Eigenschaften wie Biocoll und wurde ebenfalls für die Dichtegradientenzentrifugation genutzt. Diese wurde anschließend wie bei der Isolation von PBMC aus peripherem Blut durchgeführt.

4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden aus der Zellsuspension 10 µl entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, der zur Vitalitätsfärbung von Zellen eingesetzt werden kann. Da bei toten Zellen die Zellmembran für verschiedene Stoffe permeabel wird, kann sich der Farbstoff im Inneren anreichern. Deshalb erscheinen tote Zellen unter dem Lichtmikroskop blau und lebende Zellen transparent vor dem bläulichen Hintergrund. (Strober 2015)

Anschließend wurden 10 µl des Farbstoff-Zell-Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer übertragen. Diese quadratische Zählkammer ist in neun Großquadrate unterteilt, deren vier Eckquadrate jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zwei, sich jeweils gegenüberliegende Großquadrate ausgezählt und die Zellkonzentration mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Aufgrund der Zelltoxizität des Farbstoffs muss eine direkte Auszählung erfolgen, um keine falsch niedrige Vitalität der Zellen zu zählen.

4.2.2.4 Kryokonservierung

Um gegebenenfalls weiter Untersuchungen an den isolierten PBMC und Milzimmunzellen vornehmen zu können, wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryokonserviert. Da Zellen in normalem Kulturmedium unter diesen Bedingungen durch Kristallbildung aller Flüssigkeiten zugrunde gehen würden, wurde Ividi Freezing Medium zugesetzt. Dieses enthält BSA und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Jedoch war bei der Verwendung darauf zu achten, zügig zu arbeiten, da DMSO unter Raumtemperatur zytotoxisch wirkt. Die Kryokonservierung erfolgte nach laborinterner SOP an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz.

Zunächst wurde 1 ml Freezing Medium in kälteresistente und beschriftete Kryo- Röhrcchen vorgelegt und anschließend 1 ml Zellsuspension zugegeben. Dabei wurde auf eine maximale Zellzahl von 10×10^6 Zellen geachtet. Die Kryo- Röhrcchen wurden anschließend in einem mit Ethanol gefüllten Einfrierhilfe (Mr. Frosty) bei -80 °C eingefroren. Durch diese Einfrierhilfe konnte eine konstant fallende Temperatur

von 1 °C/min gewährleistet werden. Nach 24h erfolgte die Umlagerung in einen Stickstofftank bei -196 °C.

4.2.2.5 Bestrahlung von Milz-PBMC

Die Milz-PBMC des Spenders sollten in unseren Versuchen lediglich als Antigen für die Empfänger PBMC fungieren. Deshalb wurden diese zur Inaktivierung, wie in anderen Arbeiten vorgeschrieben, mit einer Gesamtstrahlungsdosis von 30 Gy bestrahlt. (Carroll et al. 2016, Kim et al. 2007, Nickel et al. 2004, Gebauer et al. 2002)

Die Verteilung der Zellen erfolgte an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz. Zunächst wurde die benötigte Zellzahl nach Isolation in ein 15 ml Falcon gegeben und mit Kulturmedium auf eine Konzentration von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden anschließend bestrahlt. Nach Befüllung des Falcons mit Kulturmedium auf 15 ml erfolgte die Zentrifugation mit 500xg über 5min bei Raumtemperatur mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und erneut gezählt. Nun konnten diese inaktivierten Milz-PBMC zur Stimulation der Empfänger-PBMC eingesetzt werden.

4.2.3 Total-IgG ELISpot

4.2.3.1 Funktionsweise des Spender- bzw. HBs-Antigen-spezifischen total-IgG ELISpots

Das Ziel unseres ELISpot-Assays war es, Spenderantigen-spezifische B-Lymphozyten zu detektieren. Als Kontrolle dieser antigenspezifischen Reaktion wurde ebenfalls ein HBs-Antigen spezifischer ELISpot durchgeführt, da der Impfstatus unserer Organempfänger bekannt war.

Das Prinzip des IgG ELISpots bestand darin, dass Empfänger-PBMC zunächst mit bestrahlten Spender-Milz-PBMC oder HBs-Antigen stimuliert wurden. Dadurch wurden Spender- bzw. HBs-Antigen-spezifische B-Lymphozyten dazu angeregt, als ASC Immunglobuline zu sekretieren. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf das affinitätsgereifte IgG gelegt. Deshalb wurden diese vorstimulierten PBMC auf eine mit anti-human-IgG-Antikörpern beschichtete ELISpot Platte gegeben. Kam nun eine aktivierte ASC auf der Platte zum Liegen, wurde ihr sekretiertes IgG in ihrer Umgebung gebunden. Nachdem die PBMC von der Platte gewaschen worden waren, wurde das gebundene IgG mit einem sekundären biotinylierten anti-human-IgG-Antikörper erneut markiert. An das Biotin des sekundären Antikörpers wurde anschließend das Enzymkonjugat Streptavidin-HRP gebunden. Die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konnte nun mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB)

reagieren. Dieses zeigte nach Kontakt mit einer Peroxidase einen blauen Farbumschlag und färbt damit gebundenes IgG auf der Platte an (Abb. 6). Zeigte sich dabei eine Häufung in Form eines Spots konnte darauf geschlossen werden, dass an dieser Stelle eine aktivierte ASC lag. Alle Schritte bis zur Farbreaktion erfolgten zur Vermeidung einer Kontamination an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz.

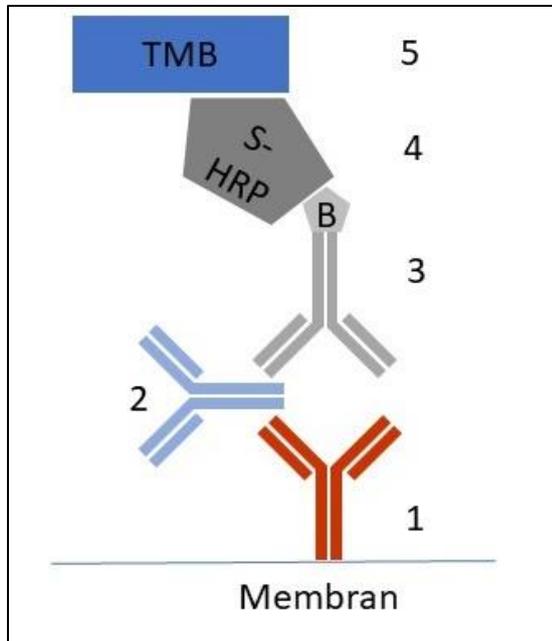


Abbildung 6: Schematische Illustration der Funktionsweise des total-IgG ELISpots

Dargestellt ist die Funktionsweise des total-IgG ELISpots. An die Membran der 96-Well ELISpot-Platte wird der primäre anti-human-IgG Antikörper (1) konjugiert, der wiederum das sezernierte IgG (2) von aktivierten ASC bindet. Anschließend bindet der sekundäre, biotinylierte anti-human-IgG Antikörper (3) daran. An dessen Biotin (B) kann nun das Streptavidin mit dem Enzym HRP (4) binden. Dieses Enzym kann in der Farbnachweisereaktion das Substrat TMB (5) spalten und somit einen Farbumschlag auf der Membran anzeigen.

4.2.3.2 Vorstimulation für den ELISpot-Assay

Die PBMC von Empfängern und die Milz-PBMC der Spender wurden wie beschrieben isoliert. Die Milz-PBMC wurden anschließend wie beschrieben mit 30 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Empfänger-PBMC zunächst in einer Langzeitstimulation über drei Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Es wurde eine Spender-spezifische mit bestrahlten Spender-Milz-PBMC und eine HBs-Antigen-spezifische mit HBs-Antigen angelegt. Zusätzlich erfolgte eine Negativ-Kontrolle mit reinem Kulturmedium, eine Positiv-Kontrolle und eine Negativ-Kontrolle der bestrahlten Spender-Milz-PBMC mit reinem Kulturmedium. Die Inkubation erfolgte in einer 24-Well Platte.

Zunächst wurden gemäß Belegscheema der Vorstimulation (Abb. 7) pro Well 500.000 Empfänger-PBMC vorgelegt. Lediglich in der Negativ-Kontrolle der bestrahlten Spender-Zellen wurden 500.000 Spender-

Milz-PBMC vorgelegt. Diese wurden in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Wells nach dem Belegschema mit den Stimulantien versehen.

	1	2	3	4	5	6
A	E + ∅	E + ∅	E + ∅	¥S + ∅	¥S + ∅	¥S + ∅
B	E + ¥S	E + ¥S	E + ¥S	E + HbsAg	E + HbsAg	E + HbsAg
C	E + ¥S	E + ¥S	E + ¥S			
D	E + R848 + IL2	E + R848 + IL2	E + R848 + IL2			

Abbildung 7: Belegschema der 24-Well Platte zur Vorstimulation

Dargestellt ist das Belegschema der 24-Well Platte zur dreitägigen Vorstimulation der PBMC. E = 500.000 Empfänger-PBMC; ¥S = bestrahlte Spender-Milz-PBMC; HbsAg = Impfstoff Engerix-B in einer HBs-Antigen-Konzentration von 2 µg/ml; R848 = R848 in einer Konzentration von 1 µg/ml; IL2 = Interleukin 2 in einer Konzentration von 10 ng/ml

In der Spender-spezifischen Stimulation wurden 500.000 Spender-Milz-PBMC pro Well zugesetzt. In der HBs Antigen Stimulation wurde der Impfstoff Engerix-B verwendet. Dieser wurde in Konzentrationen von 2 µg/ml eingesetzt.

In der Positiv-Kontrolle wurden die memory B-Zellen unspezifisch über eine polyklonale Stimulation aktiviert. Diese Stimulation mit 10 ng/ml IL-2 und 1 µg/ml R848 in Kulturmedium führte zu einer Differenzierung der memory B-Zellen hin zu ASC wie Plasmablasten und Plasmazellen. (Jahnmatz et al. 2013, Pinna et al. 2009)

4.2.3.3 Durchführung des total-IgG ELISpot-Assay

Der schematische Ablauf ist in der Abbildung 8 visualisiert. An Tag 2 der Vorstimulation wurde mit der Vorbereitung der ELISpot-Platte begonnen. Die Membran der Platte wurde zunächst aktiviert, um anschließend mit Antikörpern beschichtet werden zu können. Dazu wurde in jedes Well der 96-Well Platte mit einer Multikanalpipette 35 µl 35%iger Ethanol gegeben. Anschließend wurde direkt fünfmalig mit Aqua dest gespült. Auf eine ausreichende Füllung jeder Kavität und folgende Entleerung durch Abklopfen auf ein sauberes Tuch war zu achten. Nachdem die Platte ein letztes Mal trocken geklopft worden war, wurde pro Well 100 µl goat anti-human-IgG Antikörper (mAb MT91/145) in einer Konzentration von 15 µg/ml in DPBS (0,5 % FCS) zugegeben. Dieser primäre Antikörper konnte nun über Nacht bei 4 °C im Dunkeln auf die aktivierten ELISpot Membranen binden.

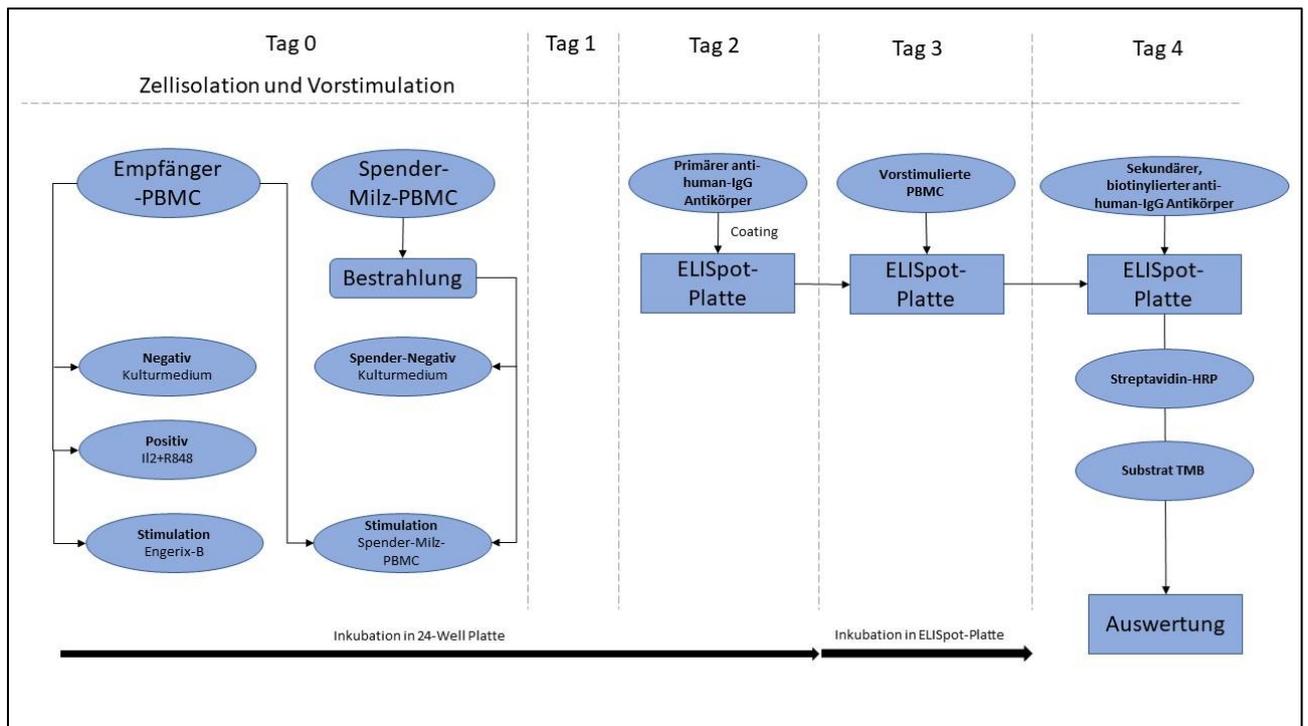


Abbildung 8: Darstellung der Verteilung der PBMC und des zeitlichen Vorgehens im ELISpot

Dargestellt ist die Verteilung der Empfänger-PBMC und der Spender-Milz-PBMC nach Bestrahlung an Tag 0. Jeweils angegeben sind die eingesetzten Stimulantien. Ebenfalls dargestellt ist die Vorbehandlung der ELISpot-Platte mit primärem anti-human-IgG Antikörper, die Zugabe der vorstimulierten PBMC auf die Platte und die anschließende Nachweisreaktion mit sekundärem, biotinyliertem anti-human IgG Antikörper, Streptavidin-HRP und Substrat TMB. Der zeitliche Ablauf ist an den Zeitstrahlen am Unterrand und den Angaben des jeweiligen Tages abzulesen.

An Tag 3 wurde die Vorstimulation der PBMC in den 24-Well Platten beendet. Dabei wurde die Zellsuspension aus der 24-Well Platte in beschriftete 15 ml Falcons überführt und dabei die Wells nochmals mit Kulturmedium gespült um alle Zellen zu übertragen. Diese wurden mit 413xg bei Raumtemperatur über 10 min mit Bremse zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde in 200 µl angewärmten Kulturmedium resuspendiert. Die an Tag 2 vorbereitete 96-Well ELISpot-Platte wurde durch Ausklopfen von überschüssiger Antikörper-Lösung befreit und fünfmalig mit DPBS gespült. Auf eine ausreichende Füllung jeder Kavität und folgende Entleerung war zu achten. In jede Kavität wurde anschließend 200 µl Kulturmedium gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blocken. Nach Inkubation wurde das Kulturmedium entfernt und die Wells nach Belegschemata mit den vorstimulierten Zellsuspensionen besetzt (Abb. 9). Die ELISpot-Platte wurde anschließend über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

	1	2	3
A	E+HbsAg	E+R848+IL2	E+∅
B	E+HbsAg	E+R848+IL2	E+∅
C	E+HbsAg	E+R848+IL2	E+∅
D	E+¥S	E+¥S	¥S+∅
E	E+¥S	E+¥S	¥S+∅
F	E+¥S	E+¥S	¥S+∅
G			
H			

Abbildung 9: Belegscheema der 96-Well ELISpot Platte

Dargestellt ist das Belegscheema der 96-Well ELISpot Platte nach dreitägiger Vorstimulation der PBMC. Entsprechend dieses Schemas erfolgt auch die anschließende Auswertung im ImmunoSpot Reader nach abgeschlossener Farbreaktion. Die Stimulantien in Lösung wurden zuvor entfernt, nur Zellen wurden übertragen. Die Bezeichnungen bleiben zum besseren Verständnis in dieser Abbildung erhalten. E = 500.000 Empfänger-PBMC; ¥S = bestrahlte Spender-Milz-PBMC; HbsAg = Impfstoff Engerix-B in einer HBs-Antigen-Konzentration von 2 µg/ml; R848 = R848 in einer Konzentration von 1 µg/ml; IL2 = Interleukin 2 in einer Konzentration von 10 ng/ml

An Tag 4 wurden die Zellsuspensionen aus der 96-Well ELISpot-Platte entfernt. Anschließend fünfmalig mit DPBS gewaschen. Auf eine ausreichende Füllung jeder Kavität und folgende Entleerung war zu achten. Daraufhin wurde in jede Kavität 100 µl des sekundären, biotinylierten anti-human-IgG Antikörpers (mAb MT 78/145) in einer Konzentration von 1 µg/ml in DPBS (0,5 % FCS) gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-Lösung entfernt und fünfmalig mit DPBS gespült. Nach kompletter Entleerung wurde 100 µl Streptavidin-HRP in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1000 in DPBS (0,5 % FCS) in jede Kavität pipettiert. Daraufhin wurde die ELISpot-Platte erneut eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, die Enzym-Lösung entfernt und fünfmalig mit DPBS gewaschen.

Nun konnte die Farbreaktion gestartet werden. Dieser Arbeitsschritt wurde an einem Workbench-Arbeitsplatz durchgeführt. Da das Farbsubstrat TMB lichtsensibel ist, wurde in abgedunkelter Umgebung gearbeitet und das Substrat zur optimalen Reaktivität mit dem Enzym auf Raumtemperatur

gebracht. Mithilfe einer Multikanalpipette wurde in jede Kavität der ELISpot-Platte, nach vollständiger Entleerung des DPBS, 50 µl des Substrats gegeben. Dadurch startete sofort die Farbreaktion. Sobald diese in Form von blauen Spots zu erkennen war, wurde die Reaktion sofort durch Waschen mit Aqua dest gestoppt. Auch der Unterboden der Membranen wurde ausgiebig gespült. Nachdem die Farbreaktion gestoppt worden war, wurden die ELISpot-Platten bis zur anschließenden Auswertung getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

4.2.3.4 Auswertung

Um die Anzahl an Spots zu bestimmen wurden die ELISpot-Platten in einen ImmunoSpot Alfa Reader von C.T.L. gegeben und mit der Software ausgewertet. In unseren Untersuchungen wurde im Smart Count-Modus gearbeitet. Dabei wurde die Größe der zu detektierenden Spots auf 0,0024 mm² bis 0,0408 mm² festgelegt. Die Variabilität der Größe beruht darauf, dass zwar jeder Spot ein festes dunkles Zentrum besitzt, sich jedoch durch Diffusion der ausgeschütteten Immunglobuline die Größe des helleren Saums deutlich unterscheiden kann. In einer anschließenden Kontrolle konnten detektierte Spots manuell als Artefakte oder falsch positive Spots ausgeschlossen werden.

4.2.4 Direkte Analyse der PBMC Subpopulationen über Fluorescence-Activated Cell Sorting

4.2.4.1 Stimulationsschritte

4.2.4.1.1 Antigen-spezifische Langzeitstimulation

Die PBMC von freiwilligen Spendern wurden wie bereits beschrieben isoliert und ausgezählt. Von jeder Probe wurde zur Langzeitstimulation neben der spezifischen Antigen-Stimulation, eine Negativ-Kontrolle mit reinem Kulturmedium und eine Positiv-Kontrolle angelegt. Die Zellen wurden vor Zugabe der Stimulantien in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium (10% FCS, 1% Pen/Strep) resuspendiert.

In dieser Positiv-Kontrolle wurden die memory B-Zellen unspezifisch über eine polyklonale Stimulation aktiviert. Diese Stimulation mit 10 ng/ml IL-2 und 1 µg/ml R848 in Kulturmedium führte zu einer Differenzierung der memory B-Zellen hin zu ASC wie Plasmablasten und Plasmazellen. (Jahnmatz et al. 2013, Pinna et al. 2009)

In der HBs-Antigen-spezifischen Stimulation wurden adjuvansfreies Hepatitis B surface Antigen in einer Konzentration von 5 µg/ml zu den PBMC in Kulturmedium gegeben. In einem weiteren HBs-Antigen

Stimulationsexperiment wurde der Impfstoff Engerix-B verwendet. Dieser wurde in Konzentrationen von 2 µg/ml und 5 µg/ml eingesetzt. (Bauer et al. 2006)

Für die Langzeitstimulation wurden über vier Tage in einer 6-Well Platte pro Well 2×10^6 Zellen auf 2 ml Kulturmedium eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

4.2.4.1.2 Asservation der Zellkulturmedien und Kurzzeitstimulation für den funktionellen Interferon-γ Assay

Zusätzlich zur Langzeitstimulation wurde im Sinne eines funktionellen Assays eine Kurzzeitstimulation in Kulturmedium über vier Stunden durchgeführt. Davor wurden die Zellsuspensionen aus der 6 Well Platte mit 500xg bei Raumtemperatur über 5min mit Bremse zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde, nach erneuter Reinigung von zellulären Bestandteilen mittels Zentrifugation bei 27000 rpm über 10 min bei Raumtemperatur mit Bremse, für weitere Analysen auf Immunglobuline aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Durch die anschließende Kurzzeitstimulation der PBMC konnte die Interferon-γ-Produktion (IFN-γ) sowohl der T- als auch der B-Zellen ausgewertet werden. Die Probe wurde nach Herstellerangabe mit einer Konzentration von 4 µl BD Golgistop mit dem Wirkstoff Monensin auf 6ml Zellsuspension mit 6×10^6 Zellen inkubiert. Für die Positiv-Kontrolle erfolgte eine Inkubation mit BD Leucocyte Activation Cocktail (LAC) und BD Golgiplug mit dem Wirkstoff Brefeldin A in einer Konzentration von 2 µl auf 1×10^6 Zellen/ml. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ über 4 Stunden.

Golgistop und Golgiplug führten dazu, dass intrazellulär gebildetes IFN-γ akkumuliert und für die FACS-Analyse angefärbt werden kann. Um ausschließen zu können, dass aufgrund einer zellulären Erschöpfung oder einer anderweitigen Zellschädigung keine Zytokinproduktion erfolgen konnte, wurde bei jeder Messung eine Positiv-Kontrolle der IFN-γ Produktion durchgeführt.

Diese führt über die zusätzliche Stimulation mit Leucocyte Activation Cocktail zu einer polyklonalen Stimulation der Zytokinproduktion im rauen endoplasmatischen Retikulum der Leukozyten. (Hou et al. 2018)

Alle Schritte bis zur Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ wurden an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz durchgeführt.

Diese Stimulationsschritte wurden zum besseren Verständnis in Abbildung 10 visualisiert. Um die Differenzierung über den Inkubationszeitraum von vier Tagen auswerten zu können, wurde eine basale FACS-Analyse an Tag 0 durchgeführt. Wurde ebenfalls an Tag 1-3 gemessen, verliefen diese Messungen analog zu Tag 4.

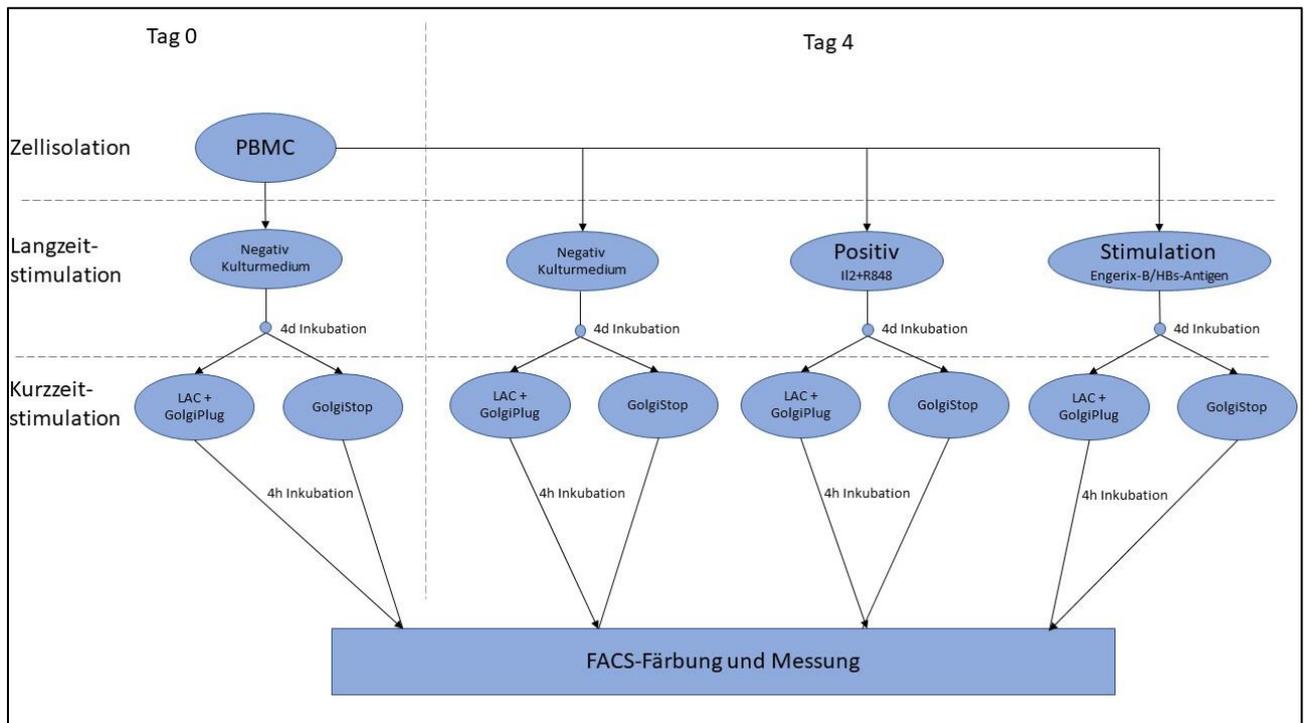


Abbildung 10: Verteilung der PBMC auf die Stimulationen

Darstellung der Verteilung der PBMC in der Langzeit- und Kurzzeitstimulation bei Messungen an Tag 0 und Tag 4. Jeweils angegeben sind die eingesetzten Stimulantien und die Dauer der jeweiligen Inkubation.

4.2.4.1.3 Timeshift

Um den passenden Zeitpunkt für die Endpunktmessung festlegen zu können, erfolgte initial eine Messung der Negativ- und Positiv-Kontrolle an Tag 0,1,2,3 und 4. Auch hier wurde das Medium nach Reinigung zur weiteren Analyse auf Immunglobuline bei -20°C eingefroren.

4.2.4.2 FACS-Analyse

4.2.4.2.1 Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie, dem Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS), können Zellen anhand verschiedener Eigenschaften unterschieden werden. Diese Unterscheidung geschieht durch die Detektion der Streuung oder Absorption bestimmter Laser bei Durchfluss der Zellen durch eine Kapillare im Inneren des Durchflusszytometers. Durch den geringen Durchmesser der Kapillare kann bei entsprechend guter Vorbereitung der Probe eine Vereinzelung der Zellen erreicht werden. Da einige Zellen jedoch auch zu Verklumpung neigen und dies nur durch zusätzliche BD Trucount Tubes

ausgeschlossen werden kann, werden einzelne Messergebnisse als Event bezeichnet. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit die Größe anhand der Vorwärtsstreuung (FSC) und die Granularität anhand der Seitstreuung (SSC) des Lasers zu bestimmen. Damit können schon hier Zellschrott und verklumpte Zellhaufen durch ihre veränderten Grundeigenschaften ausgeschlossen werden (Abb. 11).

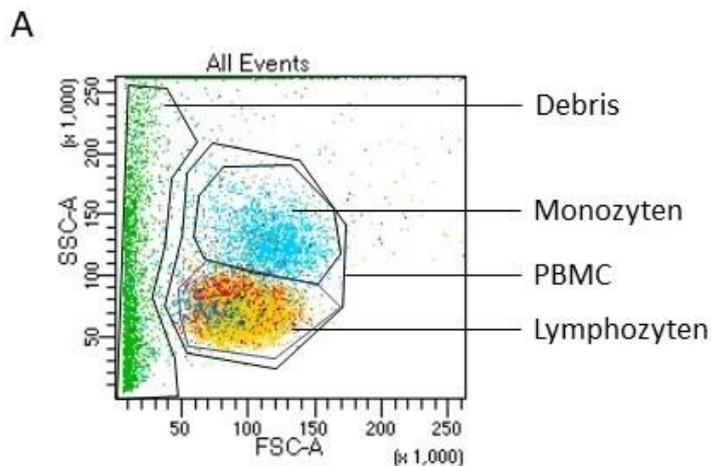


Abbildung 11: PBMC im FACS-Dotplot SSC/FSC mit Markierung von Debris und PBMC

Dargestellt ist ein repräsentativer FACS-Dotplot mit typischen Markierungen für Zellschrott (Debris) und lebenden PBMC. Weiter wurden die PBMC in die beiden abgrenzbaren Subpopulationen „Granulozyten“ und „Lymphozyten und Monozyten“ aufgeteilt. Debris zeigt sich stets als Signale mit geringem FCS bei variablem, bis sehr hohem SSC und kann damit gut identifiziert werden. Die Signalhäufung der PBMC ist für diese Zellentität typisch, ist jedoch bei jeder Messung zu überprüfen.

In der Analyse mit Hilfe des Computerprogramms FACSDIVA werden anschließend die Eigenschaften der einzelnen Events in einem XY-Diagramm gegeneinander aufgetragen. Durch entsprechendes Gating werden anschließend Zellgruppen weiter definiert und können im Anschluss anhand weiterer Eigenschaften differenziert werden.

Namensgebend für das FACS sind jedoch die weiteren Möglichkeiten der Durchflusszytometrie. Dabei werden an Antikörper gebundene Fluorochrome genutzt um Antigene auf der Zellmembran, wie CD 45, oder im Inneren der Zelle, wie IFN- γ , anzufärben. Durch die Laser (Blue, Red, Violet, Yellow-Green und Ultraviolet) werden diese Fluorochrome angeregt und emittieren diese Energie in Form von Licht einer definierten Wellenlänge. Diese kann nun in bestimmten Kanälen detektiert werden und als weitere Eigenschaft des Events gespeichert werden (Abb. 12).

Lasere	Blue		Red		Violet						Yellow-Green			UV	
Photomultipliertube	Blue A	Blue B	Red A	Red B	Vio A	Vio B	Vio C	Vio D	Vio E	Vio F	Ygr A	Ygr C	Ygr E	UV A	UV B
Kanal	PerCP-Cy5,5	FITC	APC-Cy7	AF700	BV786	BV711	BV650	BV605	BV510	BV421	PE-Cy7	PE-Cy5	PE	BUV496	BUV395

Abbildung 12: Aufteilung der Laser auf die Detektierkanäle

Dargestellt sind die jeweiligen anregenden Laser in ihrer Beschreibung durch den Hersteller. Dazu sind die detektierenden Kanäle mit dem übergeordneten Photomultipliertube (PMT) angegeben.

4.2.4.2.2 Etablierung eines neuen Panels

4.2.4.2.2.1 Erstellung des Panels

Mit den stetigen Verbesserungen der Durchflusszytometrie ergaben sich in den letzten Jahren die Möglichkeit kleinere Panels zusammenzufassen und damit bei einzelnen Messungen mehrere Zellpopulationen und auch deren Funktionalität zu untersuchen. Dadurch konnten wir die Vergleichbarkeit der Messergebnisse deutlich verbessern und die Mengen an benötigtem Material und Zellen für verschiedene Stimulationen verringern.

Bei der Erstellung eines Panels wurde zuvor festgelegt, welche Zellpopulationen zu untersuchen seien. Dabei musste darauf geachtet werden, dass gering ausgeprägte Antigene nicht auf demselben Laser wie häufig ausgeprägte Antigene liegen. Dies hätte zu einer Überstrahlung und fehlerhaften Messungen geführt.

Tabelle 11 zeigt die Konstellation an Antikörpern die zur Identifizierung der entsprechenden Zellpopulation angewandt wurde. (Biosciences 2019, Clavarino et al. 2016)

Bezeichnung der Population	Antikörperkonstellation
Leukocytes	45+
T-Cells	45+/3+/19-
T helper Cells	45+/3+/19-/4+/8-
cytotoxic T Cells	45+/3+/19-/4-/8+
B-Cells	45+/3-/19+
Class switched B Cells	45+/3-/19+/20+/38+/IgD-/IgM-
non class switched memory B Cells	45+/3-/19+/20+/38-/27Var/40+/IgGVar/IgD+
Class switched memory B Cells	45+/3-/19+/20+/38-/27Var/40+/IgG+/IgD-/IgM-
Plasmablasts	45+/3-/19+/20-/38+/IgD-/IgM-/27+/HLA-DR+
Plasmacells	45+/3-/19+/20-/38+/IgD-/IgM-/27+/HLA-DR-
IFN- γ produzierende Population	X/IFN- γ +

Tabelle 11: Antikörperkonstellation zur Identifizierung der Populationen

Angegeben sind die Anti-Human Antikörper die genutzt wurden um die Populationen aufzutrennen. „+“ bezeichnet eine positive Färbung mit dem Antikörper. „-“ bezeichnet eine negative Färbung mit dem Antikörper. „Var“ bezeichnet eine variable Färbung, also positiv und negativ auf den Antikörper. „X“ bezeichnet hier, dass die Antikörperkonstellation der beobachteten Population zugrunde gelegt wird, um anschließend die Zytokinproduktion zu bewerten.

Gleichzeitig mussten die FMO (Fluorescence Minus One) festgelegt werden. Dabei wurden im kompletten Panel (Abb. 13) bestimmte Fluorochrome weggelassen um eine bessere Trennung der positiven und negativen Population im Gating zu ermöglichen. Es war jedoch darauf zu achten, dass

innerhalb der FMO aufgrund der Gatinghierarchie Farbkanäle nicht direkt oder indirekt voneinander abhängig waren. Dadurch wäre die falsch angelegte FMO nicht zu verwerten gewesen.

	Blue A	Blue B	Red A	Red B	Vio A	Vio B	Vio C	Vio D	Vio E	Vio F	Ygr A	Ygr C	Ygr E	UV A	UV B
	PerCP-Cy5.5	FITC	APC-Cy7	AF700	BV786	BV711	BV650	BV605	BV510	BV421	PE-Cy7	PE-Cy5	PE	BUV496	BUV395
unstained unstim	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
unstained stim	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
FMO 1 stim	--	IgG	CD45	--	CD8	--	CD27	CD3 *	IgM	CD40	CD4	CD38	IFN-γ *	--	IgD
FMO 2 stim	HLA-DR	--	CD45	FVS	CD8	CD20 *	--	CD3 *	IgM	CD40	CD4	CD38	--	CD19	--
FMO 3 stim	HLA-DR	IgG	CD45	FVS	CD8	CD20 *	CD27	CD3 *	--	CD40	CD4	--	IFN-γ *	CD19	IgD
FMO 4 stim	HLA-DR	IgG	CD45	FVS	CD8	CD20 *	CD27	CD3 *	IgM	--	CD4	CD38	IFN-γ *	CD19	IgD
sample unstim	HLA-DR	IgG	CD45	FVS	CD8	CD20 *	CD27	CD3 *	IgM	CD40	CD4	CD38	IFN-γ *	CD19	IgD
sample stim	HLA-DR	IgG	CD45	FVS	CD8	CD20 *	CD27	CD3 *	IgM	CD40	CD4	CD38	IFN-γ *	CD19	IgD

Abbildung 13: B- und T-Zell Panel mit funktionellem Assay

Dargestellt ist das verwendete B- und T-Zell Panel. Im Sinne des funktionellen Assays ist je Probe (sample) und ungefärbter Kontroll-Probe (unstained), eine mit Golgi-Stop vorbehandelte Probe (unstim) und eine LAC-stimulierte Kontrolle (stim) angelegt. Zur Trennung der Populationen wurden FMOs angelegt. Ebenfalls sind die markierten Antigene mit dem jeweiligen Fluorochrom und dem übergeordneten PMT zu sehen.

4.2.4.2.2 Kompensation

Nach einer grundsätzlichen Erstellung eines Panels nach oben genannten Gesichtspunkten erfolgte anschließend eine erstmalige Kompensation. Diese ist in Bezug auf die Validität von FACS Messergebnissen von essentieller Bedeutung. Durch die häufige Verwendung des Gerätes und bei unterschiedlichen Panels müssen die Spannungen des Photomultipliers (PMT-Voltage) für jeden Kanal und jedes Panel regelmäßig angepasst werden. Diese Einstellungen und zusätzlich herausgerechneten Überlappungen der Wellenlängen werden als Kompensation bezeichnet.

Für jedes im Panel verwendete Fluorochrom wurde ein eigenes Polystyrol Rundboden FACS-Tube beschriftet und mit 100 µl FACS Puffer befüllt (1000 ml DPBS, 2 ml 10% NaN₃ in PBS, 5 g BSA).

In diese wurden BD CompBeads mit dem Isotypen Mouse und Beads zur Negativ-Kontrolle gegeben. Dabei war streng auf die Spezies zu achten, aus der die Antikörper, an die die Fluorochrome gebunden sind, gewonnen wurden. In unserem Panel wurden für das Fluorochrom Alexa Fluor 700 keine Beads, sondern mit dem Fixable Viability Stain (FVS) gefärbte PBMC genutzt. In ein weiteres Tube wurden ungefärbte PBMC gegeben. Anschließend wurde in die beschrifteten Tubes die empfohlene Menge des Herstellers an Antikörper gegeben. Nach Vortexen und Inkubation bei 30 min unter Raumtemperatur im Dunkeln, wurde in jedes Tube weitere 500 µl FACS-Puffer gegeben und durchmischt. Anschließend wurde mit der Kompensation am Gerät begonnen. Dazu wurden im ersten Schritt die ungefärbten Zellen aufgesteckt und die PMT Voltage für SSC und FSC eingestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen im Dotplot gut voneinander abgrenzbar waren. Auch die negativen Beads wurden aufgesteckt um damit die SSC Voltage nochmals so angepasst, dass diese im Dotplot auswählbar waren. Nun konnte auf diese ein Gate P1 gelegt werden, dass auf die weiteren Kompensationskontrollen übertragen wurde. Im zweiten Schritt wurden die Kompensationstube

entsprechend ihrem Fluorochrom aufgesteckt und dahingehend eingestellt, dass der negative Peak im Histogramm unter 10^2 und der positive Peak zwischen 10^3 und 10^5 lag. Waren diese Einstellungen zufriedenstellend, konnte die Kompensation gemessen, berechnet und gespeichert werden.

4.2.4.2.3 Titration

Vor Färbung der PBMC musste die ideale Menge an Antikörper festgelegt werden. Obwohl der Hersteller dazu Angaben bereitstellte, konnten meist geringere Mengen verwendet werden. Dabei war jedoch darauf zu achten, dass zu geringe Mengen überstrahlt werden konnten. Hierbei wurden pro Tube in 100 μ l FACS-Puffer 500.000 PBMC eingesetzt. Pro Antikörper wurden drei verschiedene Konzentrationen eingesetzt. Die zugegebenen Mengen waren 5 μ l, 3 μ l und 1 μ l. Lediglich bei Anti-IgG und Anti-CD 38 wurden 20 μ l, 10 μ l und 5 μ l eingesetzt.

Anschließend konnte die mean fluorescence intensity (MFI) der negativen und der positiven Population gemessen und daraus der Stain Index anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Stain Index} = \frac{\text{MFI positiv} - \text{MFI negativ}}{2 \times \text{SD negativ Population}} \quad (\text{BioRad 2020})$$

Je höher der Stain Index desto besser war die Trennung der negativen und positiven Populationen möglich und entsprechend wurde die verwendete Antikörpermenge festgelegt.

4.2.4.2.3 Färbung für die FACS-Analyse

Die Färbung der PBMC erfolgte direkt nach der Kurzzeitstimulation. Ab diesem Arbeitsschritt wurde unter normalen Laborbedingungen an der Workbench weitergearbeitet. Die Antikörper wurden bei 4°C gelagert. Das FACS-Pulver wurde nach Erhalt gemäß der Herstellerangaben gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Wiederholtes auftauen und einfrieren wurde damit vermieden, um einen Qualitätsverlust der zu verhindern.

Die PBMC wurden im ersten Schritt bei 500xg bei Raumtemperatur über 5min mit Bremse zentrifugiert (500xg/RT/5min), der Überstand verworfen und in natriumacid- und FBS-freies DPBS überführt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt eine Resuspension des Zellpellets in natriumacid- und FBS-freiem DPBS auf eine Konzentration von $1-10 \times 10^6$ Zellen/ml. Nun erfolgt die Färbung mit 0,5 μ l Fixable Viability Stain pro 1 ml Zellsuspension mit einer anschließenden Inkubation bei Raumtemperatur im

Dunkeln über 10 min. Damit können in der FACS-Analyse tote Zellen identifiziert und die Ergebnisse besser interpretiert werden.

Im zweiten Schritt wurden die PBMC zwei Mal durch die Zugabe von 2ml FACS-Puffer, Vortexen, Zentrifugation mit 500xg/RT/5min und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Es erfolgte die Resuspension in FACS-Puffer auf eine Konzentration von 500.000 Zellen/ 100 µl. Jeweils 100 µl wurden entsprechend des Panels in die FACS-Tubes überführt und mit den extrazellulären Antikörpern gefärbt. Nach Vortexen erfolgte eine Inkubation über 15-30min bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer. Um die extrazellulären Antikörper zu fixieren, wurde anschließend jeweils 100 µl Fixationspuffer zugegeben, gevortext und für 20 min bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer inkubiert. Nach der Fixation mussten die Zellen für die intrazelluläre Färbung vorbereitet und die Zellmembran permeabel gemacht werden. Dazu wurde zweimalig 2 ml Permeabilisierungspuffer hinzugegeben, gevortext, bei 500xg/RT/5min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun konnten die intrazellulären Antikörper Anti-CD20 und Anti-IFN- γ hinzugegeben werden. Diese Färbung wurde 30-60 min bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer inkubiert. Um überschüssigen Antikörper aus den Zellen zu entfernen wurde nach der Inkubation nochmals 2 ml Permeabilisierungspuffer hinzugegeben, gevortext, bei 500xg/RT/5min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben, gevortext, bei 500xg/RT/5min zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Damit konnte mit der Messung begonnen werden.

4.2.5 IgG-ELISA

Um die Produktion an Immunglobulinen während der viertägigen Inkubation bewerten zu können, wurde ein IgG Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit dem asservierten und von Zellen gereinigten Medium durchgeführt. Dieser erfolgte mit dem IgG Human SimpleStep ELISA Kit, der die Isotypen IgG1-4 detektierte und für Zellkulturmedien genutzt werden konnte. Das eingesetzte Human IgG ELISA Kit besaß eine Sensitivität von 0,02 ng/ml bei einer Detektionsbreite von 0,23 – 15 ng/ml. Zur Vorbereitung der Standardkurve wurde zunächst die Verdünnung des Standard Stocks hergestellt. Dazu wurde lyophilisiertes, aufgereinigtes Human-IgG in Sample Diluent NS zur Lösung gebracht, um die 50 ng/ml Standard Lösung zu erhalten. Damit wurden in acht beschrifteten Eppendorf Tubes die Konzentrationen von 15 ng/ml, 7,5 ng/ml, 3,75 ng/ml, 1,87 ng/ml, 0,93 ng/ml, 0,47 ng/ml, 0,23 ng/ml und 0 ng/ml bereitgestellt.

Für die Proben wurden ebenfalls Verdünnungsreihen vorbereitet. Dazu wurden die Proben mit dem Sample Diluent NS zum Faktor 1:40, 1:2000 und 1:1x10⁵ verdünnt

Zusätzlich wurde nach Herstellerangaben Waschpuffer und der Antikörper Cocktail hergestellt. Dieser enthielt einen Bindungs- und einen Nachweis-Antikörper.

Nach Vorbereitung der Reagenzien wurde die 96 Well Platte gemäß dem Schema in Duplikaten mit je 50 µl der Probe und 50 µl des Antikörper Cocktails befüllt. Nach Verschluss der Platte wurde diese für 40 min bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte bei 400 rpm inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St 1	St 1	04-1-1:40	04-1-1:40	B4-3-1:1x10 ⁵	B4-3-1:1x10 ⁵	B5-2-1:2000	B5-2-1:2000	B4-1-1:40	B4-1-1:40	05-1-1:40	05-1-1:40
B	St 2	St 2	04-1-1:2000	04-1-1:2000	B4-4-1:40	B4-4-1:40	B5-2-1:1x10 ⁵	B5-2-1:1x10 ⁵	B4-1-1:2000	B4-1-1:2000	05-1-1:2000	05-1-1:2000
C	St 3	St 3	04-1-1:1x10 ⁵	04-1-1:1x10 ⁵	B4-4-1:2000	B4-4-1:2000	B5-3-1:40	B5-3-1:40	B4-1-1:1x10 ⁵	B4-1-1:1x10 ⁵	05-2-1:40	05-2-1:40
D	St 4	St 4	B4-2-1:40	B4-2-1:40	B4-4-1:1x10 ⁵	B4-4-1:1x10 ⁵	B5-3-1:2000	B5-3-1:2000	04-2-1:2000	04-2-1:2000	05-2-1:2000	05-2-1:2000
E	St 5	St 5	B4-2-1:2000	B4-2-1:2000	B5-1-1:40	B5-1-1:40	B5-3-1:1x10 ⁵	B5-3-1:1x10 ⁵	04-3-1:40	04-3-1:40	05-3-1:40	05-3-1:40
F	St 6	St 6	B4-2-1:1x10 ⁵	B4-2-1:1x10 ⁵	B5-1-1:2000	B5-1-1:2000	B5-4-1:40	B5-4-1:40	04-3-1:2000	04-3-1:2000	05-3-1:2000	05-3-1:2000
G	St 7	St 7	B4-3-1:40	B4-3-1:40	B5-1-1:1x10 ⁵	B5-1-1:1x10 ⁵	B5-4-1:2000	B5-4-1:2000	04-4-1:40	04-4-1:40	05-4-1:40	05-4-1:40
H	St 8 Blank	St 8 Blank	B4-3-1:2000	B4-3-1:2000	B5-2-1:40	B5-2-1:40	B5-4-1:1x10 ⁵	B5-4-1:1x10 ⁵	04-4-1:2000	04-4-1:2000	05-4-1:2000	05-4-1:2000

Abbildung 14: Belegung der 96 Well Platte für den IgG ELISA

Dargestellt ist die Belegung der 96 Well Platte für den IgG ELISA mit den Standardverdünnungen in Spalte 1+2 und den Proben mit Verdünnungsfaktor in Spalten 3-12

Anschließend wurde jedes Well 3 mal mit 350 µl Waschpuffer gewaschen und nach der Zugabe von 100 µl TMB Substrat für 5 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte bei 400 rpm inkubiert. Direkt danach wurden 100 µl Stopp Lösung in derselben Reihenfolge wie das TMB Substrat in jedes Well pipettiert. Nach 1 min auf einer Rüttelplatte bei 400 rpm wurde die optische Dichte (OD) bei 450 nm gemessen.

Für die anschließende Berechnung der IgG Konzentration in den Proben, wurde mithilfe der ΔOD der Standardverdünnungen eine Standardkurve interpoliert, nachdem die Absorption der Negativ-Kontrolle davon abgezogen worden war. Anschließend konnte über die OD der Verdünnungsreihen der Proben und deren Verdünnungsfaktoren die ursprüngliche IgG Konzentration im Medium berechnet werden. Messwerte die außerhalb der OD der Standardkurve und der Detektionsbreite des Kits lagen, wurden verworfen.

4.2.6 MACS-Beads Separation

Zur weiteren Untersuchung der Veränderung im memory B Zell Kompartiment und deren Einfluss auf andere Lymphozyten unter unseren Stimulationen wurde eine magnetische Zellseparation (MACS) durchgeführt.

Bei der MACS Zellseparation wurden bestimmte Oberflächenantigene mit, an Antikörper gebundenen, magnetischen Beads markiert und über eine magnetische Säule isoliert. Diese Isolation erfolgte in zwei Anreicherungsschritten. Aufgrund der nachfolgenden viertägigen Stimulation wurde an einem Laminar-Flow-Arbeitsplatz gearbeitet. Zum besseren Verständnis wurden auch hier die Arbeitsschritte in Abb. 15 visualisiert.

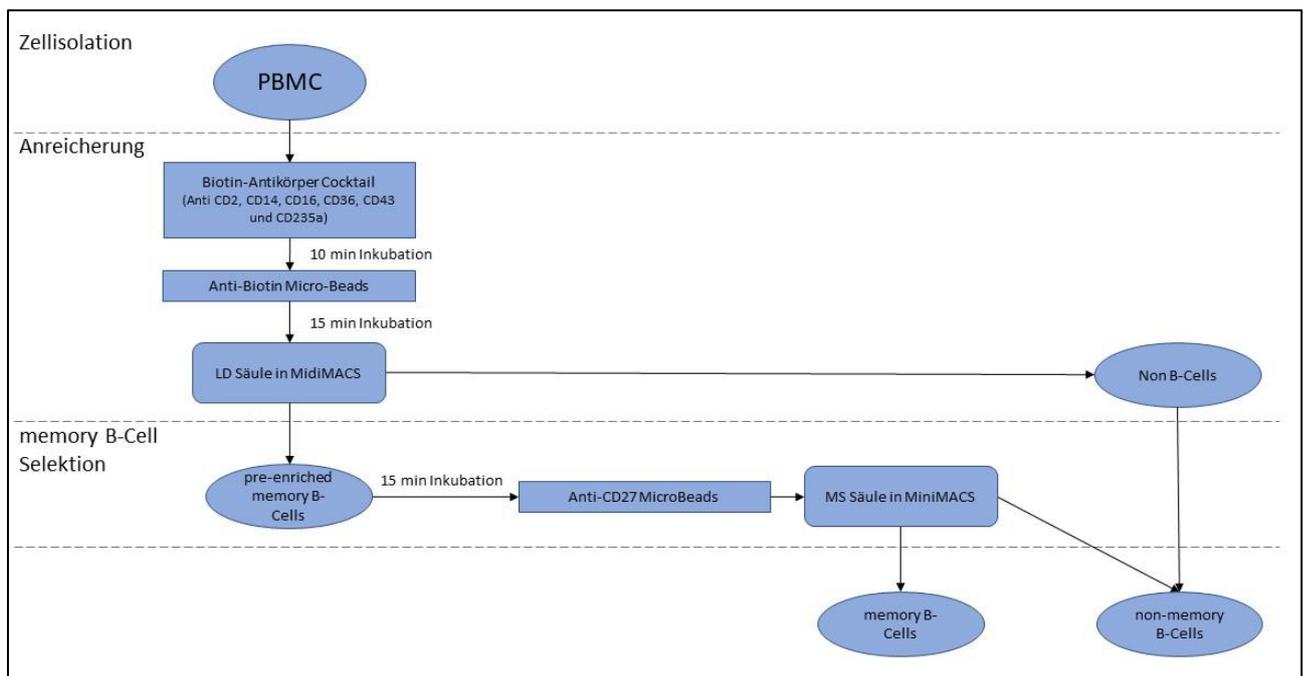


Abbildung 15: Arbeitsschritte und Verteilung der PBMC im Zuge der MACS-Separation

Darstellung der Arbeitsschritte während der MACS-Separation, beginnend bei den frisch isolierten PBMC. Angegeben sind ebenfalls die Stimulationszeiten und die beiden abschließend gewonnenen Isolationsfraktionen. Diese wurden anschließend den Stimulationsschritten zugeführt.

4.2.6.1 Anreicherung von B-Zellen

Nach der Isolation und Zählung der PBMC erfolgte die Resuspension in 400µl MACS-Puffer (DPBS 500ml, EDTA (2mM) 292,25 mg, BSA (0,5%) 2,5g). Es folgte die Zugabe eines Biotin-Antikörper Cocktails mit Antikörpern gegen CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 und CD235a um eine Markierung von nicht B-Zellen zu erreichen. Es wurde vorsichtig resuspendiert und 10 min bei 4°C in der Dunkelkammer inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl MACS-Puffer und 200µl Anti-Biotin Micro-Beads. Erneut wurde vorsichtig resuspendiert und 15 min bei 4°C in der Dunkelkammer inkubiert. Nach

Zugabe von 10 ml MACS-Puffer wurde 300xg/RT/10min zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und die Zellen in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Nachdem eine LD Säule im MidiMACS Separator mit 2 ml MACS-Puffer vorgewaschen wurde, wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert, zweimalig 1 ml MACS-Puffer dazugegeben und das Eluat in einem 15 ml Falcon gesammelt. Das Eluat wurde als „pre-enriched memory B-Cells“ auf Eis gestellt und nach einer Zellzählung 200 µl für eine Negativ-Kontrolle beiseitegestellt. Die magnetisch markierten Zellen wurden mit 3 ml MACS-Puffer und mithilfe eines Stempels aus der Säule gewonnen. Diese wurden als „non B-Cells“ bezeichnet. Auch hier erfolgte eine Zellzählung und eine Probenentnahme von 200 µl die FACS Positiv-Kontrolle.

4.2.6.2 Memory B-Cell Selektion

Die „pre-enriched memory B-Cells“ wurden anschließend mit 300xg/RT/10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 100 µl Anti-CD27 MicroBeads pipettiert. An diese Antikörper waren primär magnetische Beads gebunden. Nach vorsichtiger Resuspension erfolgte die Inkubation über 15 min bei 4°C in der Dunkelkammer. Nach Zugabe von 10 ml MACS-Puffer wurde 300xg/RT/10min zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nachdem eine MS Säule im MiniMACS Separator mit 500 µl MACS-Puffer vorgewaschen wurde, wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert, dreimalig 300 µl MACS-Puffer dazugegeben und das Eluat in einem 15 ml Falcon gesammelt. Das Eluat wurde als „non-memory B-Cells“ auf Eis gestellt und nach einer Zellzählung 200 µl für eine Negativ-Kontrolle beiseitegestellt. Die magnetisch markierten Zellen wurden mit 1 ml MACS-Puffer und mithilfe eines Stempels aus der Säule gewonnen. Diese waren die angereicherten „memory B-Cells“.

Anschließend wurden das Eluat „non-memory B-Cells“ und die depletierten „non B-Cells“ zu den non-memory B-Cell PBMC zusammengefasst.

4.2.7 Statistik

Zur statistischen Analyse der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism (Version 7.00) genutzt. Zur Bewertung der Zusammenhänge des klinischen Outcomes mit ELISpot und DSA wurde Chi-Quadrat-Test verwendet. Für den Vergleich von zwei oder mehr voneinander abhängigen Datensätzen wurde beim Timeshift Experiment und der MACS-Separation der multiple t-Test nach der Holm-Sidak Methode vorgenommen. Bei den Experimenten zur HBs-Antigenspezifischen Stimulation wurde der Wilcoxon Rangsummen-Test bei fehlender

Normalverteilung durchgeführt. Beim Engerix-B Experiment wurde zur Analyse des Zusammenhangs der Vitalität und Engerix-Konzentration die Spearman-Korrelation berechnet. Zur Bewertung der MACS Separation wurde ein gepaarter t-Test verwendet. Beim IgG ELISA erfolgte ebenfalls die Überprüfung der Korrelation nach Spearman, sowie ein gepaarter t-Test zur Bewertung der Konzentration. Beim abschließenden Vergleich der Gesamt-PBMC und der Isolationsfraktionen wurde ein gepaarter t-Test verwendet. In allen Fällen wurde eine statistische Signifikanz ab $p < 0,05$ angenommen und dort mit dem Symbol „*“ entsprechend gekennzeichnet. Bei höherer Signifikanz wurde für $p < 0,01$ das Symbol „**“ und bei $p < 0,001$ das Symbol „***“ verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Präparation der PBMC bei beständig hoher Vitalität

Probe	Gezählte Zellen	Quadrate	Verdünnungs-faktor	Proben-volumen (ml)	Zellzahl gesamt	Anzahl CPDA-Röhrchen	Zellen pro Röhrchen
1	177	2	10	5	4,43E+07	3	14.800.000
2	77	2	20	5	3,85E+07	3	12.800.000
3	91	2	20	10	9,10E+07	7	13.000.000
4	17	2	10	20	1,70E+07	2	8.500.000
5	73	2	10	5	1,83E+07	2	9.130.000
6	95	2	20	5	4,75E+07	6	7.920.000
7	61	2	20	5	3,05E+07	3	10.200.000
8	71	2	20	5	3,55E+07	2	17.800.000
9	62	2	20	5	3,10E+07	2	15.500.000
10	66	2	20	5	3,30E+07	3	11.000.000
11	76	2	20	5	3,80E+07	3	12.700.000
12	53	2	20	5	2,65E+07	3	8.830.000
13	120	2	20	5	6,00E+07	3	20.000.000
14	45	2	20	5	2,25E+07	2	11.300.000
15	38	2	20	5	1,90E+07	2	9.500.000
16	58	2	20	5	2,90E+07	3	9.670.000
17	163	2	10	5	4,08E+07	3	13.600.000
18	184	2	10	5	4,60E+07	3	15.300.000
19	119	2	10	5	2,98E+07	3	9.920.000
20	75	2	10	5	1,88E+07	2	9.380.000
21	66	2	10	5	1,65E+07	2	8.250.000
22	69	2	20	5	3,45E+07	4	8.630.000
23	169	2	20	5	8,45E+07	4	21.100.000
24	116	2	20	5	5,80E+07	4	14.500.000
25	58	2	20	5	2,90E+07	3	9.670.000
26	144	2	10	5	3,60E+07	2	18.000.000

Tabelle 12: Ausbeute der PBMC Isolation

Angegeben ist die Probennummer mit der Anzahl der mikroskopisch ausgezählten, vitalen Zellen. Mit der Anzahl der ausgezählten Quadrate, dem Verdünnungsfaktor und dem Probenvolumen ließ sich die Zellzahl im Medium bestimmen.

Als Grundlage aller Experimente wurden ausreichend PBMC mit guter Vitalität benötigt. Deshalb war eine gewissenhafte Isolation der PBMC unabdingbar. Durch die Färbung mit Trypanblau konnten Zellisolate schon vor der FACS-Färbung auf ihre Vitalität überprüft werden. Ebenfalls wurde durch

Zellzählung die Zellmenge kontrolliert. Zwar zeigten sich interindividuelle Schwankungen, jedoch konnten für jeden Versuchsaufbau genug Zellen bei beständig hoher Vitalität gewonnen werden.

Die Berechnung der Zellzahlen erfolgte nach vorgenannter Formel (s. Materialien und Methoden) und die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Zur Kontrolle und weiteren Planung wurde die Zellzahl pro abgenommenem 8 ml CPDA-Röhrchen berechnet.

5.2 Der verwendete ELISpot-Assay scheint zur Identifizierung von Spender-spezifischen memory B-Lymphozyten nicht geeignet

Bei 8 Patienten wurde ein Spender-spezifischen total-IgG ELISpot vor einer Nierentransplantation und, im Sinne eines Follow-Up, im Mittel nach 13,2 Tagen (Standardabweichung (Standard Deviation SD) = 3,06), durchgeführt. Die Ergebnisse des ELISpots sollten mit den klinischen Befunden zur Antikörperdiagnostik, sowie den histopathologischen Ergebnissen einer indizierten Nierenbiopsie ausgewertet werden.

In Tabelle 13 sind die klinischen Daten der Patienten dargestellt. Bei einem der Transplantationspatienten wurde bereits die zweite Nierentransplantation durchgeführt. Dieser gehörte zur Gruppe der fünf Patienten, die ihr Graft durch eine Lebendspende erhielten. Postmortale Nierenspenden erhielten drei Patienten. Bei Patienten 2, 3, 6 und 8 konnten bereits vor Transplantation anti-HLA Antikörper nachgewiesen werden. DSA konnten bei Patient 6 bereits präe (prä Tx) und post transplantationem (post Tx) bei 2, 3 und 6 detektiert werden. Vier der acht Patienten zeigten im Verlauf eine Abstoßungsreaktion, weshalb jeweils eine indizierte Biopsie durchgeführt wurde. Bei Patient 3 fand eine zweite Abstoßungsreaktion statt.

Die Ergebnisse des total-IgG ELISpots zeigten, dass sowohl vor, als auch nach Transplantation und der damit einhergehenden Immunsuppression Spots detektierbar waren (Tab. 14). Die Spotzahlen der Positiv-Kontrolle waren vor und nach Transplantation statistisch signifikant zur Negativ-Kontrolle erhöht (prä: $p < 0,001$; post: $p < 0,001$). In der Differenz zur Grundaktivität in der Negativ-Kontrolle (Δ) der Positiv-Kontrolle zeigte sich nach Transplantation bei den Patienten 1, 2, 5, 6, 7 und 8 ein Anstieg der Spotzahlen. In Abbildung 16 ist zu sehen, dass der Mittelwert über alle Patienten in der Positiv-Kontrolle ebenfalls anstieg. Beim Δ der Stimulation mit Engerix B zeigte sich, dass die Spotzahlen vor Transplantation bei den Patienten 2, 6, 7 und 8 positiv war. Der Antigen-spezifische Ansatz war, bei nur gering erhöhten der Spotzahlen (MW = 5,6 (SD = 10,35)) vor Transplantation, zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikant zur Negativ-Kontrolle erhöht. In der Berechnung der Differenzen kam es durch erhöhte Spotzahlen in den Negativ-Kontrollen zu negativen Δ . Deshalb werden in der folgenden Einzelauswertung negative Spotzahlen als 0 angenommen.

Pat. ID	Tx	HLA-Ak prä	HLA-Ak post	DSA post (d post Tx)	Biopsiebefund (d post Tx)	Lebendspende
1	1. NTx	-	-	-	Banff 4 IA (152 d)	ja
2	1. NTx	aHLA K I	aHLA K I	aHLA-B51 (190 d)	-	ja
3	1. NTx	aHLA K I + II	aHLA K I + II	aHLA-B13 aHLA-DR7 (27 d)	1. Banff 4 IIA (7 d) 2. Banff 3 (16 d)	ja
4	1. NTx	-	-	-	-	ja
5	2. NTx	-	-	-	-	ja
6	1. NTx	aHLA K I, DSA A32	aHLA K I	DSA A32 (24 d)	Banff 2 (20 d)	nein
7	1. NTx	-	-	-	-	nein
8	1. NTx	aHLA K II	-	-	Banff 3 (10 d)	nein

Tabelle 13: Klinische Daten der Patienten

Dargestellt sind ausgewählte klinische Daten zur nachfolgenden Auswertung in Zusammenschau mit den Ergebnissen des spenderspezifischen total-IgG ELISpots.

Pat. ID = Studieninterne ID des Patienten, Tx = Angabe der Häufigkeit einer Transplantation, NTx = Nierentransplantation, HLA-Ak = Typ der nachgewiesenen HLA-Antikörper vor (prä) und nach (post) Transplantation, DSA post = Typ des nachgewiesenen DSA mit Zeitangabe nach (post) Transplantation in Tagen (d), Biopsiebefund = Histopathologischer Befund der Nierenbiopsie bei Abstoßung mit Zeitangabe in Tagen (d), „-“ = kein Nachweis im Beobachtungszeitraum

Bei Patient 1 zeigte sich in der Differenz des Spender-spezifischen Ansatzes zur Negativ-Kontrolle sowohl prä, als auch post Tx keine Aktivität. 152 Tage nach Transplantation wurde bei diesem eine steroidsensible Abstoßungsreaktion (Banff Typ 4 IA) beobachtet. Bei Patient 2 zeigte sich ein Δ des Spender-spezifischen Ansatzes eine Erhöhung von 0 auf 1,00 post Tx. Trotz neu aufgetretener DSA nach 190 Tagen fand bis zum Ende des Beobachtungszeitraums keine Abstoßungsreaktion statt. Bei Patient 3 zeigten sich im Verlauf keine Δ E+ Ψ S Spotzahlen. Jedoch wurden bei präformierten und auch neu aufgetretenen DSA zwei Abstoßungsreaktionen nach 7 und 16 Tagen klinisch auffällig. Bei Patient 4 waren im Verlauf keine Δ E+ Ψ S Spotzahlen nachweisbar und im Beobachtungszeitraum fand keine Abstoßungsreaktion statt.

Ab Patient 5 wurden zusätzlich Negativ-Kontrollen der bestrahlten Spender-Milz-PBMC durchgeführt. Diese flossen in Berechnung der Δ E+ Ψ S Spotzahlen als zusätzliche Restaktivität mit ein. Patient 5 blieb

während des Beobachtungszeitraums, bei Abnahme der Δ Spotzahlen des Spender-spezifischen Ansatzes von 2,50 auf 0 klinisch unauffällig. Bei Patient 6 war eine Abnahme der Δ E+ Ψ S Spotzahlen von 53,83 auf 11,67 messbar. Bei diesem wurde jedoch 20 Tage post Tx eine Abstoßungsreaktion (Banff 2) nachgewiesen. Bereits vor Transplantation nachgewiesene, jedoch im Zuge der Immunsuppression nicht mehr gemessene, DSA waren 4 Tage später ebenfalls wieder messbar. Patient 7 blieb bei sinkenden Δ E+ Ψ S Spotzahlen von 58,17 auf 7,50 klinisch unauffällig. Bei Patient 8 zeigte sich im Verlauf nur ein Abfall der Δ E+ Ψ S Spotzahlen von 3,83 auf 0. Die präformierten DSA waren nach Transplantation nicht mehr nachweisbar. Jedoch wurde 10 Tage nach Transplantation eine Abstoßungsreaktion (Banff 3) klinisch auffällig.

Pat. ID	Zeitpunkt	neg	pos	E+S	E+HBs	Ψ S+0	Δ pos	Δ E+HBs	Δ E+ Ψ S	real Δ E+ Ψ S
1	prä	25,00	47,67	9,67	23,33	-	22,67	-1,67	-15,33	-15,33
	post	5,67	392,00	0,67	2,33	-	386,33	-3,33	-5,00	-5,00
2	prä	22,00	480,67	13,17	38,67	-	458,67	16,67	-8,83	-8,83
	post	0,00	481,33	1,00	1,00	-	481,33	1,00	1,00	1,00
3	prä	3,33	750,00	0,33	3,00	-	746,67	-0,33	-3,00	-3,00
	post	16,00	324,67	14,67	0,00	-	308,67	-16,0	-1,33	-1,33
4	prä	9,00	656,00	0,83	7,00	-	647,00	-2,00	-8,17	-8,17
	post	10,00	421,33	2,50	7,67	-	411,33	-2,33	-7,50	-7,50
5	prä	24,00	233,67	28,00	16,00	1,50	209,67	-8,00	4,00	2,50
	post	17,00	530,33	3,50	0,33	0,00	513,33	-16,7	-13,50	-13,50
6	prä	2,67	162,00	56,67	14,33	0,17	159,33	11,67	54,00	53,83
	post	1,67	198,00	31,17	0,00	17,83	196,33	-1,67	29,50	11,67
7	prä	11,67	314,33	103,83	33,33	34,00	302,67	21,67	92,17	58,17
	post	20,33	353,33	30,00	15,67	2,17	333,00	-4,67	9,67	7,50
8	prä	2,67	263,33	7,83	9,67	1,33	260,67	7,00	5,17	3,83
	post	2,00	257,67	4,17	3,00	7,17	255,67	1,00	2,17	-5,00

Tabelle 14: Tabellarische Ergebnisse der ELISpots Messungen der 8 Patienten vor und nach Transplantation

Dargestellt sind die Ergebnisse des spenderspezifischen total-IgG ELISpots. Zunächst sind die Mittelwerte der Spots pro Well in den Ansätzen (s. Materialien und Methoden). Anschließend wurde aus der Negativ-Kontrolle und den anderen Mittelwerten jeweils der Unterschied (Δ) berechnet. Da bei den Patienten 5-8 jeweils eine Negativ-Kontrolle der bestrahlten Spenderzellen durchgeführt wurde, konnte anschließend ein real Δ berechnet werden. Pat. ID = Studieninterne ID des Patienten, neg = Negativ-Kontrolle, pos = Positiv-Kontrolle, E+HBs = Hepatitis B surface Antigen (Engerix B) -spezifischer Ansatz, E+ Ψ S = Spender-spezifischer Ansatz, Ψ S+0 = Negativ-Kontrolle der bestrahlten Spender-Milz-PBMC, „-“ = keine Daten erhoben

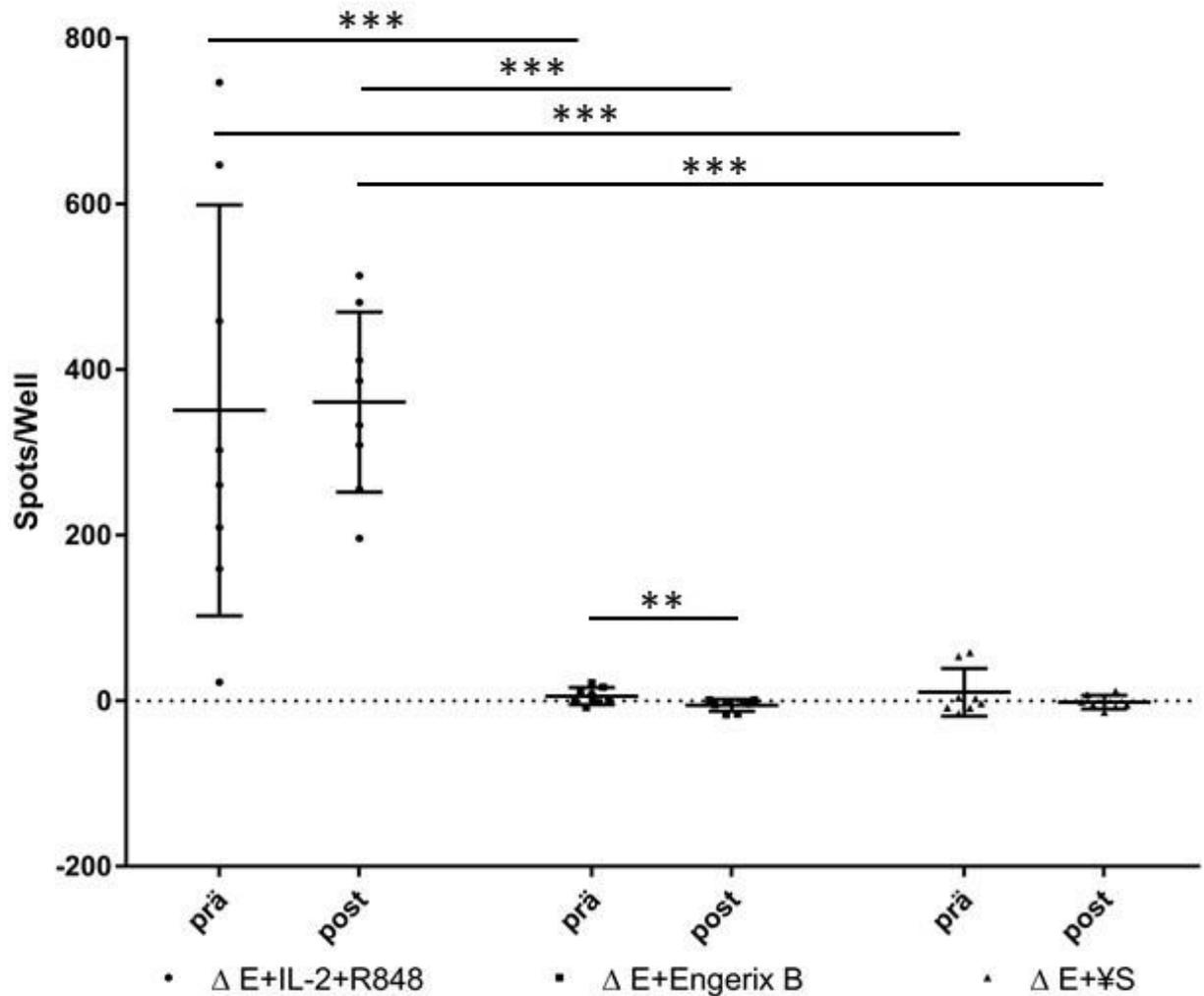


Abbildung 16: Δ Ergebnisse der ELISpots Messungen der 8 Patienten vor und nach Transplantation

Dargestellt sind die Ergebnisse des spenderspezifischen total-IgG ELISpots vor (prä) und nach (post) erfolgter Nierentransplantation. Positiv-Kontrolle (n=8), HBs-Stimulation (n=8) und Spender-spezifischer Ansatz (n=8), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: Positiv vs. HBs: prä: $p < 0,001$; post: $p < 0,001$. Positiv vs. Spender-spezifisch: prä: $p < 0,001$; post: $p < 0,001$. HBs vs. Spender-spezifisch: prä: n.s.; post: n.s. gepaarter t-Test: prä vs. post: Positiv: n.s., HBs: $p < 0,01$, Spender-spezifisch: n.s.

$\Delta E+IL-2+R848$ = Positiv-Kontrolle, $\Delta E+Engerix B$ = Hepatitis B surface Antigen (Engerix B) -spezifischer Ansatz, $\Delta E+¥S$ = real Δ des Spender-spezifischen Ansatzes

Abschließend wurde eine Abhängigkeit beobachteter Abstoßungsreaktionen mit nachgewiesenen DSA- oder HLA-Antikörpern und detektierten Spots im Spender-spezifischen Assay untersucht. In Abbildung 17 sind die beobachteten Trends dargestellt. Dabei zeigte sich, dass es eine tendenzielle, nicht signifikante Abhängigkeit von prä Tx nachgewiesenen HLA-Antikörpern und einer Transplantatabstoßung gibt ($p=0,1573$). Eine Abhängigkeit der stattgefundenen Abstoßungsreaktionen mit gemessenen Spots im Spender-spezifischen ELISpot konnte nicht gefunden werden. Ebenfalls wurde untersucht, ob prä Tx gemessene Spots oder der Trend der $\Delta E+¥S$ einen

Zusammenhang mit nachgewiesenen DSA- oder HLA-Antikörpern aufweisen. Diese zeigten sich jedoch weder zu prä-Tx oder post-Tx detektierten Antikörpern statistisch signifikant abhängig.

Pat. ID	Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 4	Pat 5	Pat 6	Pat 7	Pat 8
Abstoßung	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja
Trend DSA-/HLA-Antikörper	—	/	/	—	—	—	—	\
Trend Spots in $\Delta E+\%S$	—	/	—	—	\	\	\	\
DSA-/HLA-Antikörper prä	0	1	2	0	0	2	0	1
DSA-/HLA-Antikörper post	0	2	4	0	0	2	0	0
Spots in $\Delta E+\%S$ prä	0	0	0	0	2,5	53,83	58,17	3,83
Spots in $\Delta E+\%S$ post	0	1	0	0	0	11,67	7,5	0

Abbildung 17: Trends der Anzahl detektierter Spots im Spender-spezifischen ELISpot in Zusammenhang mit einer Abstoßungsreaktion

Dargestellt sind die Trends der Anzahl der nachgewiesenen DSA-/HLA-Antikörper im Vergleich prä zu post Tx, sowie die Trends der gemessenen $\Delta E+\%S$ Spots prä zu post Tx. Dazu wurde eine stattgefundenene Abstoßungsreaktion in Bezug gesetzt $DSA-/HLA-Antikörper\ prä/post = Anzahl\ prä/post\ Tx\ nachgewiesener\ DSA-/HLA-Antikörper$, $Spots\ in\ \Delta E+\%S\ prä/post = real\ \Delta\ des\ Spender-spezifischen\ Ansatzes\ prä/post\ Tx$

5.3 Etablierung und Anpassung des B- und T-Zell Panels mit funktionellem IFN- γ Assay

5.3.1 Suche nach passender Antikörpermenge in der FACS-Färbung

Nach Festlegung des Panels (s. Materialien und Methoden) führte ich eine Titration der verwendeten Antikörper durch. Dadurch konnte die benötigte Antikörper Menge für die FACS-Messung bestimmt werden, um einem unnötigen Überschuss in der Färbung entgegenzuwirken und gleichzeitig auch nicht zu wenig Antikörper einzusetzen. Die Titration wird für eine definierte Anzahl Zellen in einem definierten Volumen gemessen und ist folglich nur für diese gültig. In unseren Experimenten waren dies 500.000 Zellen/100 μ l in einem FACS-Tube.

Für jeden verwendeten Antikörper wurden drei verschiedene Konzentrationen eingesetzt, ausgehend von der vom Hersteller empfohlenen Menge. Nach anschließender FACS-Messung konnte der Stain Index nach vorgenannter Formel (s. Materialien und Methoden) berechnet und die endgültig eingesetzte Menge bestimmt werden.

		Titration auf 500.000 Zellen/100µl								
Antikörper	µl	Zellen (mean)	Positiv (mean)	Negativ (mean)	SD Negativ	2x Negativ	SD	MFI Positiv	MFI Negativ	Stain Index
CD 3	5	4603,4	7143,9	235,3	3211,6	6423,2		11747,3	4838,7	1,08
CD 3	3	3332	5190,3	157	837,2	1674,4		8522,3	3489	3,01
CD 3	1	1251	2002,8	157	2670,6	5341,2		7193,1	5347,3	0,35
CD 4	5	7658,4	13550,9	13,3	46,9	93,8		13707,9	170,3	144,32
CD 4	3	5285,6	9244,2	11,6	45,3	90,6		14529,8	5297,2	101,91
CD 4	1	3597,9	6323,4	12,1	44,7	89,4		9921,3	3610	70,6
CD 8	5	7272,4	17633,5	93,3	2882,3	5764,6		24905,9	7365,7	3,04
CD 8	3	7046,8	19281,4	148,2	4509,8	9019,6		26328,2	7195	2,12
CD 8	1	7570,4	22727,1	58,9	105,1	210,2		30297,5	7629,3	107,84
CD 19	5	94	1420,9	51,6	47,2	94,4		1514,9	145,6	14,51
CD 19	3	212,1	2279,7	158,1	4174,8	8349,6		2491,8	370,2	25,01
CD 19	1	84,9	1349,5	51,9	48,3	96,6		1434,4	136,8	13,43
CD 20	5	3673,2	41272,3	2919,1	3927,4	7854,8		44945,5	6592,3	4,88
CD 20	3	1698,3	28496,4	1061	2795	5590		30194,7	2759,3	4,91
CD 20	1	1013,6	20831,8	549,9	2159,2	4318,4		21845,4	1563,5	4,7
CD 27	5	7456,1	13858,5	156,5	1747,8	3495,6		21314,6	7612,6	3,92
CD 27	3	7645,4	13873,9	173,3	3249,4	6498,8		21519,3	7818,7	2,11
CD 27	1	6167,8	11562,1	183,8	4275,9	8551,8		17729,9	6351,6	1,33
CD 38	20	5581	8457,3	680,8	11026,6	22053,2		14038,3	6261,8	0,35
CD 38	10	4501,4	7041,4	564,8	9514,1	19028,2		11542,8	5066,2	0,34
CD 38	5	3022,9	5306,7	117,8	2549,7	5099,4		8329,6	3140,7	1,02
CD 40	5	380,4	1495,2	55,6	53,5	107		1875,6	436	13,45
CD 40	3	272	1138,9	50,2	53,7	107,4		1410,9	322,2	10,14
CD 40	1	178,7	756,8	52,1	59,3	118,6		935,5	230,8	5,94
CD 45	5	10378	10881	274	6105	12210		21259	10652	0,87
CD 45	3	9710	10280	302	7017	14034		19990	10012	0,71
CD 45	1	8841	9363	244	6387	12774		18204	9085	0,71
HLA-DR	5	3728,9	10744,5	112,1	2031,6	4063,2		14473,4	3841	2,62
HLA-DR	3	3169,3	9981,4	80,8	85,6	171,2		13150,7	3250,1	57,83
HLA-DR	1	2064,4	7433	67,1	86,1	172,2		9497,4	2131,5	42,78
IFN-γ	5	229,6	591	157,6	68	136		820,6	387,2	3,19

IFN- γ	3	-740	146274,6	-7340,3	1611,3	3222,6	145534,6	-8080,3	47,67
IFN- γ	1	41,4	9026	-73,4	562,5	1125	9067,4	-32	8,09
IgG	20	337,3	1217,6	86,2	59,8	119,6	1554,9	423,5	9,46
IgG	10	218,7	860,1	78,6	49,7	99,4	1078,8	297,3	7,86
IgG	5	164,9	694,1	81,1	56,1	112,2	859	246	5,46
IgD	5	98,2	1766,8	69,3	42,4	84,8	1865	167,5	20,02
IgD	3	82,4	1445,4	66,3	40	80	1527,8	148,7	17,24
IgD	1	77	1170	63,8	37,9	75,8	1247	140,8	14,59
IgM	5	188,3	316,9	163,1	2576,6	5153,2	505,2	351,4	0,03
IgM	3	131,9	289,5	109,2	1251,9	2503,8	421,4	241,1	0,07
IgM	1	37,9	37,9	37,9	1200,7	2401,4	75,8	75,8	0

Tabelle 15: Ergebnisse der Titration mit Berechnung des Stain Index

Angegeben sind die Antikörper in Kurzbeschreibung und die Ergebnisse der MFI Messung mit berechneter SD. Farblich hinterlegt wurden die Stain Indices und Antikörper Mengen die aufgrund dieser Messungen eingesetzt wurden.

Es zeigte sich (Tab. 15), dass für Anti-Human CD3, CD4, CD19, CD20, CD45, HLA-DR, IFN- γ und IgM zunächst eine eingesetzte Menge von 3 μ l am günstigsten war. Für CD27, CD38, CD40 und IgD zeigten sich 5 μ l am geeignetsten. Für CD8 wurde 1 μ l und für IgG wurde 10 μ l festgelegt. Nicht in die Titration aufgenommen wurde Fixable Viability Stain. Da der Peak der negativen und der positiven Population aufgrund der Eigenschaften des Farbstoffs ineinander übergingen und dadurch die MFI-Berechnung fehlerhaft war, war hier keine initiale Titration möglich. Folglich wurde mit der vom Hersteller empfohlenen Menge von 0,5 μ l FVS pro 1 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von $1-10 \times 10^6$ Zellen/ml gefärbt.

Da die in der Titration bestimmten Mengen unter standardisierten Bedingungen ermittelt wurden, erfolgte anschließend eine Feinjustierung der eingesetzten Antikörpermengen. Dazu wurden anhand der Ergebnisse der Titration die FACS-Färbungen gestartet. Nach jeder Messung wurde jedoch reevaluiert, ob auf Grundlage der Titration in Verbindung mit der Kompensation eine gute Darstellung der Populationen im Dot-Plot möglich war. Entsprechend wurden die Mengen an Antikörpern angepasst. Für das endgültige Panel wurden 500.000 Zellen in 100 μ l FACS-Puffer wie folgt gefärbt: FVS mit 0,5 μ l auf 1 ml Zellsuspension auf $1-10 \times 10^6$ Zellen/ml, HLA-DR mit 3 μ l, IgG mit 10 μ l, CD45 mit 3 μ l, CD8 mit 2 μ l, CD20 mit 3 μ l, CD27 mit 5 μ l, CD3 mit 4 μ l, IgM mit 3 μ l, CD40 mit 5 μ l, CD4 mit 4 μ l, CD38 mit 5 μ l, IFN- γ mit 2 μ l, CD19 mit 3 μ l und IgD mit 5 μ l.

5.3.2 Festlegung der Gatingstrategie

In unserem Panel wurden 14 Antigene und ein Vitalitätsfarbstoff gefärbt (s. Materialien und Methoden) um anschließend in positive und negative Populationen im Dotplot auftrennen zu können.

Die Gatingstrategie wurde darauf ausgelegt, die Populationen mit möglichst wenigen Dotplots voneinander abzugrenzen, um systematische Fehler zu vermeiden. Grundsätzlich wurden die Zellen zunächst anhand ihrer SSC und FSC im Dotplot dargestellt. Dabei konnte die PMC-Voltage des SSC angepasst werden um die Zellen gut darstellen zu können (Abb. 18A). Da die Kompensation an die Einstellung des FSC gebunden war, durfte diese nicht angepasst werden. Anschließend wurde im Histogramm mithilfe von FVS zwischen den positiv angefärbten toten und den negativ gefärbten lebenden Zellen unterschieden. Im Dotplot wurden nun die lebenden 45^+ Leukozyten identifiziert. Für die weiteren Analysen werden Dotplots verwendet. Aus den Leukozyten wurde anschließend in $CD3^+/CD19^-$ T-Lymphozyten und $CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten unterschieden (Abb. 18B).

Zunächst konnten aus den T-Zellen durch die gegenseitige Auftragung von CD8 und CD4 in $CD4^-/CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und $CD4^+/CD8^-$ T Helfer Zellen unterschieden werden. Im Anschluss konnten aus diesen beiden Populationen im Sinne des funktionellen Assays die intrazelluläre IFN- γ Anreicherung gemessen werden (Abb. 18C).

Nach Analyse der T-Lymphozyten konnte mit den B-Lymphozyten fortgefahren werden. Dazu wurde aus der $CD3^-/CD19^+$ initial $CD38^-$ gegen $CD20^+$ aufgetragen (Abb. 18D). Die $CD20^-/CD38^-$ Zellen wurden nicht weiter differenziert, jedoch in der Auswertung stets beachtet um Schwankungen in den B-Zell Subpopulationen bewerten zu können. Aus der $CD20^+/CD38^+$ Population konnten die IgD^-/IgM^- class switched B-Zellen gated werden (Abb. 18E). Aus der $CD20^-/CD38^+$ Population wurde zunächst die IgD^-/IgM^- Subpopulation differenziert um diese in einem weiteren Dotplot bezüglich CD27 und HLA-DR zu analysieren. Dabei konnten die $CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten und die $CD27^+/HLA-DR^-$ Plasmazellen identifiziert werden (Abb. 18F). Im Anschluss erfolgte die Analyse der $CD20^+/CD38^-$ Population. Hierbei wurde zunächst CD27 und CD40 gegeneinander aufgetragen. Aus den $CD27^{var}/CD40^+$ Zellen wurden durch Gegenüberstellung von IgG und IgD, die IgG^{var}/IgD^+ non class switched memory B-Zellen und eine IgG^+/IgD^- Population identifiziert werden. Derer IgM^+ Anteil wurden als class switched memory B-Zellen bezeichnet (Abb. 18G).

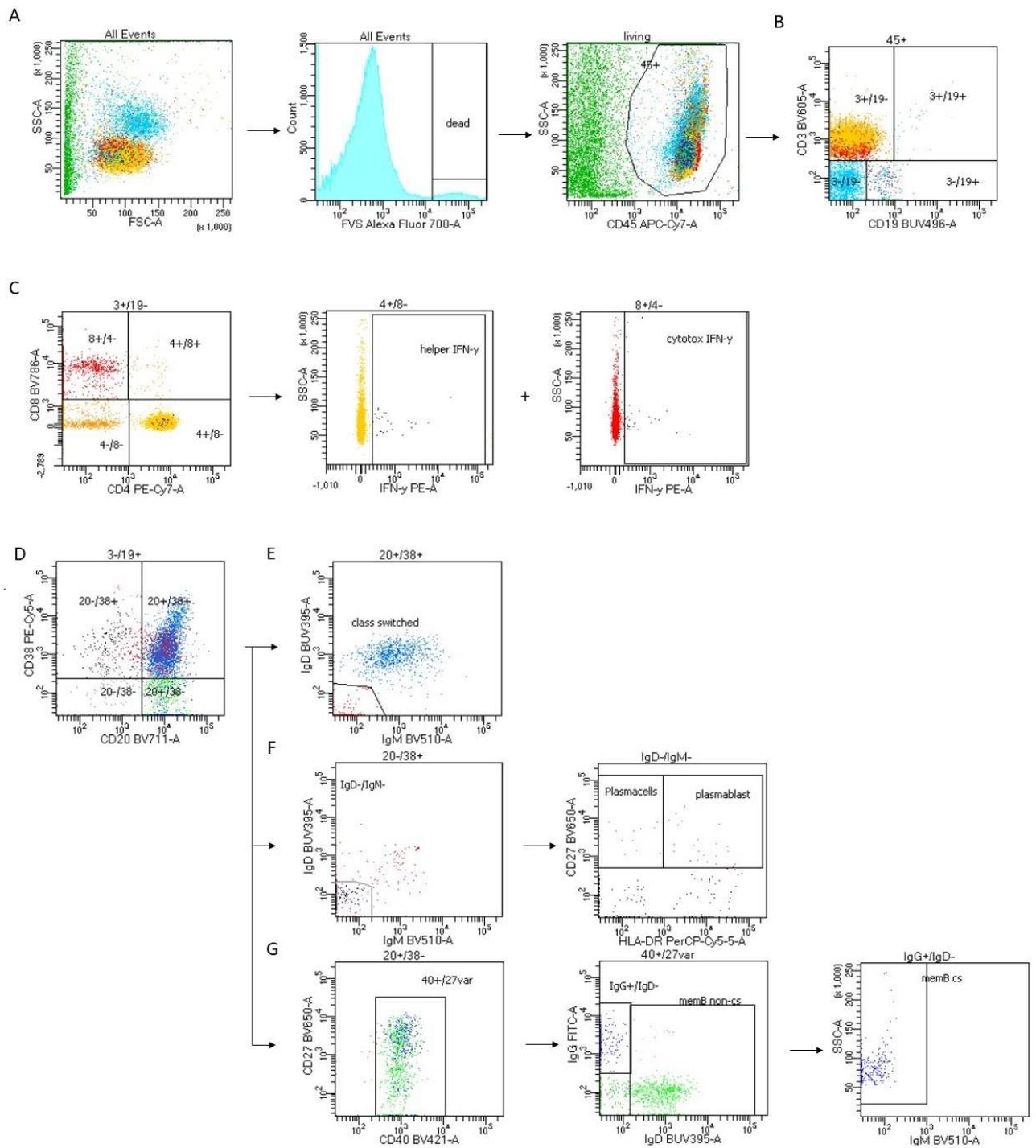


Abbildung 18: Gatingstrategie des B- und T-Zell Panels ohne IFN- γ Gating der B-Zellen mit beispielhaften FACS-Bildern

[A]: Gating der PBMC auf lebende CD45⁺ Zellen **[B]:** Gating der lebenden CD45⁺ Zellen mit CD3 und CD19 **[C]:** Gating der CD3⁺/CD19⁺ Zellen mit IFN- γ Gating **[D]:** Gating der CD3⁺/CD19⁺ Zellen mit CD20 und CD38 **[E]:** Gating der CD20⁺/CD38⁺ Zellen mit IgD und IgM **[F]:** Gating der CD20⁺/CD38⁺ Zellen auf Plasmablasten und Plasmazellen **[G]:** Gating der CD20⁺/CD38⁻ Zellen auf non class switched und class switched memory B-Zellen

Auch in den B-Zell Subpopulationen wurde im Anschluss die intrazelluläre IFN- γ Anreicherung gemessen. Hierzu wurde aus jeder Subpopulation die IFN- γ positive Population gated (Abb. 19).

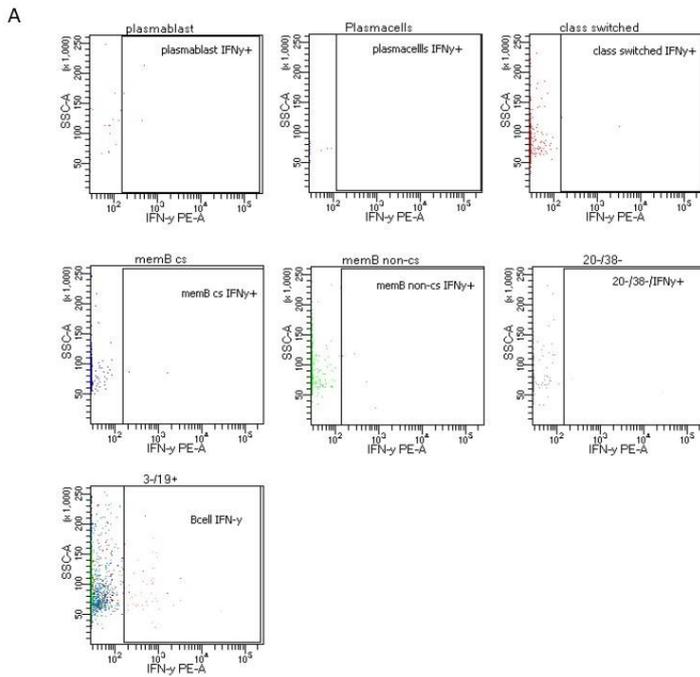


Abbildung 19: Gatingstrategie des IFN- γ Gatings der B-Zellen im B- und T-Zell Panel mit beispielhaften FACS-Bildern

Gating der Subpopulationen der B-Zellen auf IFN- γ

Um eine Autofluoreszenz der PBMC auszuschließen wurde immer ein Tube mit ungefärbten und gleich behandelten Zellen gemessen. Auch wurden in jeder Messung FMOs eingesetzt um saubere Trennungen der positiven und negativen Populationen zu ermöglichen. Diese Trennlinien konnten also stets individuell kontrolliert und angepasst werden, da diese durch die Stimulationen und den PBMC Spender beeinflusst wurden. Eine falsch positive Population im niedrigen Promillebereich wurde akzeptiert. Es zeigte sich, dass unsere verwendete Gatingstrategie mit möglichst wenigen Dot-Plots eine effektive Auftrennung der zu beobachtenden Populationen ermöglichte. Die nach der Etablierung festgelegte Strategie wurde für die weiteren Auswertungen nicht mehr verändert.

Um ausschließen zu können, dass aufgrund einer zellulären Erschöpfung oder einer anderweitigen Zellschädigung keine Zytokinproduktion erfolgen konnte, wurde bei jeder Messung eine standardisierte Kontrolle einer positiven IFN- γ Produktion durchgeführt. Diese ist in Abb. 20A für T-Zell Subpopulationen und in Abb. 20B für die B-Zellen dargestellt. Es zeigte sich in jeder ausgewerteten Messung eine deutlichere positive Population im Vergleich der Probe und der Kontrolle. Diese zelluläre Antwort mit intrazellulärer Anreicherung von IFN- γ war sowohl in T- als auch B-Lymphozyten zu beobachten und bekräftigt somit die Verwendung von LAC als Instrument zur Bewertung der zellulären Zytokinproduktion in unseren Experimenten.

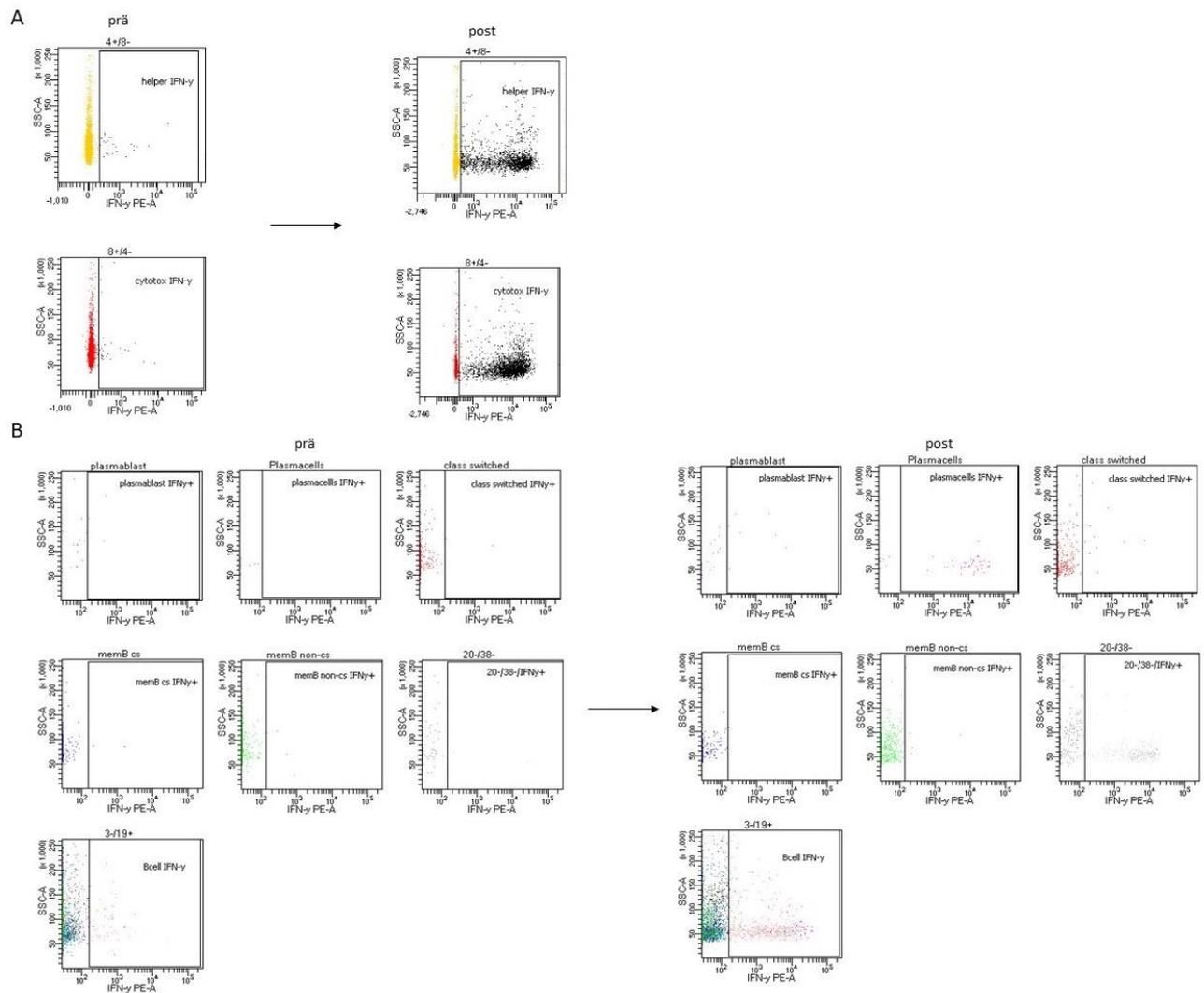


Abbildung 20: IFN- γ Produktion der T- und B-Zell Subpopulationen vor und nach 4h Stimulation mit BD LAC

[A]: Beispielhafte FACS-Bilder der intrazellulären IFN- γ Färbung der CD3⁺ T-Zell Subpopulationen vor und nach Stimulation mit LAC **[B]:** Beispielhafte FACS-Bilder der intrazellulären IFN- γ Färbung der CD19⁺ und weiter differenzierten B-Zell Subpopulationen vor und nach Stimulation mit LAC

5.4 Festlegung des endgültigen Messzeitpunktes

Die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten läuft zwar parallel, jedoch zeigen sich im zeitlichen Verlauf deutliche Unterschiede. Die Aktivierung von T-Lymphozyten geschieht meist sehr schnell nach Antigenkontakt, während die Differenzierung der B-Lymphozyten längerfristig verläuft. (Murphy 2011, Maglione et al. 2009)

Deshalb musste nach der Etablierung des Panels zunächst festgelegt werden, an welchem Tag eine Messung beider Zellpopulationen möglich ist, ohne dass eine Erschöpfung der T-Zellen bei bestehender B-Zell Aktivierung eingetreten ist. Damit waren die zu beobachtenden Kennzahlen die Vitalität, sowie die B- und T-Zell Veränderungen über die Zeit. Dazu wurde ein Versuchsaufbau

gewählt, bei dem Messungen an vier aufeinander folgenden Tagen ausgewertet werden. Als Differenzierungsstimulus wurden anschließend die in der Positiv-Kontrolle genutzten Stimulantien Il-2 und R848 verwendet.

5.4.1 Die Zellvitalität bleibt innerhalb des Beobachtungszeitraums stabil

Da es bei der Inkubation über vier Tage in Kulturmedium trotz der bereitgestellten Nährstoffe zu einem Zelluntergang unserer PBMC kommen kann, wurde bei jeder Messung eine Vitalitätsmessung vorgenommen. Bei der Zellzählung nach Isolation mit Trypanblau zeigte sich an Tag 0 bereits vor der FACS-Färbung eine stets gute Vitalität. Die Zellvitalität zeigte sich bei den PBMC in Kulturmedium im Verlauf der vier Tage stets bei über 90% (Daten nicht gezeigt).

Um ebenfalls einen Referenzwert für PBMC unter Stimulation über einen bestimmten Zeitraum zu erhalten, wurde im Anschluss die Vitalität der PBMC unter Stimulation mit Il-2 und R848 gemessen. Hier wurden die PBMC zunächst isoliert und anschließend in Kulturmedium und Kulturmedium mit Il-2 und R848 inkubiert. Auch hier zeigte sich bei der Zellzählung an d0 mit Trypanblau eine gute Vitalität. Bei der FACS-Analyse zeigte sich an d0 ebenfalls eine sehr gute Zellvitalität von im Mittel 98,95 % bei einer Standardabweichung von 0,86%. Bei einer Vitalität von stets über 90%, zeigte sich zu allen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stimulationen (Abb. 21). Damit konnte der Faktor Zeit auf die Vitalität an allen vier Tagen ausgeschlossen und mit der Beobachtung der Subpopulationen fortgefahren werden.

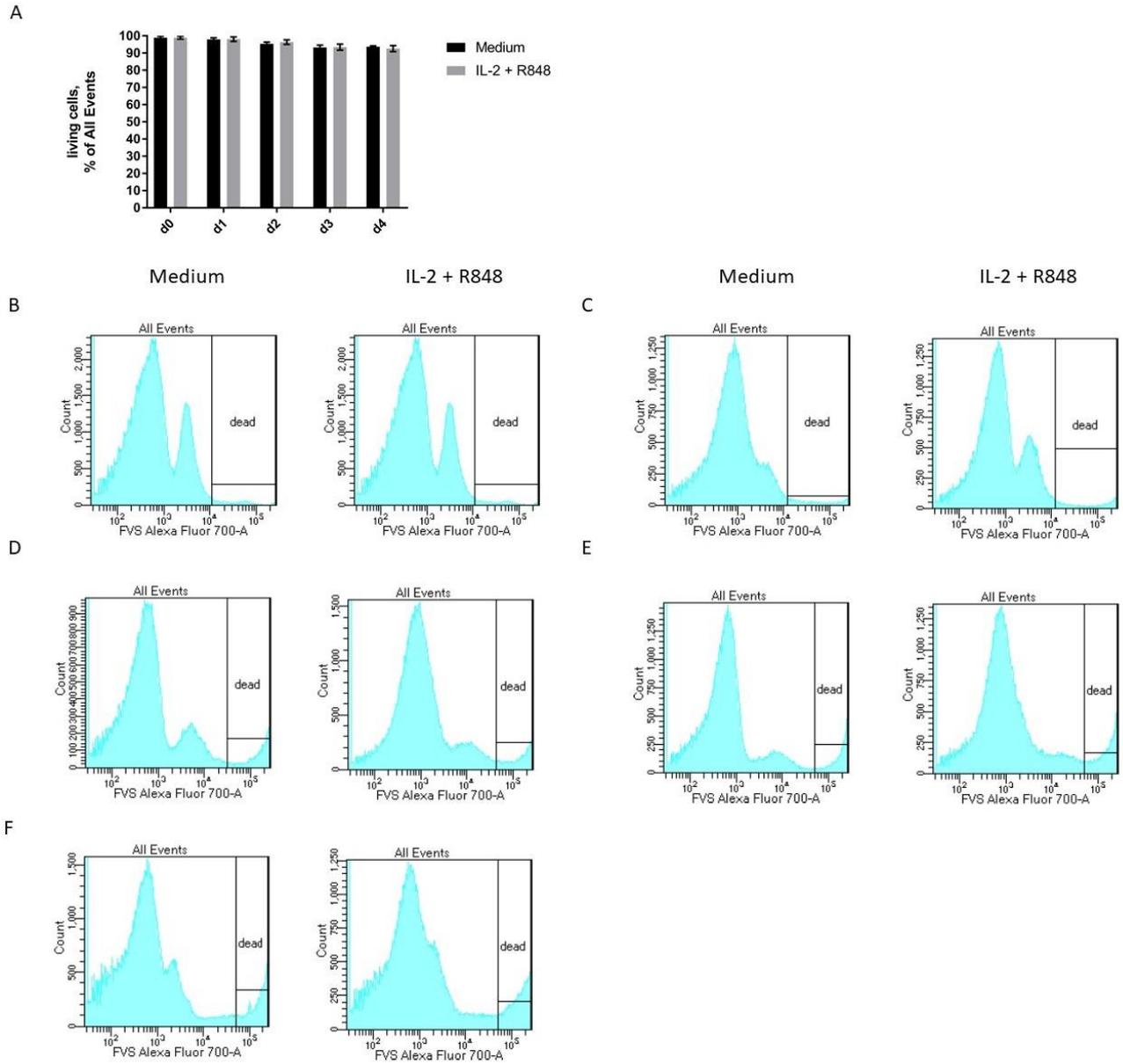


Abbildung 21: Vitalität der PBMC über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der lebenden PBMC aus allen Events unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. d0 entspricht der Baselinemessung, d1 nach 24h, d2 nach 48h, d3 nach 72h, d4 nach 96h. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s. **[B]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

5.4.2 Keine signifikanten Unterschiede in den T-Lymphozyten im Verlauf der Zeit und zwischen den Stimulationen

Anschließend wurde die Reaktion der T-Zellen auf Positiv- und Negativkontrolle untersucht. Dabei wurde aus zunächst der prozentuale Anteil der $CD3^+/CD19^-$ T-Lymphozyten an lebenden $CD45^+$ Leukozyten zwischen beiden Stimulationsansätzen. Gemessen wurde an den Zeitpunkten d0 als Baselinemessung, d1 nach 24h, d2 nach 48h, d3 nach 72h und d4 nach 96h. Es ergab sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied (Abb. 22).

Daraufhin erfolgte die Analyse der T-Lymphozyten Subpopulationen. Dabei zeigte sich in der statistischen Analyse (Abb.23) im Verlauf über vier Tage, weder bei den $CD4^+/CD8^-$ T Helfer Zellen, noch bei den $CD4^-/CD8^+$ zytotoxische T-Zellen ein signifikanter Unterschied der Negativ- und Positiv-Kontrolle.

Damit zeigte sich, dass der Anteil der T-Lymphozyten und ihrer Subpopulationen an den gemessenen Events über den Beobachtungszeitraum stabil blieb. Ebenfalls zeigten sie sich unabhängig von den verwendeten Stimulationen.

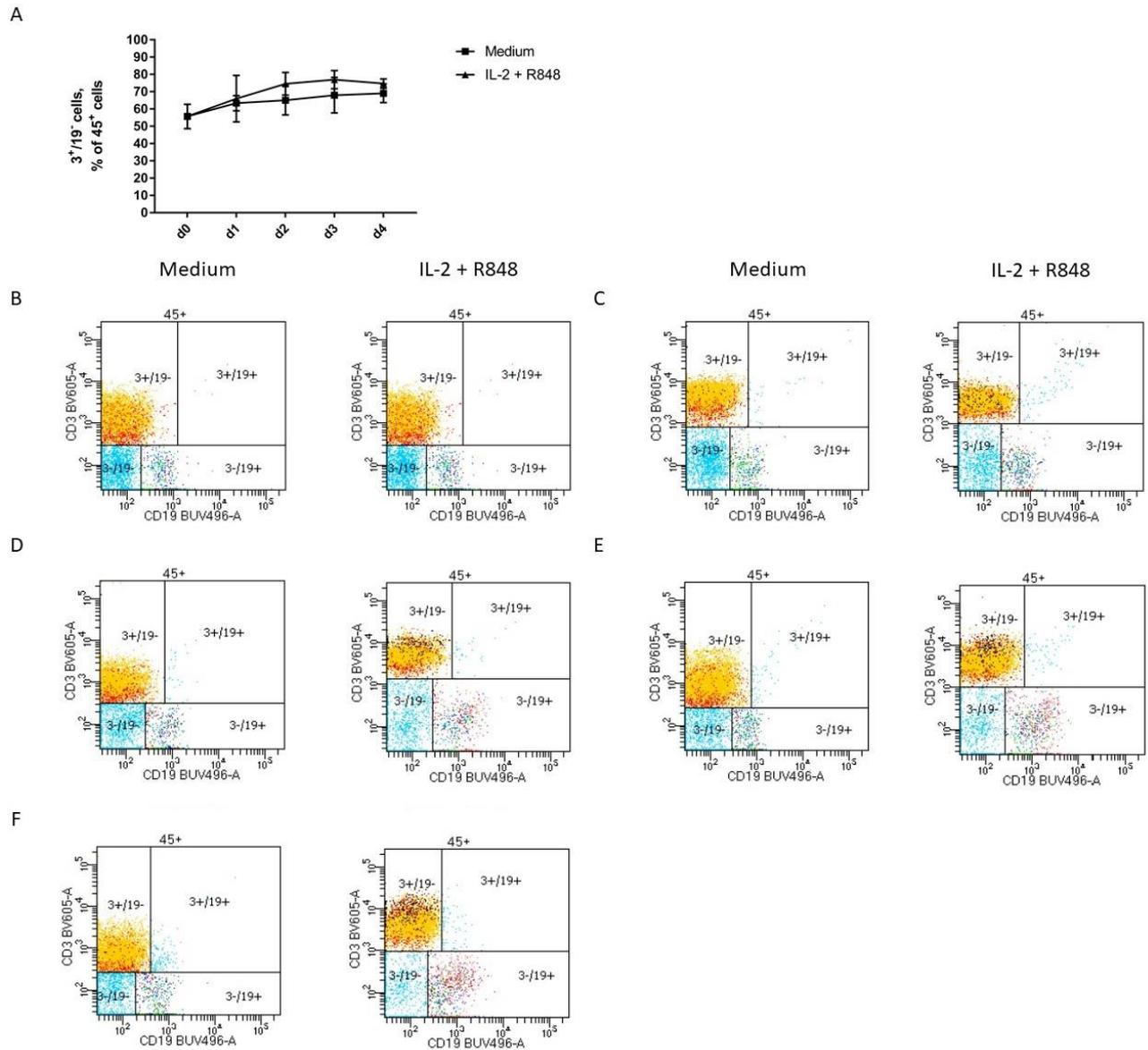


Abbildung 22: Veränderung der CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der CD3⁺/CD19⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. d0 entspricht der Baselinemessung, d1 nach 24h, d2 nach 48h, d3 nach 72h, d4 nach 96h. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s. **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

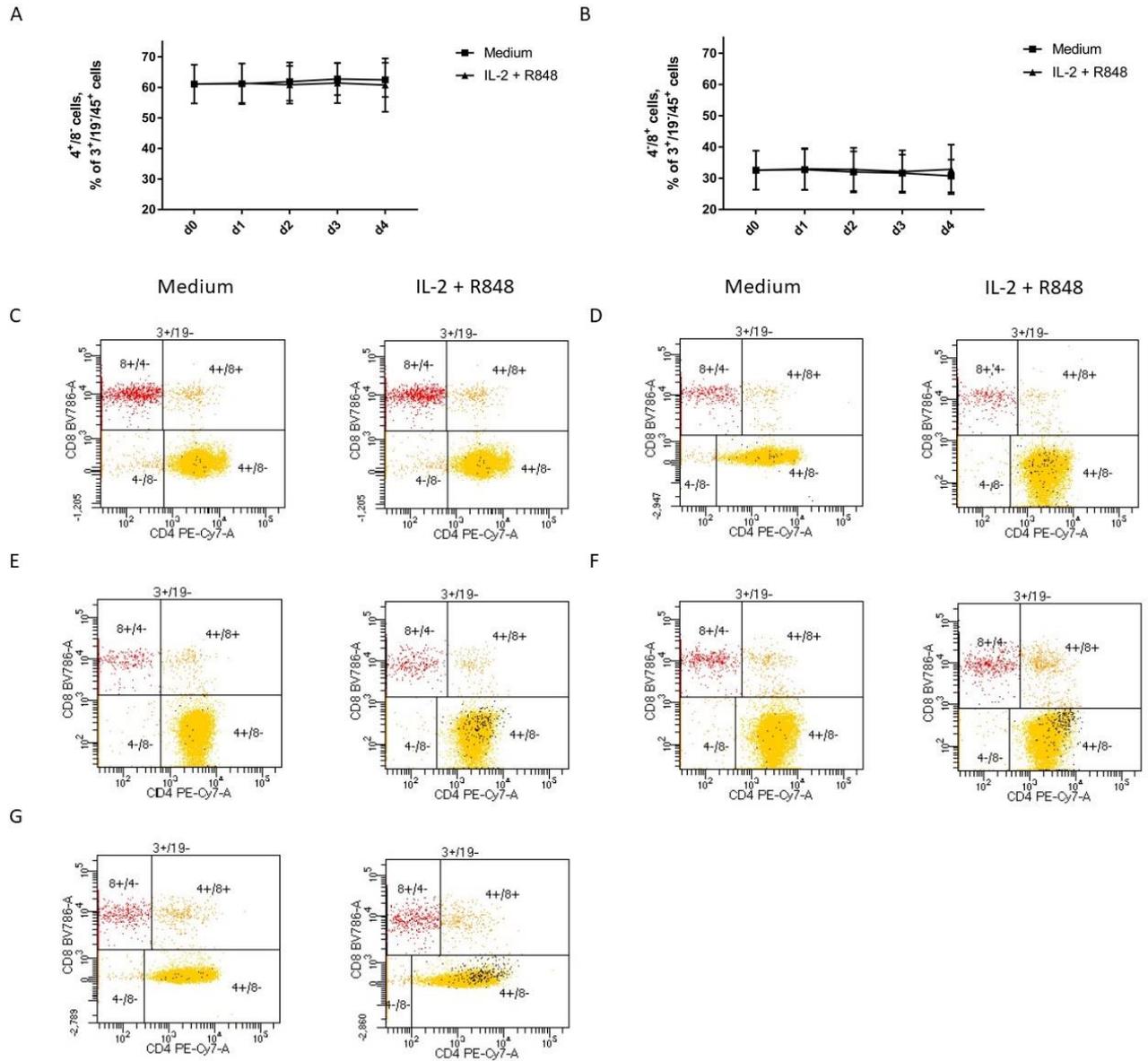


Abbildung 23: Veränderung der CD4⁺/CD8⁻ und CD4⁻/CD8⁺ T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s. **[B]:** % der CD4⁻/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s. **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4 **[G]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

5.4.3 Die B-Lymphozyten und ihre Subpopulation zeigen sich vom Faktor Zeit unabhängig, jedoch abhängig von der verwendeten Stimulation

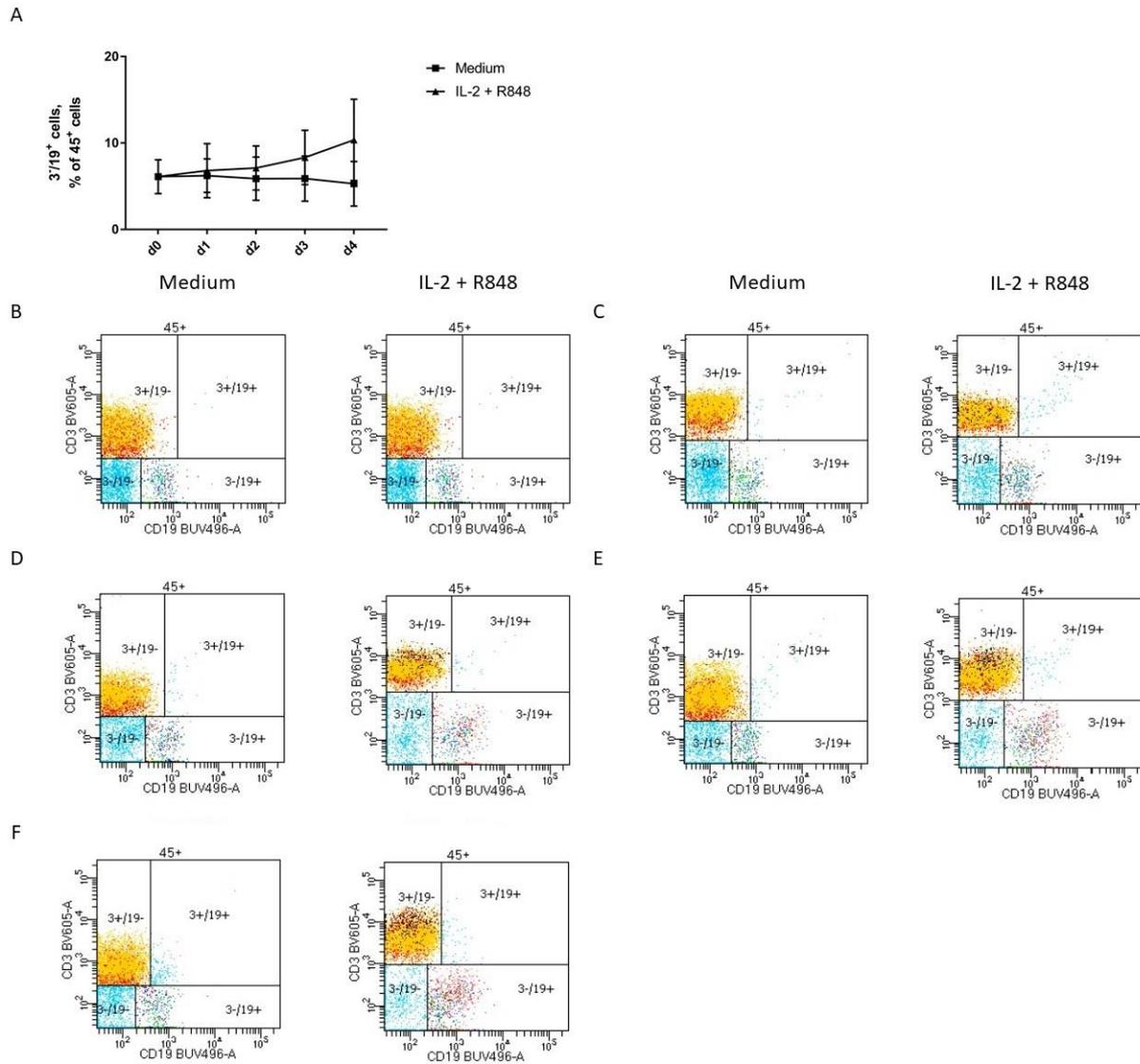


Abbildung 24: Veränderung der CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R848 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0-d3 n.s.; d4: n.s. bei p=0,1808 **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

Anschließend konnte mit der Analyse der B-Lymphozyten fortgefahren werden. Dazu wurden zunächst der prozentuale Anteil von CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten an lebenden CD45⁺ Leukozyten statistisch ausgewertet. Der Verlauf wurde über vier Tage beobachtet. Dabei entsprach d0 der Baselinemessung,

d1 nach 24h, d2 nach 48h, d3 nach 72h, d4 nach 96h. Es zeigte sich in der Stimulation mit Il-2 und R838 eine tendenzielle Erhöhung des Anteils ohne statistische Signifikanz an d4 ($p=0,1808$), während der Anteil im Medium in Bezug auf den Faktor Zeit stabil blieb (Abb. 24).

5.4.3.1 Subpopulationen der B-Lymphozyten

Daraufhin erfolgte die Analyse ausgewählter B-Lymphozyten Subpopulationen. Das Gating in der FACS-Analyse erfolgte wie bereits beschrieben.

5.4.3.1.1 Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen

Dabei zeigte sich bei Stimulation mit Il-2 und R848 beim prozentualen Anteil der $CD20^-/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten an lebenden $CD45^+/CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten im Verlauf über vier Tage eine zunehmende Erhöhung. Diese zeigte sich Vergleich zur Negativ-Kontrolle mit Medium an d2, d3 und d4 statistisch signifikant (Abb. 25).

Bei den als Plasmazellen bezeichneten $CD20^-/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^-$ B-Lymphozyten konnte jedoch keine statistisch signifikante Veränderung innerhalb des Beobachtungszeitraums gesehen werden (Abb. 25). Bei beiden Subpopulationen zeigte sich der Anteil im Medium zeitlich unabhängig.

5.4.3.1.2 Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells

Ebenso erfolgte die statistische Auswertung der Entwicklung der $CD45^+/CD3^-/CD19^+/CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-$ class switched B-Zellen. Bei diesen zeigte sich bei der Positiv-Kontrolle im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle keine statistisch signifikante Veränderung. Jedoch zeigte sich in der graphischen Darstellung eine Erhöhung des Anteils an lebenden B-Lymphozyten (Abb. 26).

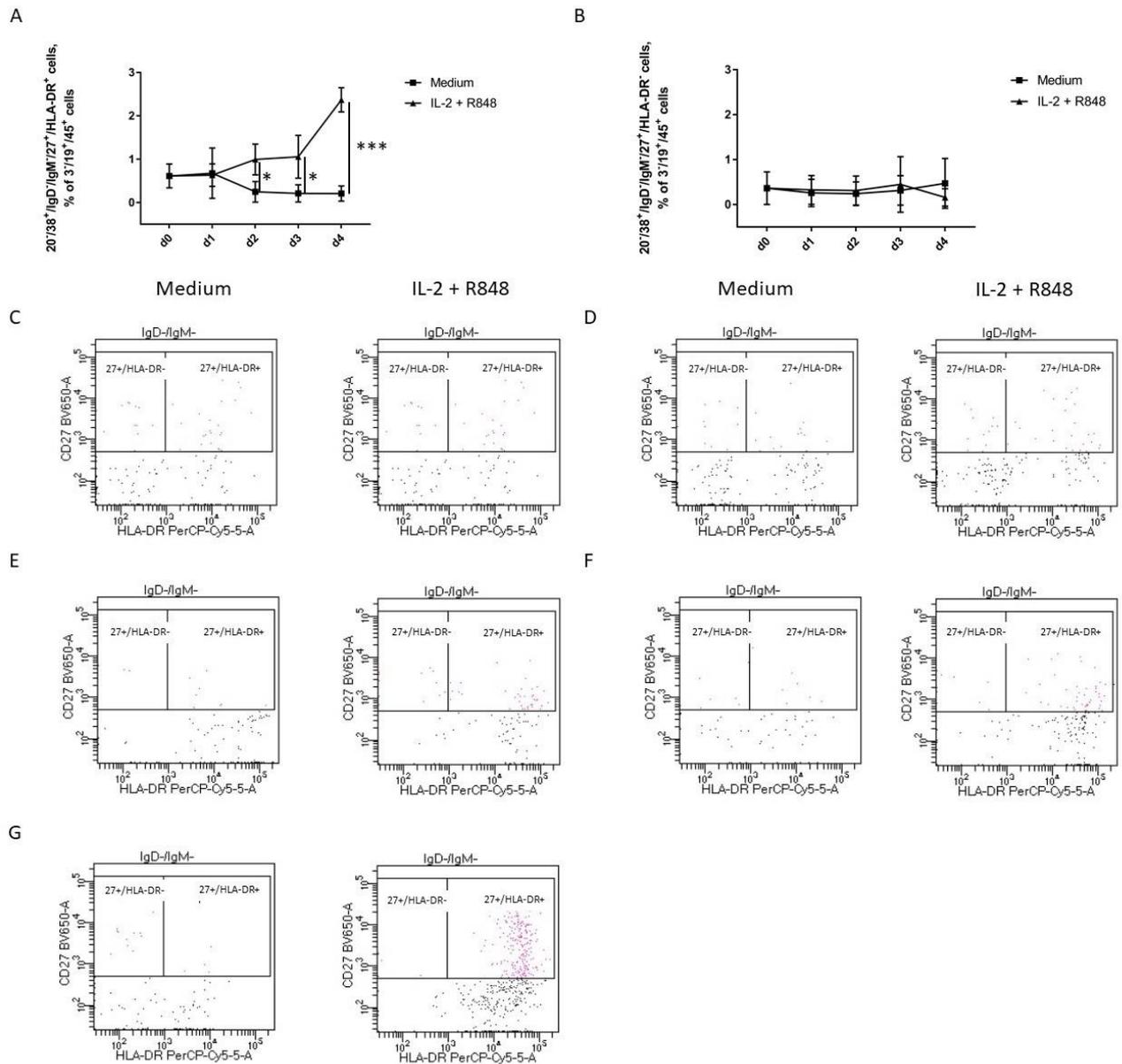


Abbildung 25: Veränderung Plasmablasten und Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmablasten an lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R848 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0: n.s.; d1: n.s.; d2: p<0,05; d3: p<0,05; d4: p<0,001. **[B]:** % der CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁻/HLA-DR⁻ Plasmazellen an lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R848 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s. **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[G]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

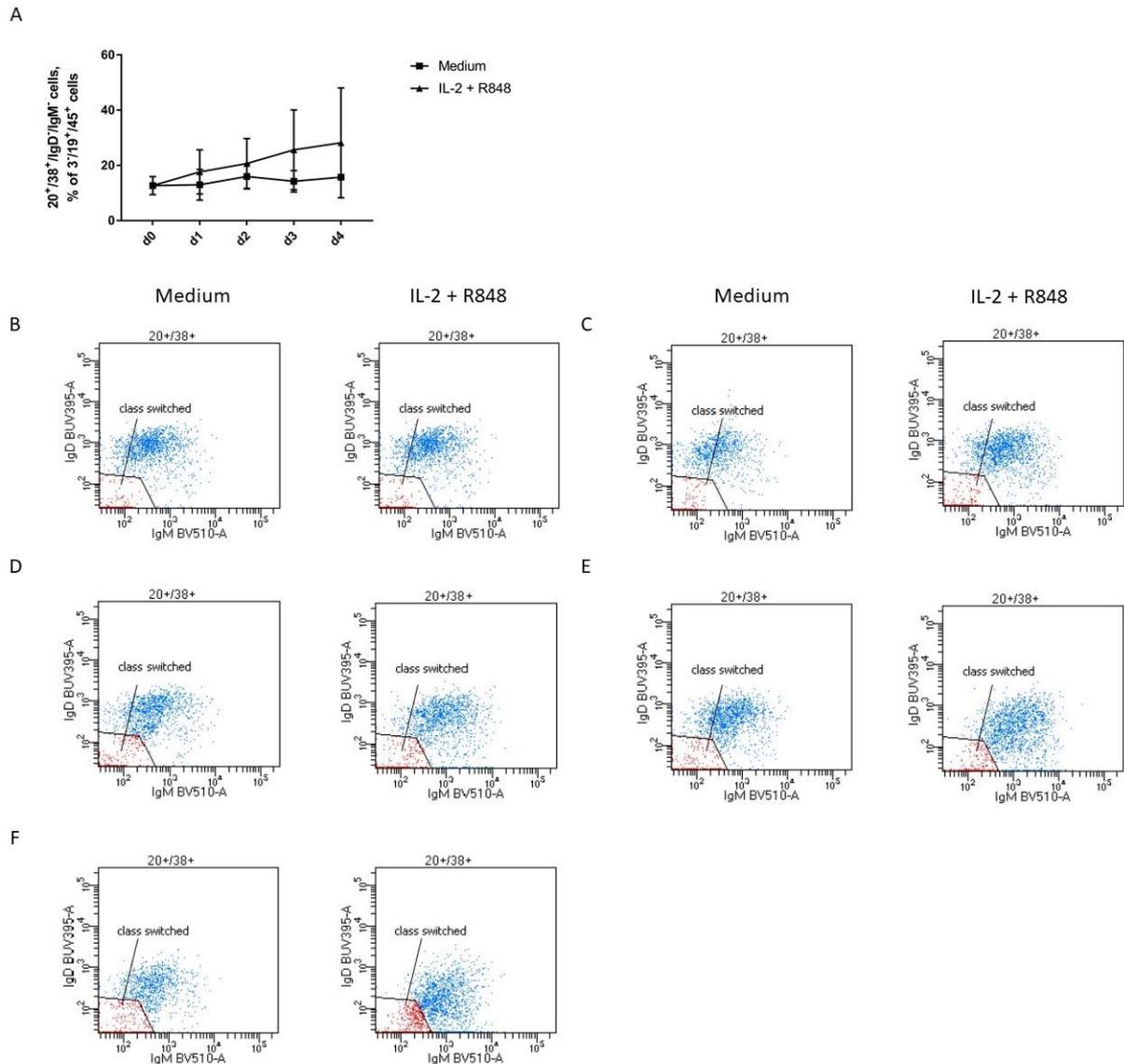


Abbildung 26: Veränderung der class switched B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der $CD20^+/CD38^+/IgD^+/IgM^-$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R848 ($n=3$) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium ($n=3$) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s. **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

5.4.3.1.3 B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells

Abschließend erfolgte die Auswertung der Veränderung im Kompartiment der B-Gedächtniszellen, um deren Abhängigkeit von Zeit und Stimulation bewerten zu können. Bei den $CD20^+/CD38^-$

/CD27^{Var}/CD40⁺/IgG^{Var}/IgD⁺ non class switched memory B Cells zeigte sich in der Positiv-Kontrolle eine Abnahme des Anteils an B-Lymphozyten. Diese war jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 27).

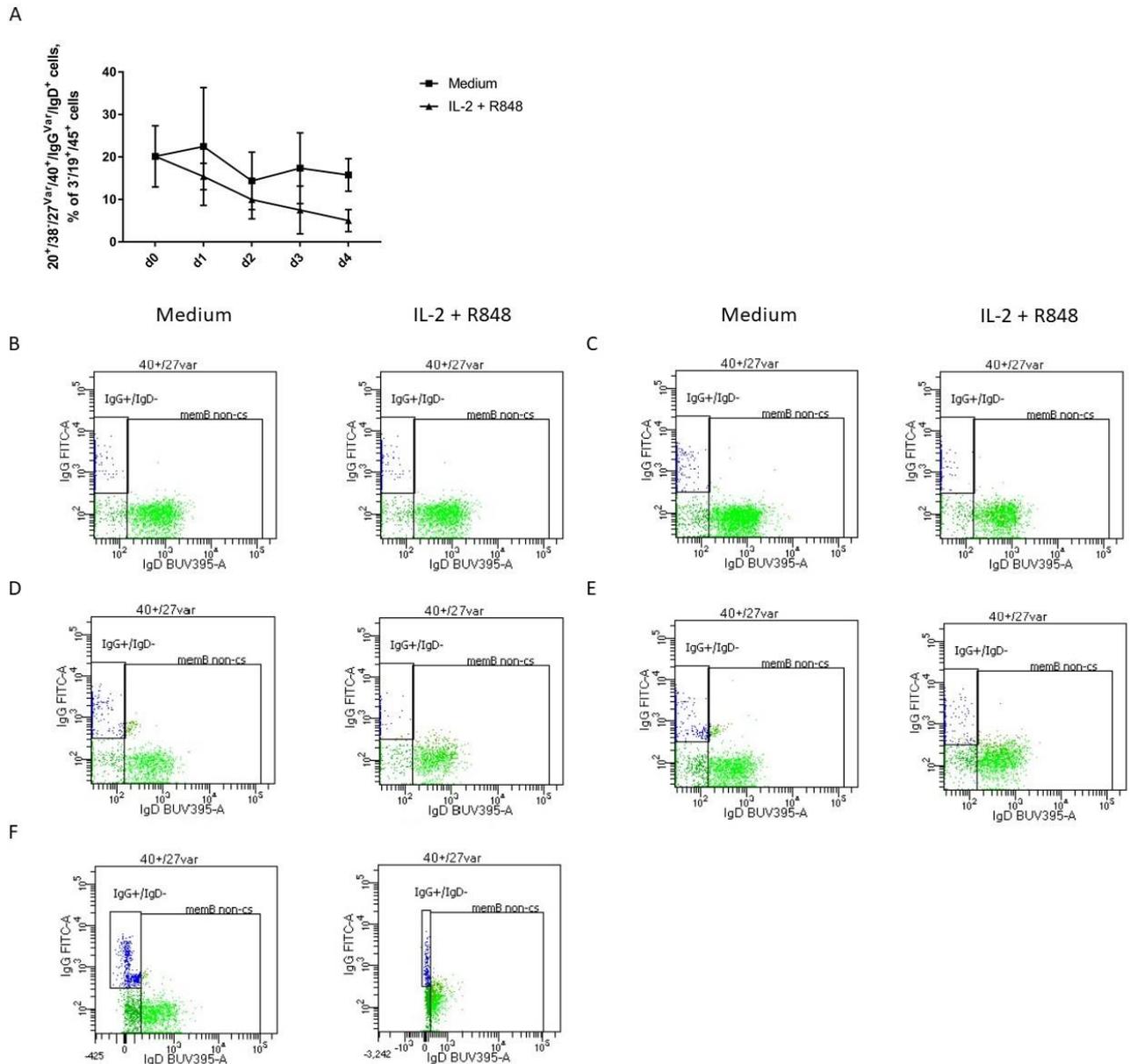
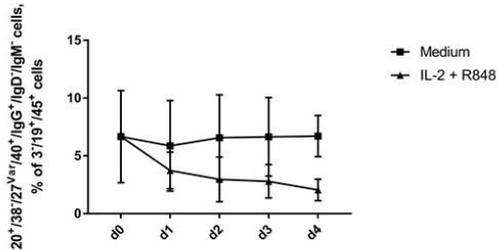


Abbildung 27: Veränderung der non class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

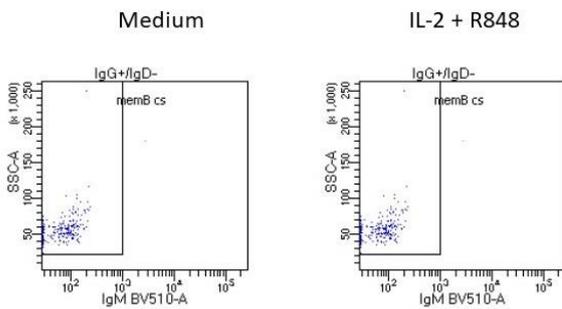
[A]: % der CD20⁺/CD38⁺/CD27^{Var}/CD40⁺/IgG^{Var}/IgD⁺ Zellen an lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

Ebenso zeigte sich bei den $CD20^+/CD38^-/CD27^{var}/CD40^+/IgG^+/IgD^-/IgM^-$ class switched memory B Cells eine Abnahme im Verlauf der vier Tage. Eine statistische Signifikanz konnte auch hier Vergleich der Negativkontrolle nicht beobachtet werden (Abb. 28).

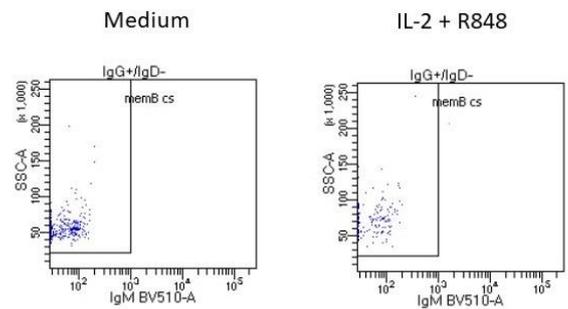
A



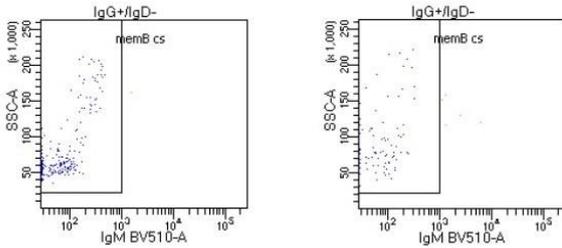
B



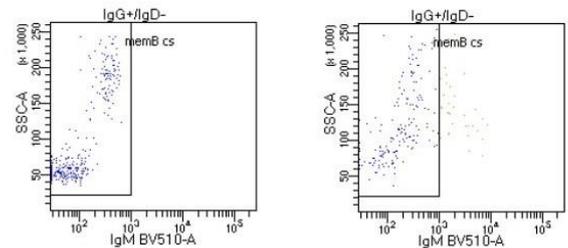
C



D



E



F

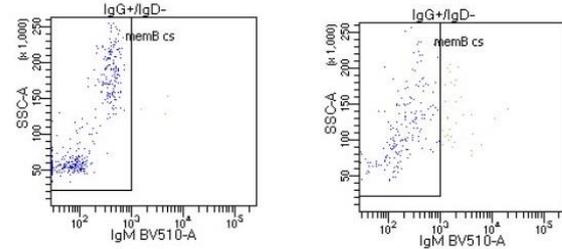


Abbildung 28: Veränderung der class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der $CD20^+/CD38^-/CD27^{var}/CD40^+/IgG^+/IgD^-/IgM^-$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s. **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

5.4.4 Funktioneller Assay zeigt eine intrazelluläre IFN- γ Produktion in allen Zellpopulationen

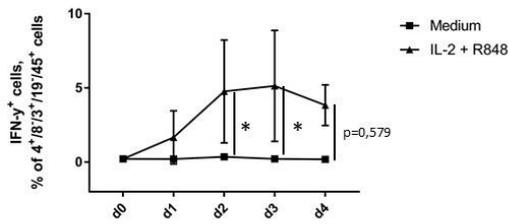
Als ein Marker der Aktivierung von Lymphozyten wurde das Zytokin IFN- γ etabliert. Zur Kontrolle der zellulären Funktionalität erfolgte in jeder Messung eine Positiv-Kontrolle der IFN- γ Produktion mit LAC und BD Golgiplug. Es gab fünf Messzeitpunkte: d0 entsprach der Baselinemessung, d1 nach 24h, d2 nach 48h, d3 nach 72h, d4 nach 96h.

5.4.4.1 Die IFN- γ Produktion wird in T-Lymphozyten Subpopulationen durch Stimulation mit Il-2 und R848 schon ab d1 gesteigert

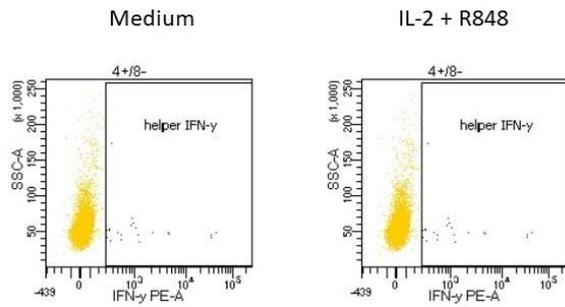
Zunächst erfolgte die Analyse von intrazellulärem IFN- γ in den T-Lymphozyten. Es zeigte sich, dass es in der Stimulation mit Il-2 und R848 zu einer Aktivierung der IFN- γ Produktion kam. In den CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten konnte eine statistisch signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils an IFN- γ ⁺ Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle an d2 und d3 beobachtet werden. Ein weiterhin tendenziell erhöhter Anteil ohne statistische Signifikanz zeigte sich auch an d4 ($p=0,0579$). Gleichzeitig zeigte sich im zeitlichen Verlauf in reinem Medium keine Veränderung (Abb. 29).

In den CD4⁻/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten war eine statistisch signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils an IFN- γ ⁺ Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle an d2, d3 und d4 zu sehen (Abb. 30).

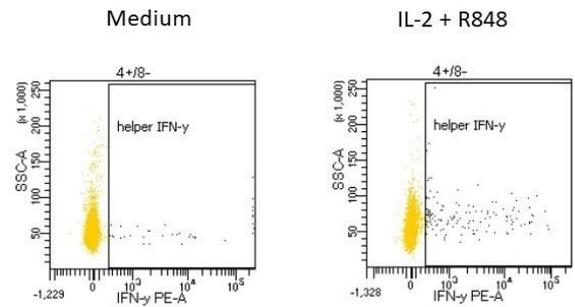
A



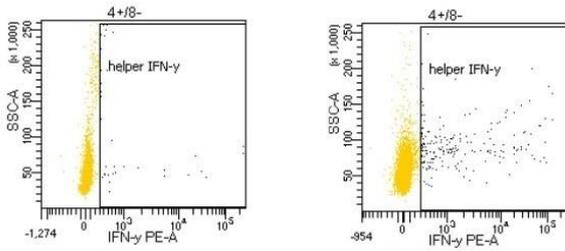
B



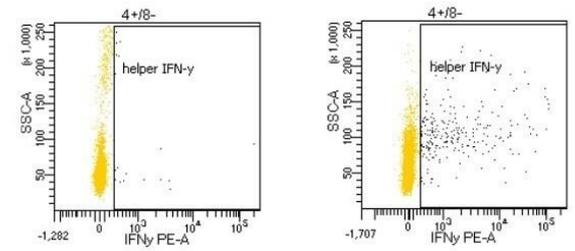
C



D



E



F

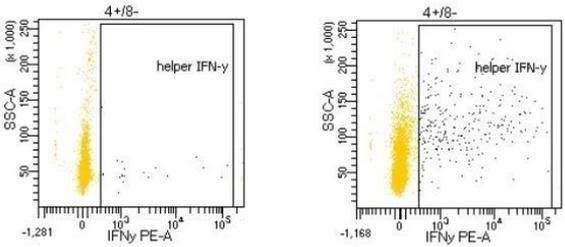
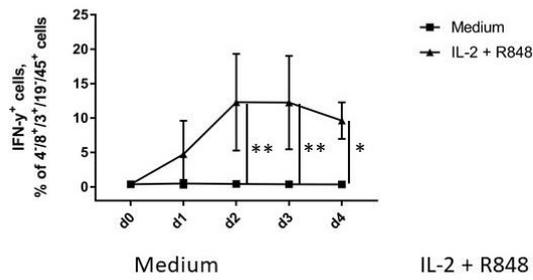


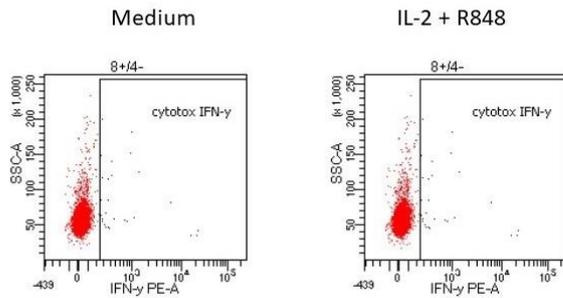
Abbildung 29: IFN- γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ Helfer T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0: n.s.; d1: n.s.; d2: p<0,05; d3: p<0,05; d4: n.s. bei p=0,0579 **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

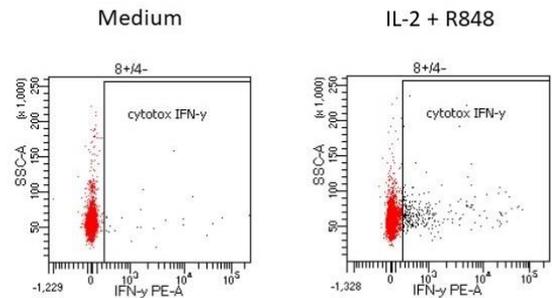
A



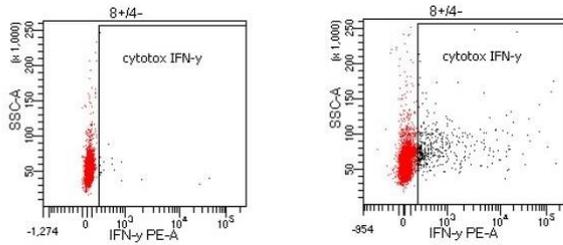
B



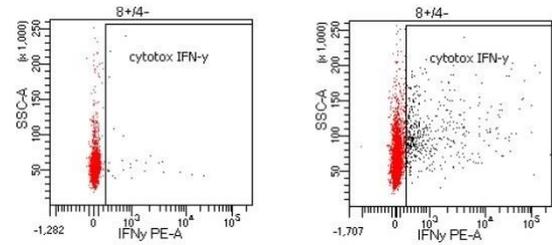
C



D



E



F

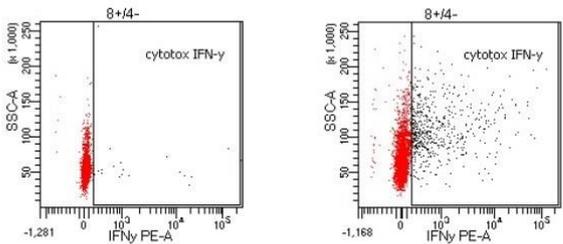


Abbildung 30: IFN- γ Produktion in CD4/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R848 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0: n.s.; d1: n.s.; d2: p=<0,001; d3: p=<0,001; d4: p=<0,05 **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

5.4.4.2 Die IFN- γ Produktion ist in B-Lymphozyten Subpopulationen ebenfalls stimulationsabhängig

Durch unsere intrazelluläre IFN- γ Färbung aller PBMC, konnte auch die Produktion von IFN- γ in den B-Lymphozyten und den bereits beschriebenen B-Zell Subpopulationen gemessen werden.

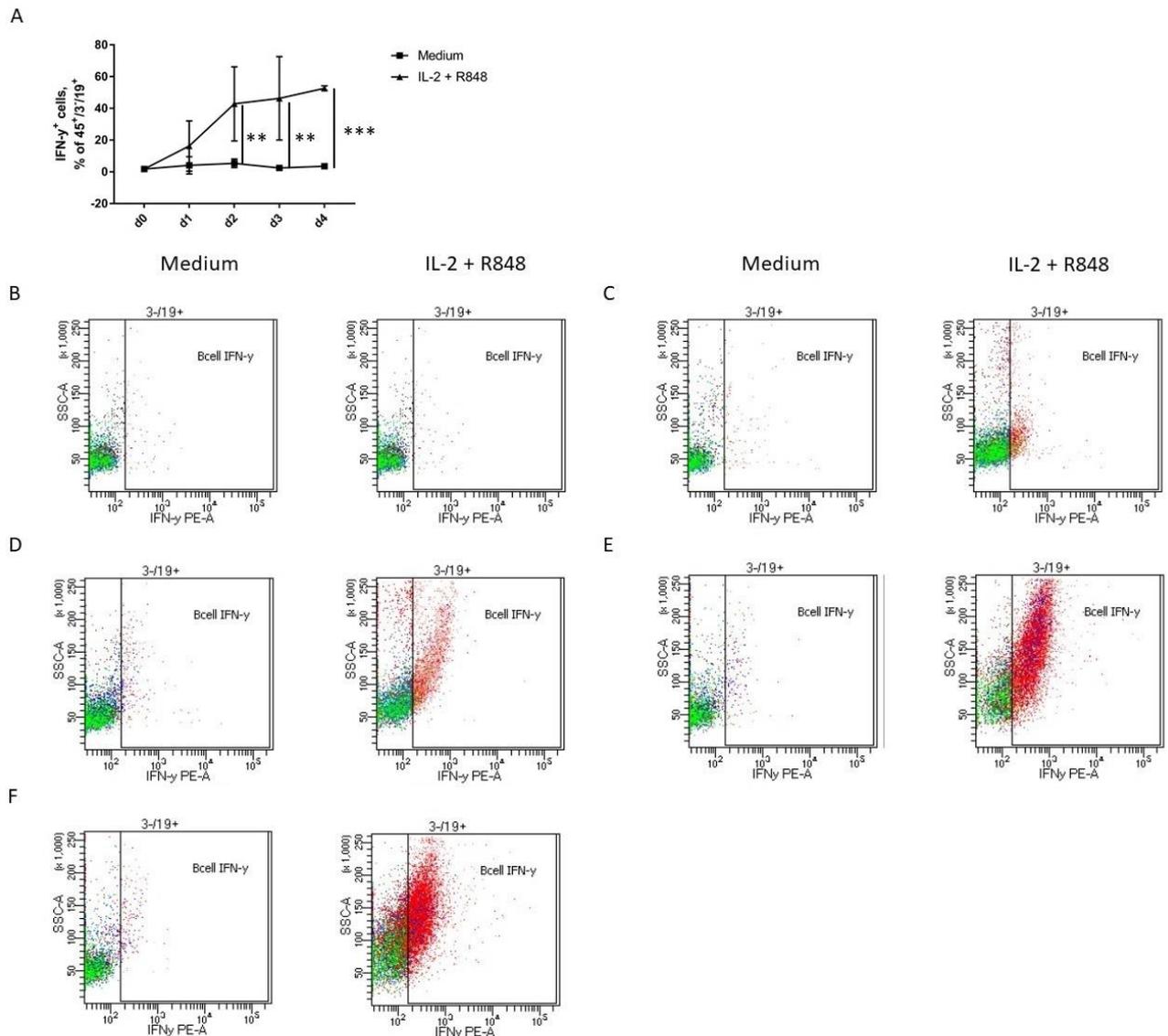


Abbildung 31: IFN- γ Produktion in CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0: n.s.; d1: n.s.; d2: p=<0,01; d3: p=<0,01; d4: p=<0,001 **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

Zunächst wurde der Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen an lebenden B-Lymphozyten statistisch analysiert. Dabei zeigte sich ein deutlich signifikanter Anstieg an intrazellulärem IFN- γ im Vergleich zu

Negativ-Kontrolle (Abb. 31). Analog zu den T-Lymphozyten wurden auch bei den B-Lymphozyten die Subpopulationen untersucht. Bei den Plasmablasten wurde ebenfalls ein Anstieg des intrazellulär messbaren IFN- γ beobachtet. Diese Erhöhung zeigte sich an d4 im Vergleich statistisch signifikant (Abb. 32).

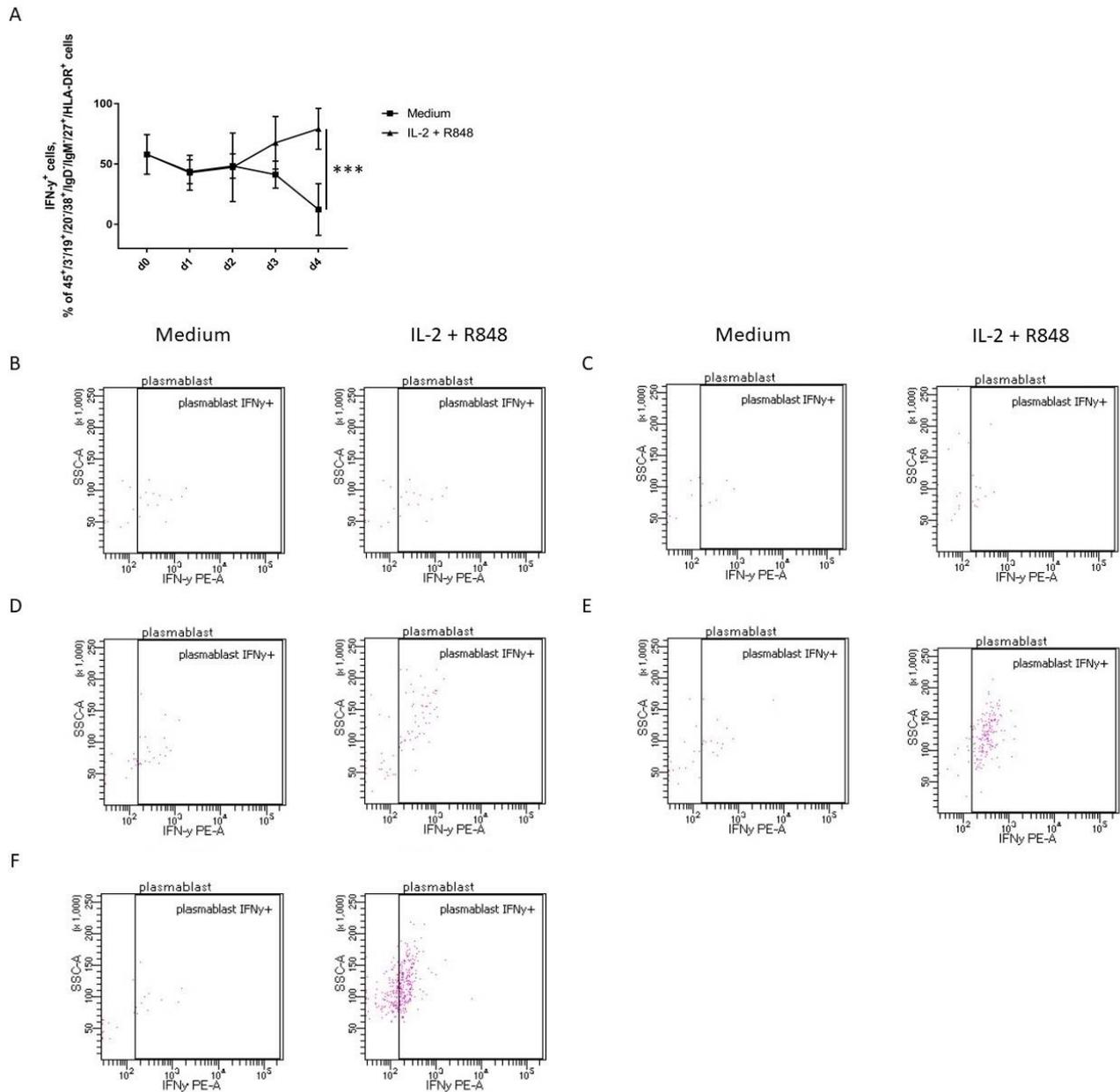


Abbildung 32: IFN- γ Produktion in Plasmablasten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁺/IgM⁺/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmablasten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R848 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0-d3: n.s.; d4: p<0,001 **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

Als ebenfalls antikörperproduzierende Subpopulation wurde das intrazelluläre IFN- γ auch bei den Plasmazellen ausgewertet. In der statistischen Bewertung konnte im Vergleich von Positiv- und Negativ-Kontrolle keine Signifikanz nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte nur eine sehr geringe Frequenz dieser B-Zellsubpopulation beobachtet werden, weshalb keine aussagekräftige Bewertung dieses Ergebnisses möglich ist. Eine Darstellung erfolgt jedoch im Sinne der Vollständigkeit (Abb. 33).

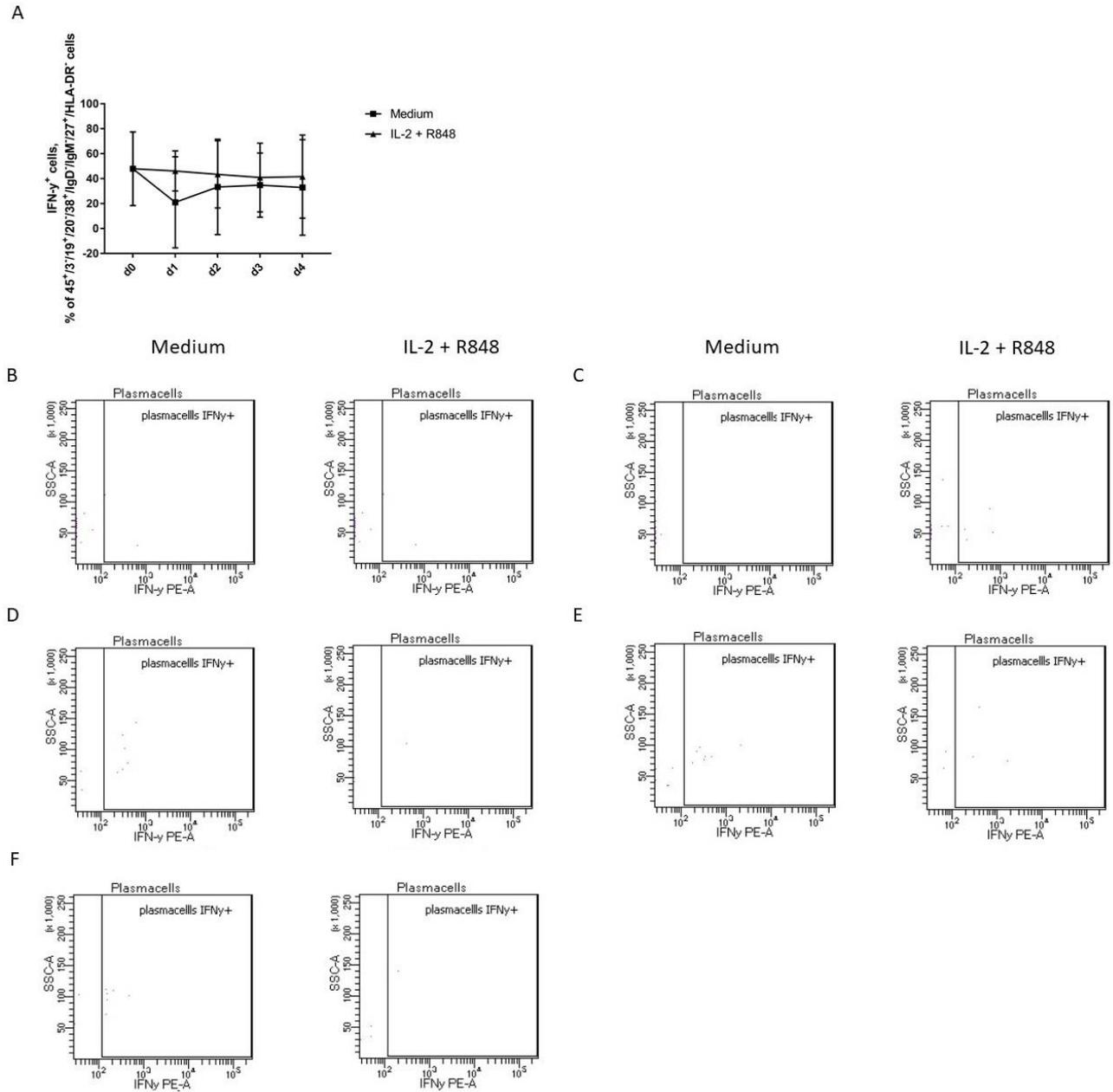


Abbildung 33: IFN- γ Produktion in Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁺/IgM⁺/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmazellenn unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit Il-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test an allen Messzeitpunkten n.s **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

Wie auch bei den B-Lymphozyten zeigte sich in der Subpopulation der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻ class switched B-Zellen eine deutliche Zunahme des intrazellulär messbaren IFN- γ . Diese zeigte sich an d2, d3 und am deutlichsten an d4 statistisch signifikant (Abb. 34).

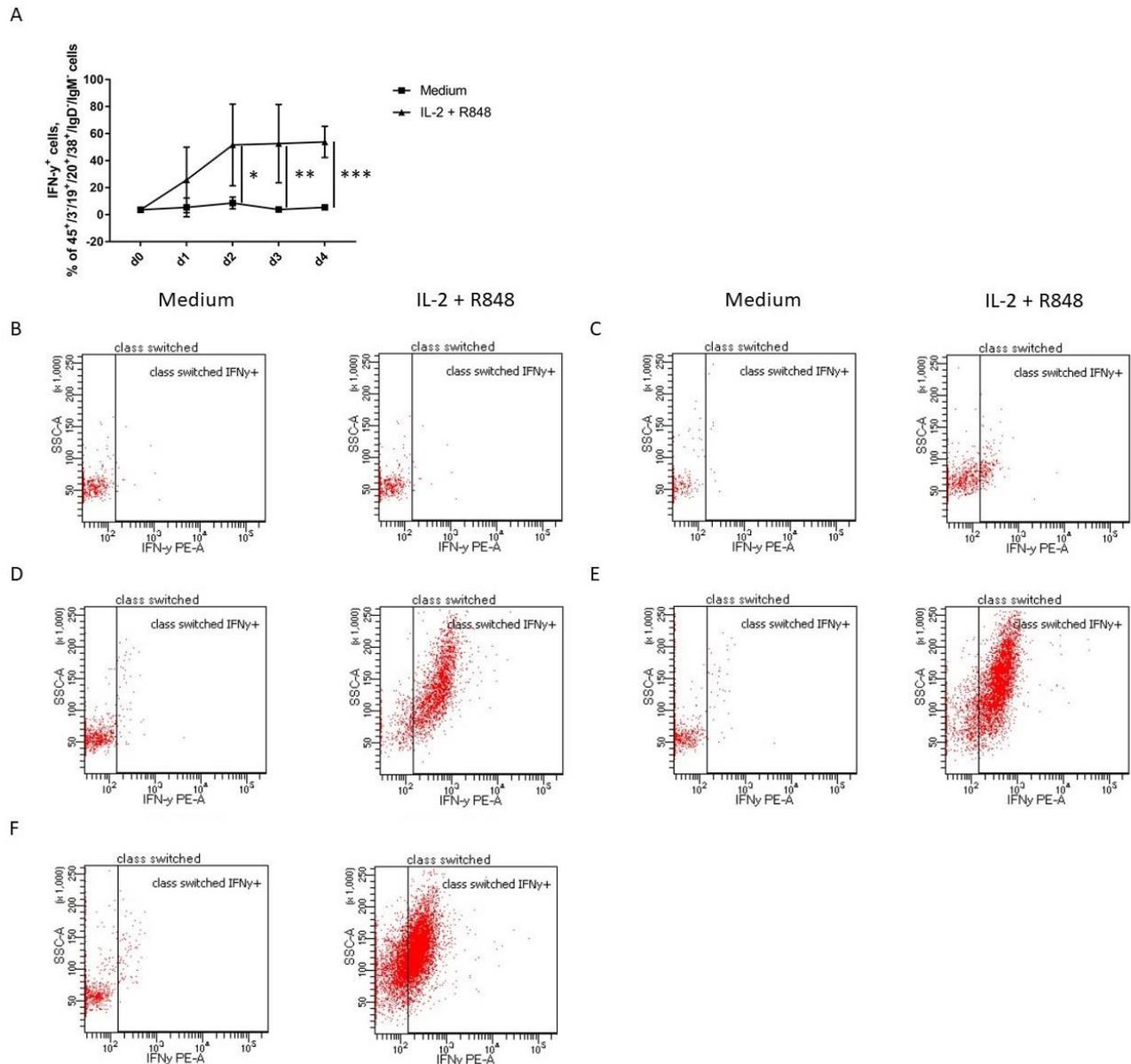


Abbildung 34: IFN- γ Produktion in class switched B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0: n.s.; d1: n.s.; d2: p<0,05.; d3: p<0,01; d4: p<0,001 **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

Bei den non class switched memory B-Zellen konnte in der Stimulation mit IL-2 und R848 ein schneller Anstieg der IFN- γ Produktion beobachtet werden, der an Tag 2 statistisch signifikant war, jedoch im Verlauf wieder auf ein nicht signifikantes Niveau absank (Abb. 35).

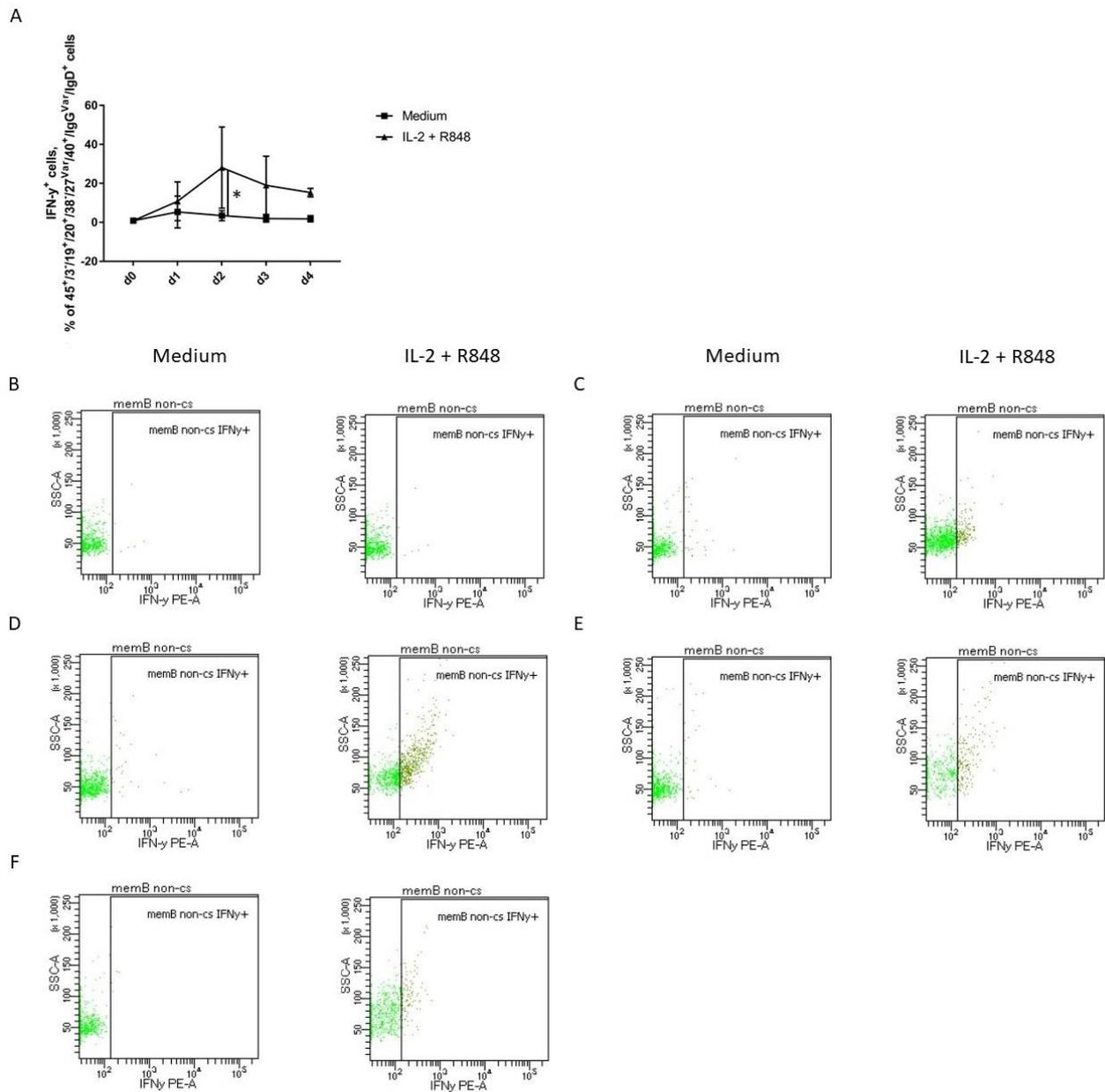


Abbildung 35: IFN- γ Produktion in non class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/CD27^{Var}/CD40⁺/IgG^{Var}/IgD⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R838 (n=3) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium (n=3) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0: n.s.; d1: n.s.; d2: p<0,05; d3: p=0,12; d4: n.s. **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

Ein ähnlicher Verlauf konnte bei den class switched memory B-Lymphozyten beobachtet werden. Dabei zeigte sich jedoch an keinem der Tage eine statistische Signifikanz im Vergleich von Negativ- und Positiv-Kontrolle. Eine Tendenz zeichnete sich jedoch an d2 ($p=0,0612$) und d3 ($p=0,0621$) ab (Abb. 36).

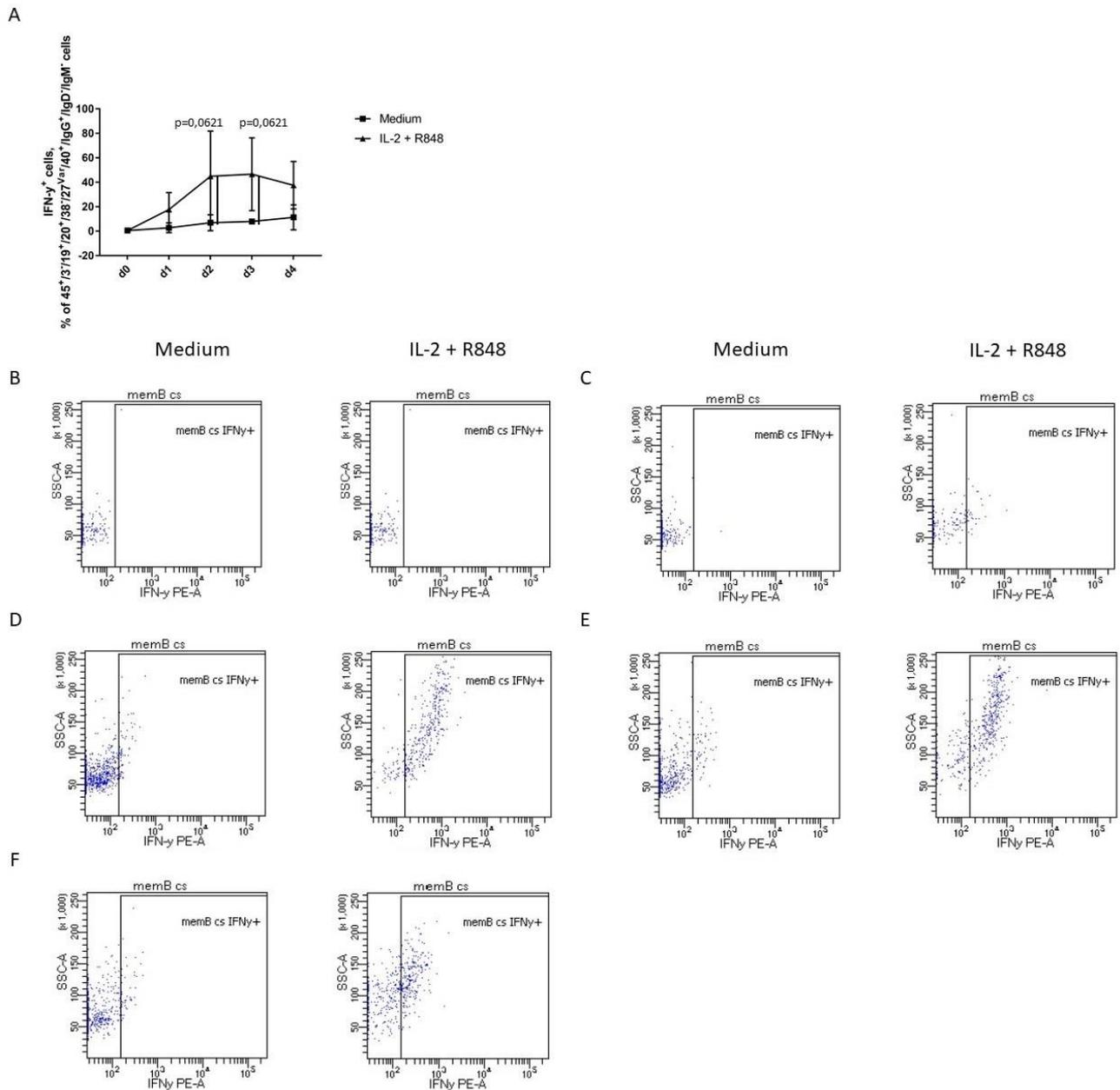


Abbildung 36: IFN- γ Produktion in class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848

[A]: % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+/CD20^+/CD38^+/CD27^{\text{var}}/CD40^+/IgG^+/IgD^+/IgM^-$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage mit Positiv-Kontrolle mit IL-2+R848 ($n=3$) vs. Negativ-Kontrolle mit Medium ($n=3$) dargestellt als Liniendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: d0: n.s.; d1: n.s.; d2: $p=0,0612$; d3: $p=0,0612$ d4: n.s. **[B]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d0 **[C]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d1 **[D]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d2 **[E]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d3 **[F]:** beispielhafter Dotplot der Positiv- und Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4

5.5 Antigen-spezifische Stimulation der PBMC

5.5.1 Stimulation mit Engerix-B führt zu einem konzentrationsabhängigen Zelluntergang

Nachdem die Ergebnisse der Timeshift-Experimente gezeigt haben, dass die Messungen an Tag 0 und Tag 4 stattfinden sollten, wurde mit den antigen-spezifischen Stimulationen begonnen. Zunächst wurde, wie im vorherigen ELISpot Versuchsaufbau die Stimulation mit dem Hepatitis B Impfstoff Engerix-B durchgeführt. Dieser enthielt neben dem HBs-Antigen Aluminiumhydroxid als Adjuvans. Als Konzentrationen des Stimulans wurden 2 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$ HBs-Antigen eingesetzt. Hierunter zeigte sich bei Zellzählung mit Trypanblau und einer initialen Messung an Tag 0 eine gute Vitalität von 92,41% der lebenden Zellen an allen aufgezeichneten Events. Bei der FACS-Analyse an Tag 4 (Abb. 37B-D) zeigte sich jedoch eine deutliche Abnahme der lebenden Zellen bei zunehmender Menge an zugegebenem Impfstoff. Die statistische Auswertung zeigte aufgrund der geringen Datenmenge keine statistisch signifikante Korrelation (Abb. 37A). Auf eine weitere statistische Analyse der Differenzierung der Subpopulationen wurde aufgrund einer fehlenden Aussagekraft bezüglich unserer Fragestellung verzichtet.

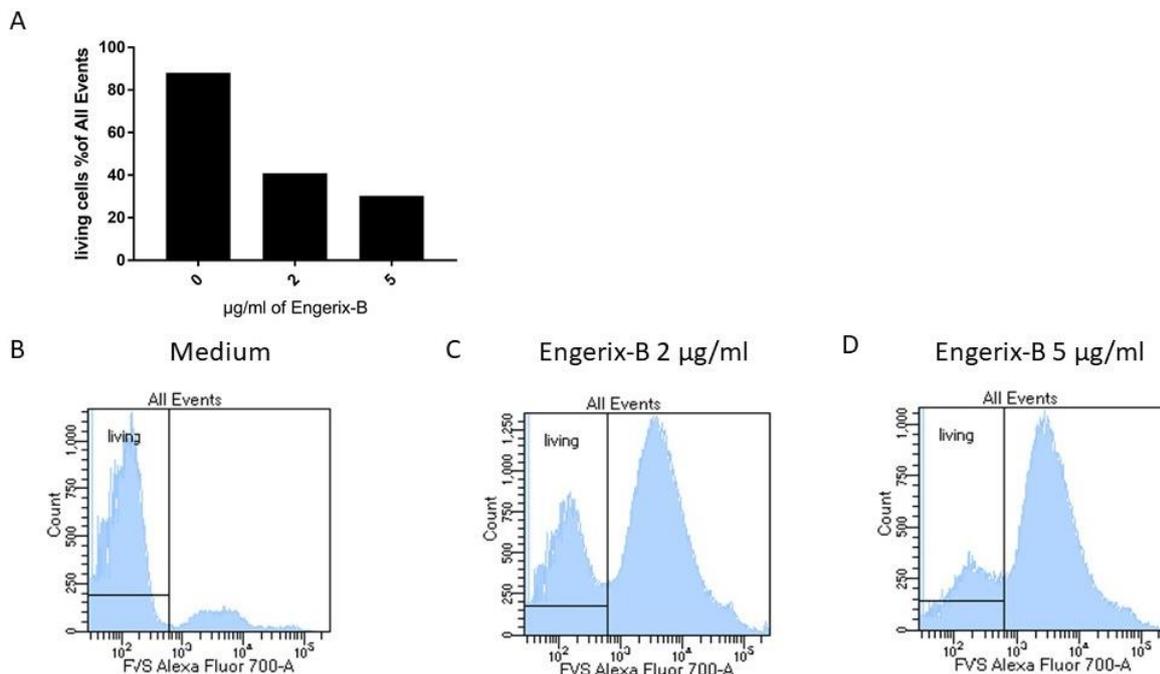


Abbildung 37: Vitalität der PBMC nach 4 Tagen Inkubation mit Engerix-B in verschiedenen Konzentrationen

[A]: % der lebenden PBMC aus allen Events nach Stimulation mit Medium/0 $\mu\text{g/ml}$ Engerix-B ($n=1$) vs. 2 $\mu\text{g/ml}$ Engerix-B ($n=1$) vs. 5 $\mu\text{g/ml}$ Engerix-B ($n=1$), dargestellt als Balkendiagramm, Spearman-Korrelation n.s. **[B]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung bei 0 $\mu\text{g/ml}$ Engerix-B **[C]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung bei 2 $\mu\text{g/ml}$ Engerix-B **[D]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung bei 5 $\mu\text{g/ml}$ Engerix-B

Dieser Zelluntergang war nicht auf eine oder wenige Subpopulation im Sinne einer Zellerschöpfung einzugrenzen. Ebenso waren diese Ergebnisse nicht mit den vorherigen Untersuchungen zur Zellvitalität in Einklang zu bringen. Daraus folgerten wir, dass die Stimulation mit Engerix B zur verringerten Zellvitalität an Tag 4 geführt hatte.

5.5.2 Adjuvansfreies HBs-Antigen führt in vivo zu einer antigenspezifischen Stimulation der PBMC

5.5.2.1 Verbesserung der Vitalität unter adjuvansfreiem HBs-Antigen

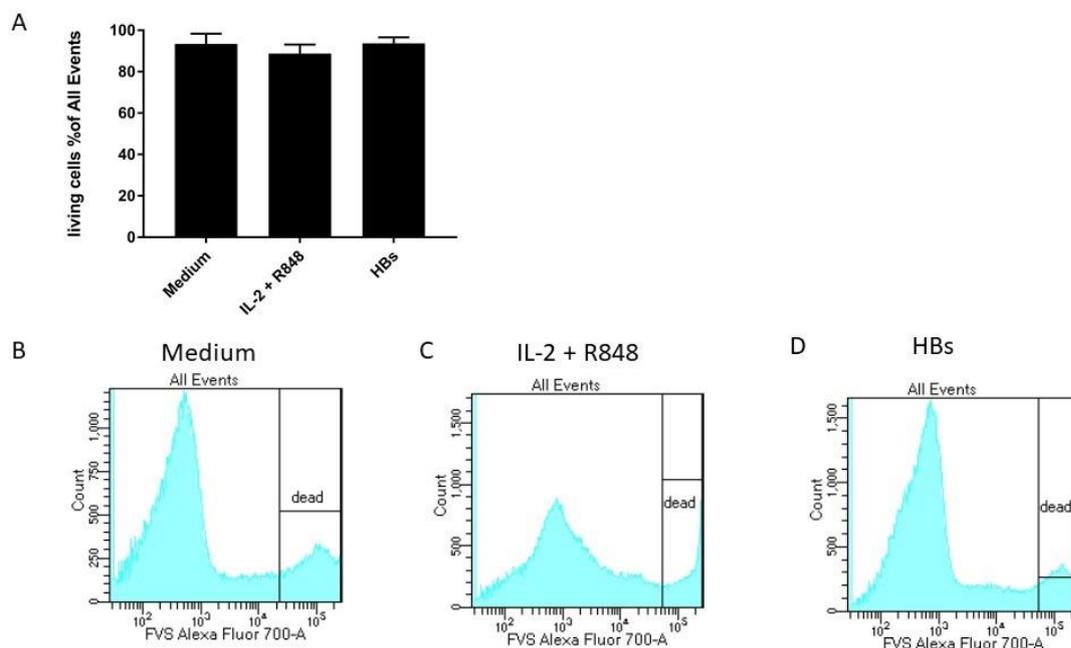


Abbildung 38: Vitalität der PBMC nach 4 Tagen Inkubation und Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der lebenden PBMC aus allen Events nach Stimulation, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung, Wilcoxon-Rank Test n.s. **[B]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der Negativ-Kontrolle **[C]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der Positiv-Kontrolle **[D]:** beispielhaftes FACS-Histogramm der FVS-Färbung der HBs-Stimulation

Aufgrund der Auswertung des Engerix-B Stimulationsversuche mussten wir unsere HBs-Stimulation verändern. Als wahrscheinlichster Störfaktor in der Inkubation wurde das Adjuvans Aluminiumhydroxid aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften gesehen. Aufgrund dieser Annahme wurde, wie zuvor in anderen Publikationen, adjuvansfreies HBs-Antigen in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. (Bauer et al. 2006)

Hierunter zeigte sich bei allen weiteren Untersuchungen im FACS-Histogramm von FVS (Abb. 38B-D) eine sehr hohe Vitalität der Zellen nach 4 Tagen. Bei der statistischen Auswertung (Abb. 38A) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Positiv-, Negativ-Kontrolle und HBs-Stimulation.

Nachdem sich in der Zellvitalität eine deutliche Verbesserung des Überlebens der PBMC zeigte, konnte mit der Untersuchung der Lymphozyten begonnen werden. Dabei wurde am Zeitpunkt d0 eine Baselinemessung in Medium durchgeführt. Anschließend wurde wie bereits beschrieben mit Negativ-, Positiv-Kontrolle und der Stimulation mit HBs-Antigen begonnen und die zellulären Veränderungen an d4 nach 96h mittels FACS analysiert. (s. Materialien und Methoden)

5.5.2.2 Analyse der stimulierten T-Lymphozyten

Zunächst wurde die Reaktion der T-Zellen auf Positiv-Kontrolle und HBs-Antigen untersucht. Dabei wurden die Zellpopulationen wie beschrieben gegatet, um diese anschließend statistisch zu analysieren. In der allgemeinen T-Zell Population zeigte sich im Verlauf der viertägigen Stimulation in der HBs Stimulation keine statistisch signifikante Veränderung des Anteils der CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten an lebenden CD45⁺ Zellen. Andererseits zeigte sich jedoch in der Positiv-Kontrolle eine signifikante Erhöhung des Anteils der T-Lymphozyten (Abb. 39).

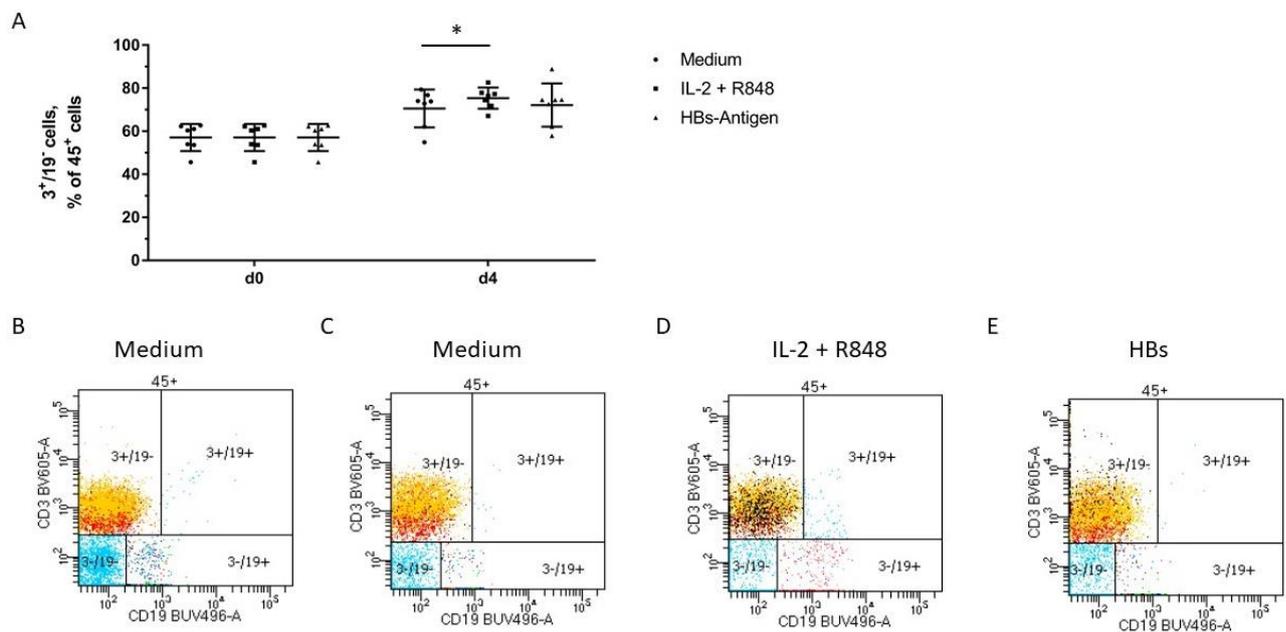


Abbildung 39: Population der CD3⁺/CD19⁻ T-Zellen nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05 **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

5.5.2.2.1 CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen der T-Lymphozyten

Anschließend erfolgte die Analyse der T-Lymphozyten Subpopulationen. Dabei zeigte sich in der statistischen Analyse im Verlauf über vier Tage, weder bei den CD4⁺/CD8⁺ T Helfer Zellen (Abb. 40), noch bei den CD4⁺/CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Abb. 41) ein signifikanter Unterschied der drei Stimulationen. Diese Beobachtung war bereits mit geringerer Testpopulation im Timeshift-Experiment zu machen.

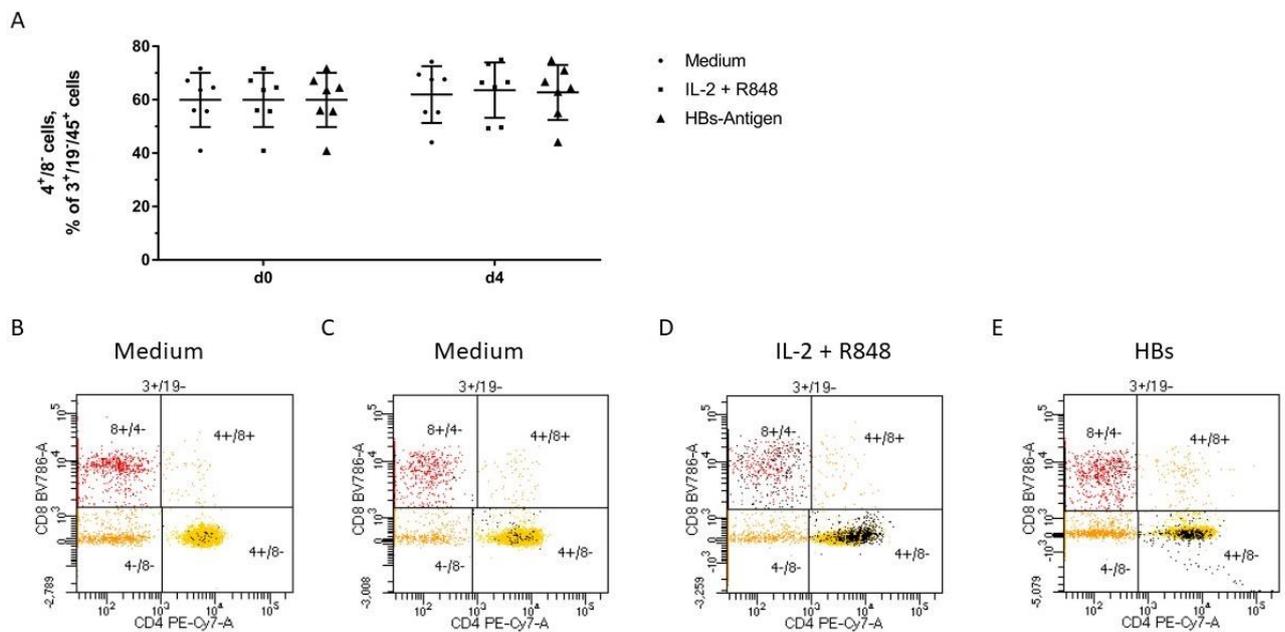


Abbildung 40: Veränderung der CD4⁺/CD8⁺ T-Helfer Lymphozyten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

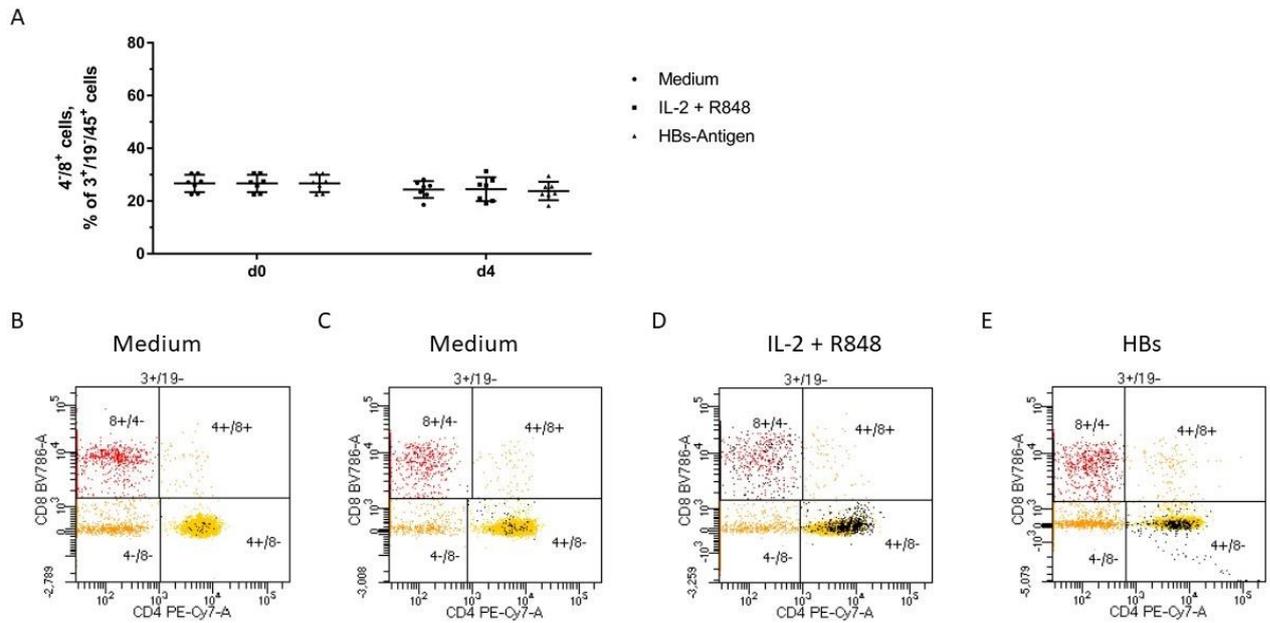


Abbildung 41: Veränderung der CD4⁺/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

Folglich zeigten sich in der antigenspezifischen Stimulation der T-Lymphozyten ähnliche Ergebnisse wie bereits im Timeshift-Experiment. Zwischen den beiden Stimulationen konnte bei keiner T-Zell Population ein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden.

5.5.2.3 Nach Stimulation mit IL-2 und R848 können vermehrt B-Lymphozyten gemessen werden

Anschließend konnte mit der Analyse der B-Lymphozyten fortgefahren werden. Dazu wurden zunächst der prozentuale Anteil von CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten an lebenden CD45⁺ Leukozyten statistisch ausgewertet. Dabei entsprach ebenso d0 der Baselinemessung und d4 nach 96h. In der Stimulation mit HBs-Antigen konnte eine tendenzielle Erhöhung dieses Anteils ohne statistische Signifikanz beobachtet werden (p=0,1094). In der Stimulation mit IL-2 und R838 konnte bereits im Timeshift-Experiment eine tendenzielle Erhöhung gesehen werden. Diese Erhöhung zeigte sich nun mit größerer Testpopulation statistisch signifikant (Abb. 42).

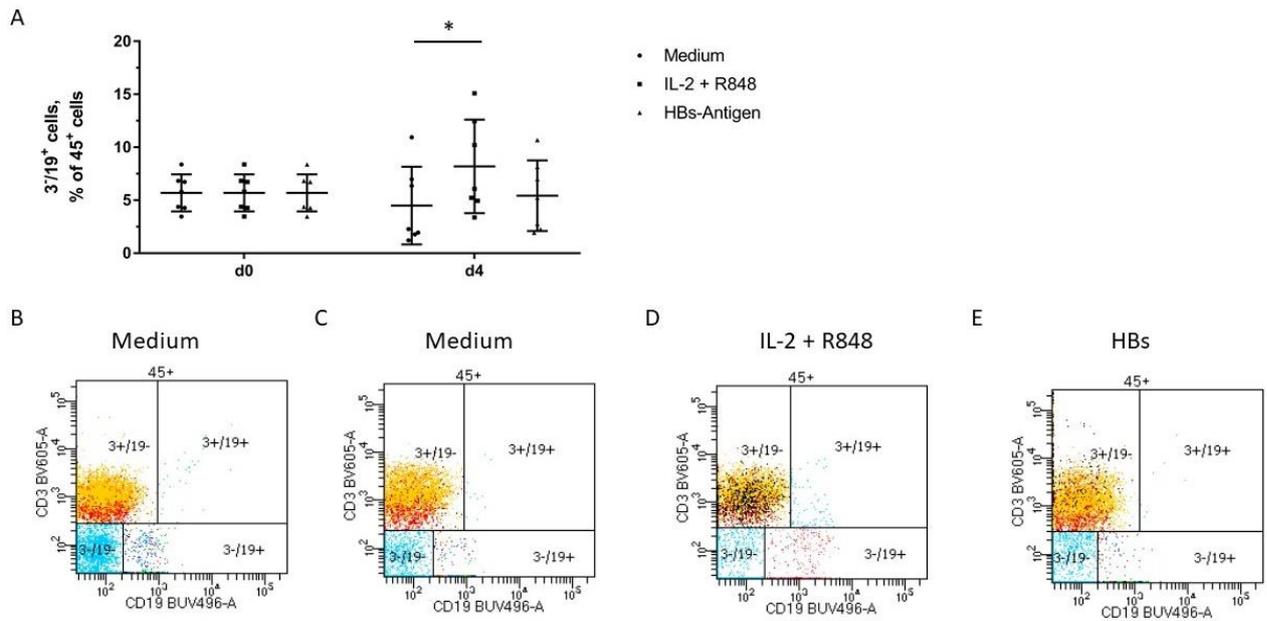


Abbildung 42: Veränderung der CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium p=0,1094, IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05 **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

5.5.2.3.1 Die beobachteten Subpopulationen der B-Lymphozyten reagieren auf die antigenspezifische Stimulation

Zur Identifizierung der antigenspezifischen memory B-Zellen und deren Differenzierung zu antikörperproduzierenden Zellen unter Stimulation, wurden anschließend die ausgewählten Subpopulationen der B-Lymphozyten analysiert. Das Gating in der FACS-Analyse erfolgte wie bereits beschrieben.

5.5.2.3.1.1 Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen

Dabei zeigte sich bei Stimulation mit HBs-Antigen beim prozentualen Anteil der CD20⁻/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmablasten an lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten im Verlauf über vier Tage eine zunehmende Erhöhung. Diese war im Vergleich zur Negativ-Kontrolle statistisch signifikant. Ebenso war der Vergleich der Negativ- und Positiv-Kontrolle signifikant (Abb. 43).

Bei den Plasmazellen, die durch ihre Antigene CD20⁻/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁺/HLA-DR⁻ aus den B-Lymphozyten gegatet wurden, zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Veränderung innerhalb des Beobachtungszeitraums (Abb. 44).

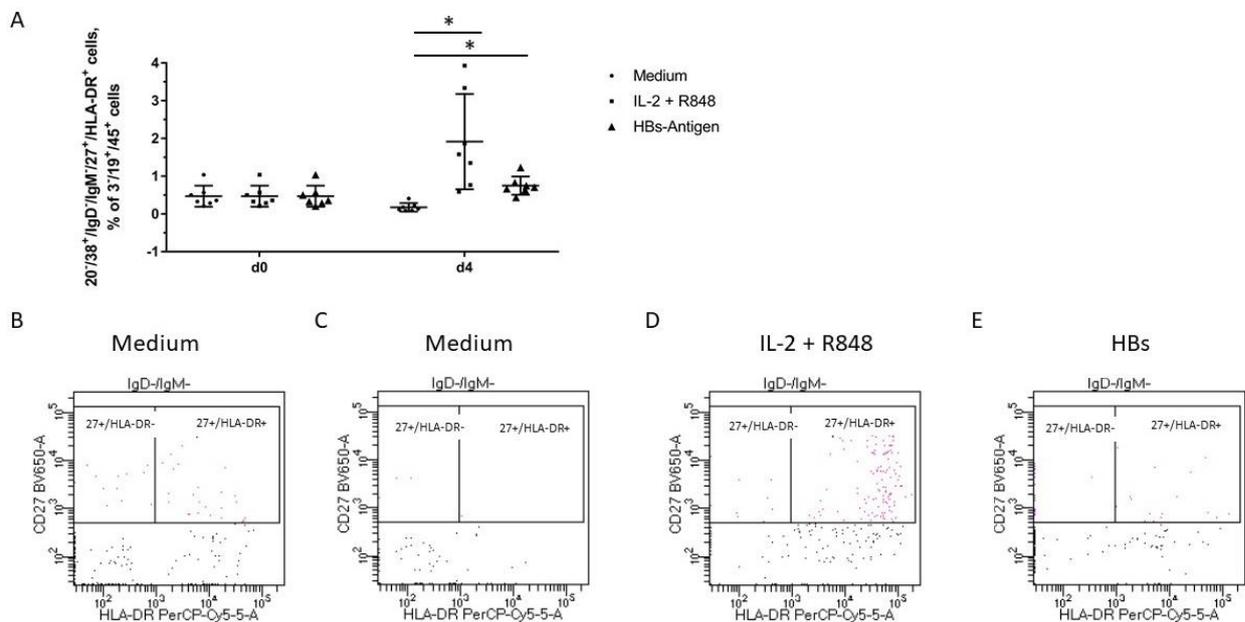


Abbildung 43: Veränderung der Plasmablasten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD20⁻/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmablasten an lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium $p < 0,05$, IL-2+R848 vs. Medium $p < 0,05$
[B]: beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

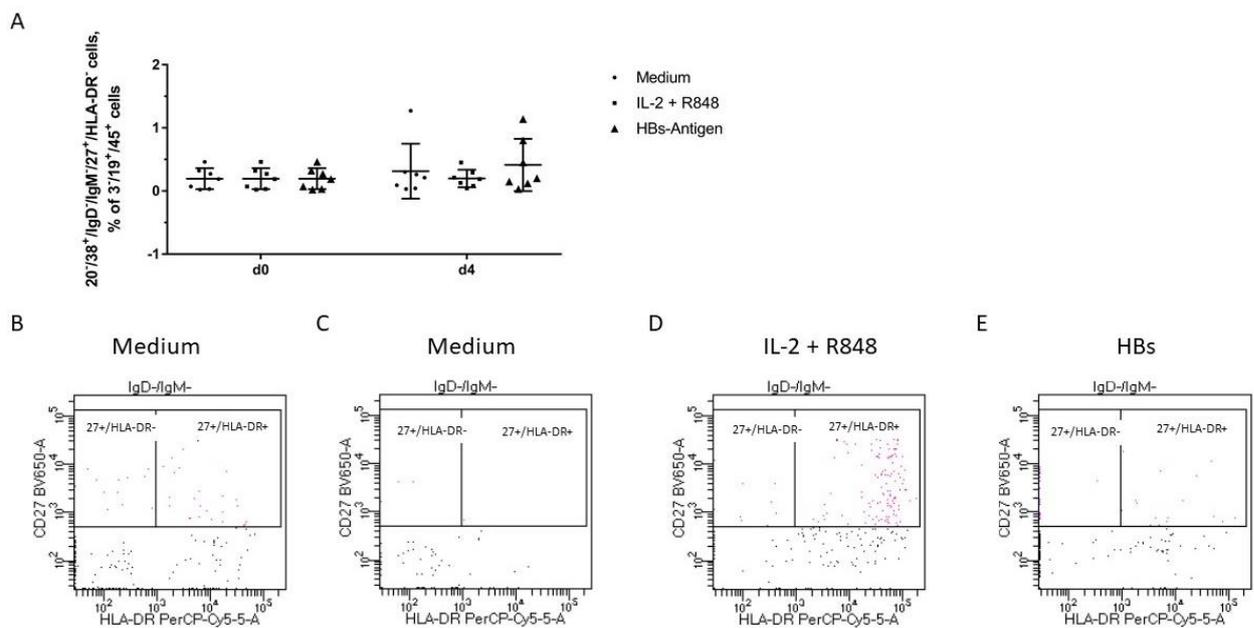


Abbildung 44: Veränderung der Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^-$ an lebenden $CD45^+/CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle ($n=7$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=7$) vs. HBs-Stimulation ($n=7$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium *n.s.*, IL-2+R848 vs. Medium *n.s.* **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

5.5.2.3.1.2 Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Entwicklung der $CD45^+/CD3^-/CD19^+/CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-$ class switched B-Zellen. In der Stimulation mit HBs-Antigen konnte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle kein statistisch signifikanter Unterschied des Anteils an allen B-Lymphozyten beobachtet werden. Ebenso zeigte sich bei der Positiv-Kontrolle im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle keine statistisch signifikante Veränderung (Abb. 45).

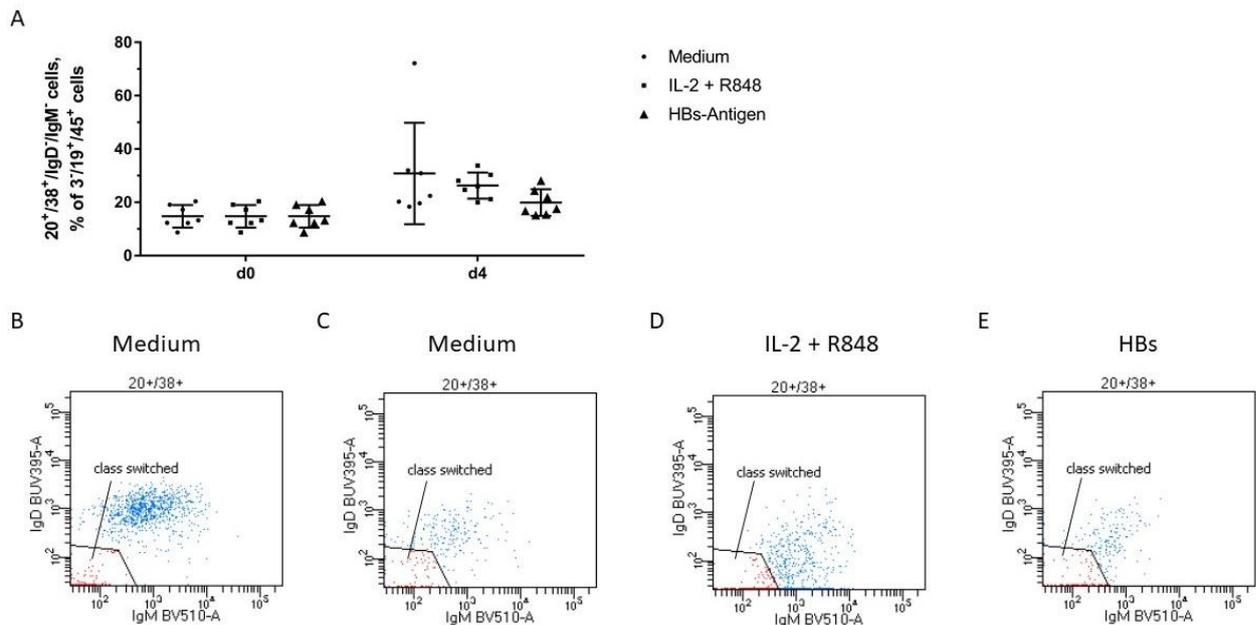


Abbildung 45: Veränderung der class switched B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD20⁺/CD38⁺/IgD⁺/IgM⁻ an lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

5.5.2.3.1.3 B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells

Abschließend erfolgte die Auswertung der Veränderung im Kompartiment der B-Gedächtniszellen. Bei den CD20⁺/CD38⁺/CD27^{Var}/CD40⁺/IgG^{Var}/IgD⁺ non class switched memory B Cells zeigte sich in der HBs-Stimulation eine visuelle, nicht signifikante Abnahme des Anteils an B-Lymphozyten (p=0,2188). In der Positiv-Kontrolle konnte die bereits im Timeshift gesehene Abnahme als statistisch signifikant ausgewertet werden. In der statistischen Auswertung wurde ein als Ausreißer deklariertes Wert in der Negativ-Kontrolle an d4 ausgeschlossen, um eine bessere graphische Darstellung zu erreichen. Dadurch wurde jedoch das Signifikanzniveau nicht verändert (Abb. 46).

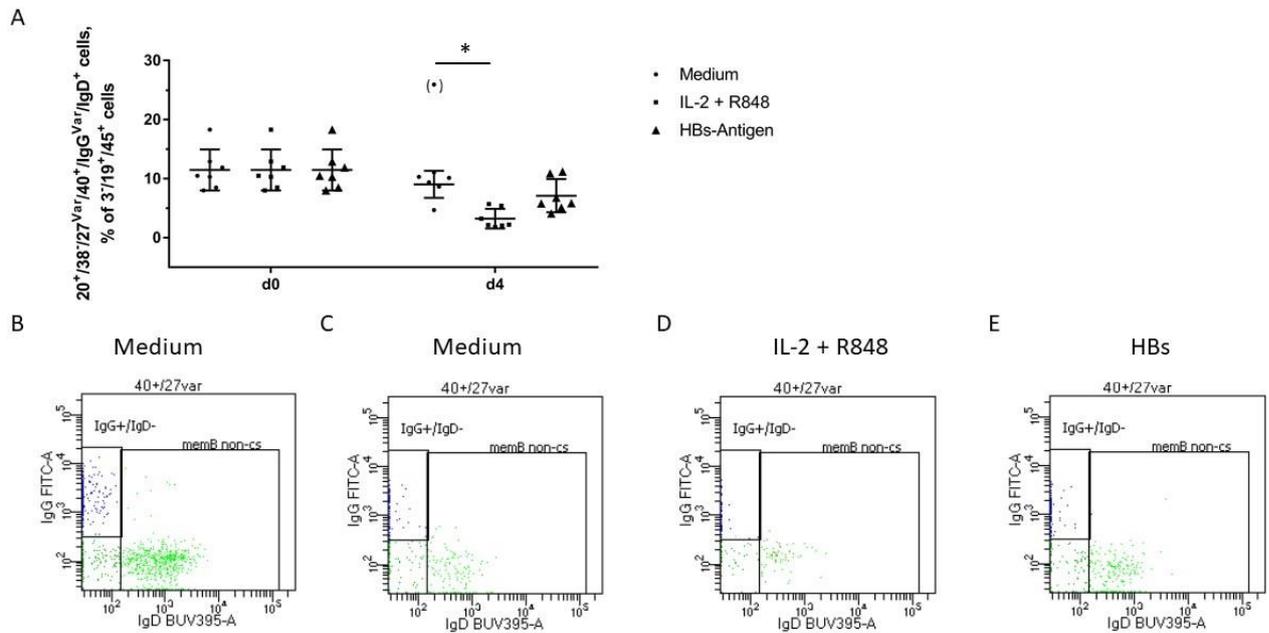


Abbildung 46: Veränderung der non class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20^+/CD38^-/CD27^{var}/CD40^+/IgG^{var}/IgD^+$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle ($n=7$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=6$; 1 Wert ausgeschlossen) vs. HBs-Stimulation ($n=7$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium $p=0,2188$, IL-2+R848 vs. Medium $p<0,05$. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

Ebenso zeigte sich bei den $CD20^+/CD38^-/CD27^{var}/CD40^+/IgG^+/IgD^-/IgM^-$ class switched memory B Cells eine Abnahme im Verlauf der vier Tage. Eine statistische Signifikanz zeigte sich hier im Vergleich mit der Negativkontrolle sowohl in der HBs-Stimulation, als auch in der Positiv-Kontrolle. Auch hier wurde ein Wert exkludiert, wodurch das Signifikanzniveau jedoch jeweils nicht verändert wurde. (Abb. 47).

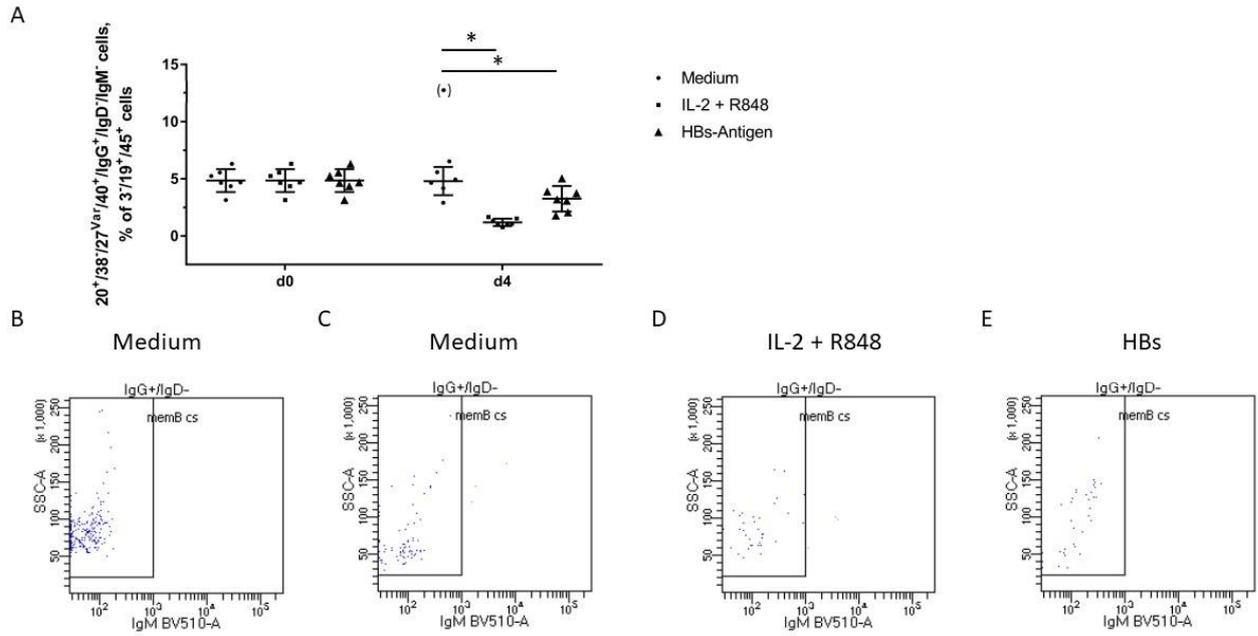


Abbildung 47: Veränderung der class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20^+/CD38^+/CD27^{var}/CD40^+/IgG^+/IgD^-/IgM^-$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle ($n=7$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=6$; 1 Wert ausgeschlossen) vs. HBs-Stimulation ($n=7$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium $p < 0,05$, IL-2+R848 vs. Medium $p < 0,05$. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

5.5.2.4 Das Zytokin IFN- γ wird vermehrt in stimulierten PBMC angereichert

Als ein Marker der Aktivierung von Lymphozyten wurde das Zytokin IFN- γ etabliert. Zur Kontrolle der zellulären Funktionalität erfolgte in jeder Messung eine Positiv-Kontrolle der IFN- γ Produktion. (s. Materialien und Methoden)

5.5.2.4.1 IFN- γ Produktion in T-Lymphozyten Subpopulationen ist unter Stimulation nach 96h weiterhin gesteigert

Zunächst erfolgte die Analyse von intrazellulärem IFN- γ in den T-Lymphozyten. Es zeigte sich, dass es sowohl in der Stimulation mit HBs als auch der Stimulation mit IL-2 und R848 zu einer Aktivierung der IFN- γ Produktion kam. In den CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten konnte eine tendenzielle Erhöhung ohne statistische Signifikanz ($p=0,1875$) des prozentualen Anteils an IFN- γ ⁺ Zellen in der HBs-Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle beobachtet werden (Abb. 48). Auch in den CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten war, wenn auch geringerer, tendenziell erhöhter prozentualer Anteil in der HBs-Stimulation zu sehen (Abb. 49). Diese Beobachtung unterstützend zeigte sich in der Positiv-Kontrolle ein statistisch signifikanter Anstieg der IFN- γ ⁺ T-Lymphozyten in beiden Subpopulationen.

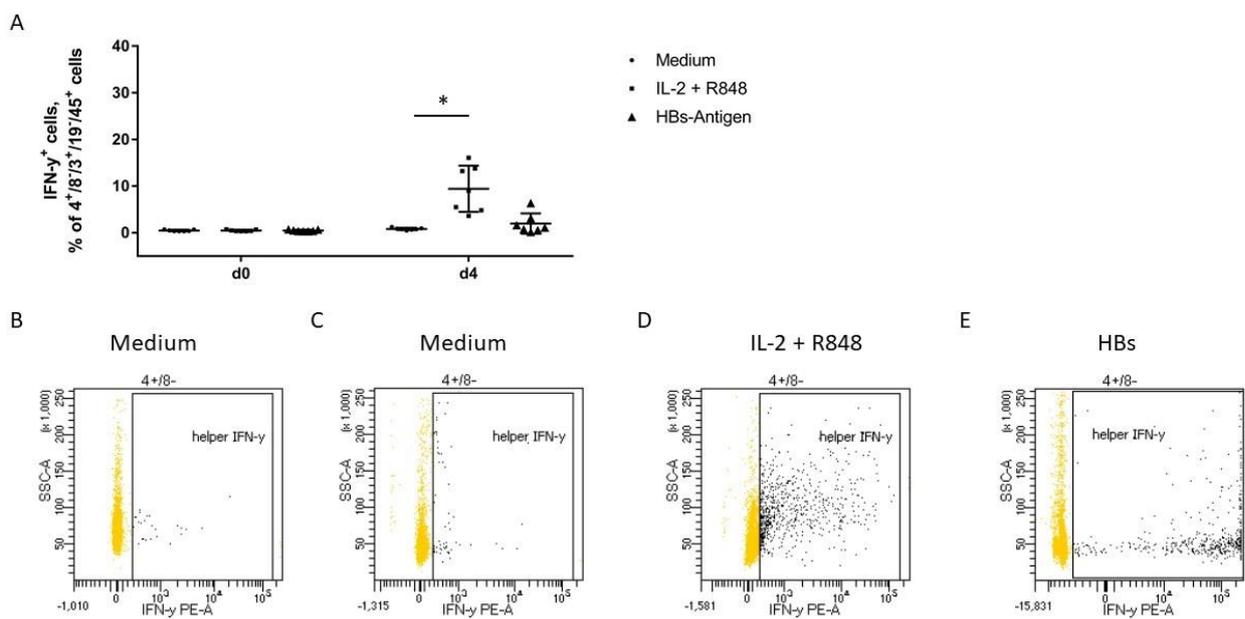


Abbildung 48: Funktionelle IFN- γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ Helfer T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle ($n=7$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=7$) vs. HBs-Stimulation ($n=7$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium $p=0,1875$., IL-2+R848 vs. Medium $p=<0,05$. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

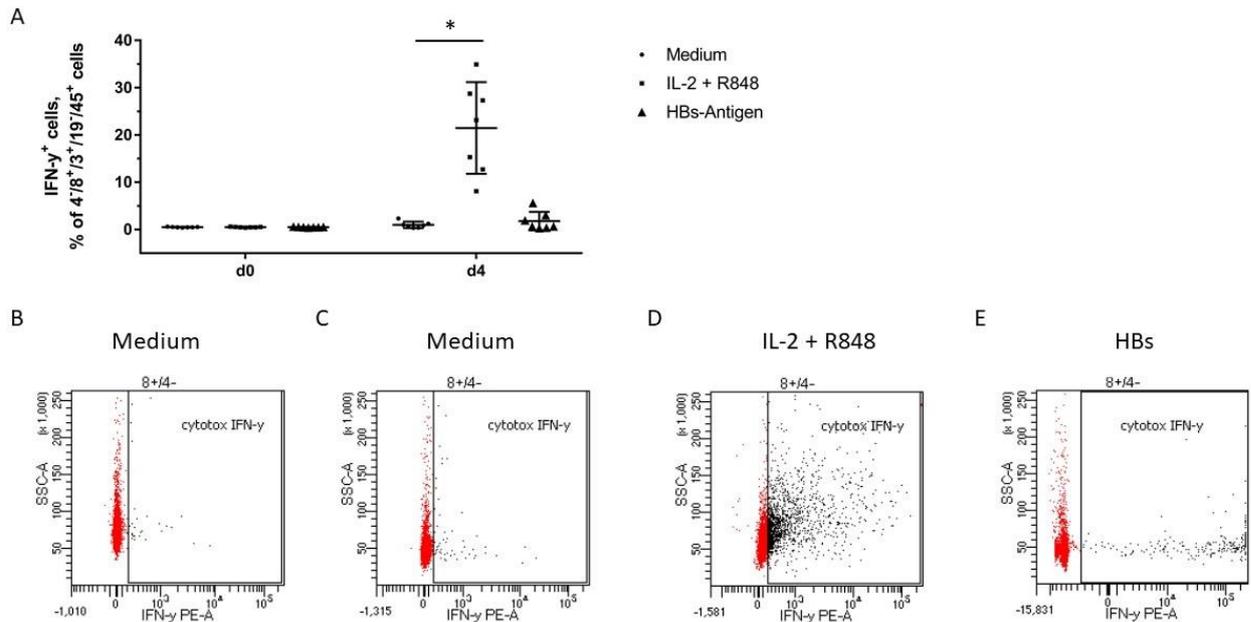


Abbildung 49: Funktionelle IFN- γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ zytotoxischen T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium p=0,2969, IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

5.5.2.4.2 Die IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten und ihren Subpopulationen wird durch die Stimulantien beeinflusst

Durch die intrazelluläre IFN- γ Färbung aller PBMC, konnte auch die Produktion von IFN- γ in den B-Zell Subpopulationen gemessen werden. Zunächst wurde der Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen an lebenden B-Lymphozyten statistisch analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme an B-Lymphozyten mit intrazellulär messbarem IFN- γ in der HBs-Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Bei der Positiv-Kontrolle konnte der bereits beobachtete signifikante Zuwachs im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gesehen werden (Abb. 50).

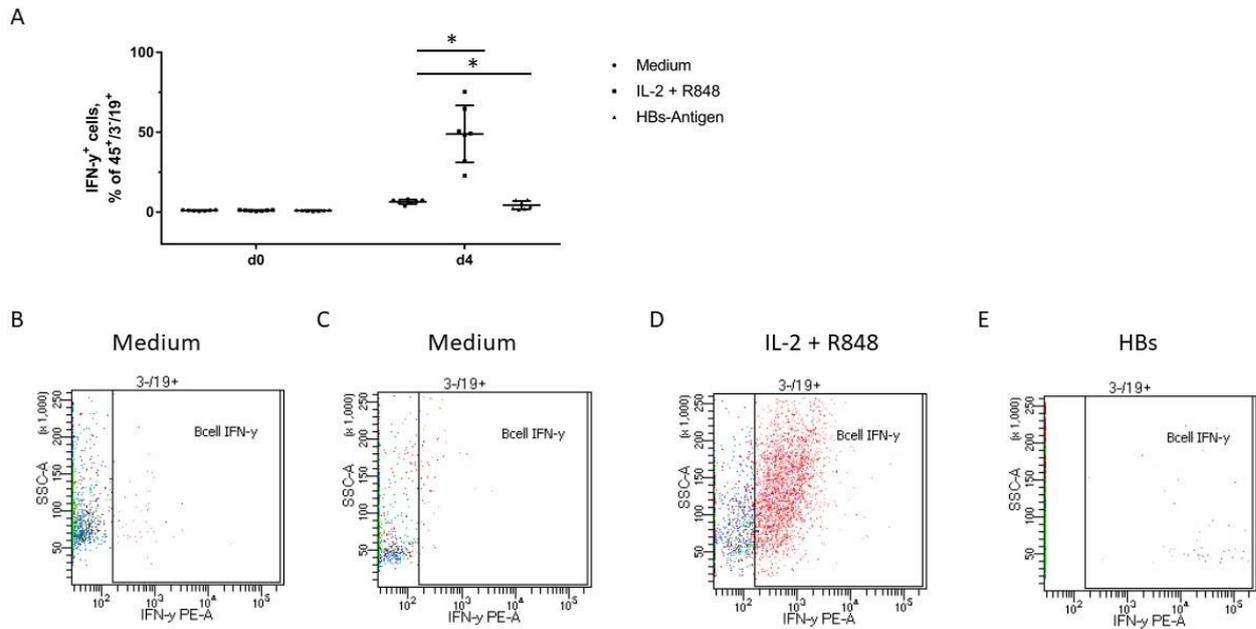


Abbildung 50: Funktionelle IFN- γ Produktion in CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium $p < 0,05$, IL-2+R848 vs. Medium $p < 0,05$. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

Analog zu den T-Lymphozyten wurden auch bei den B-Lymphozyten die Subpopulationen untersucht. Bei den Plasmablasten wurde ebenfalls ein Anstieg des intrazellulär messbaren IFN- γ beobachtet. Dieser war jedoch in der HBs-Stimulation im Vergleich zur Negativ-Stimulation grenzwertig nicht signifikant ($p=0,0625$). Die Erhöhung in der Positiv-Kontrolle zeigte sich wie bereits beobachtet an d4 im Vergleich statistisch signifikant (Abb. 51).

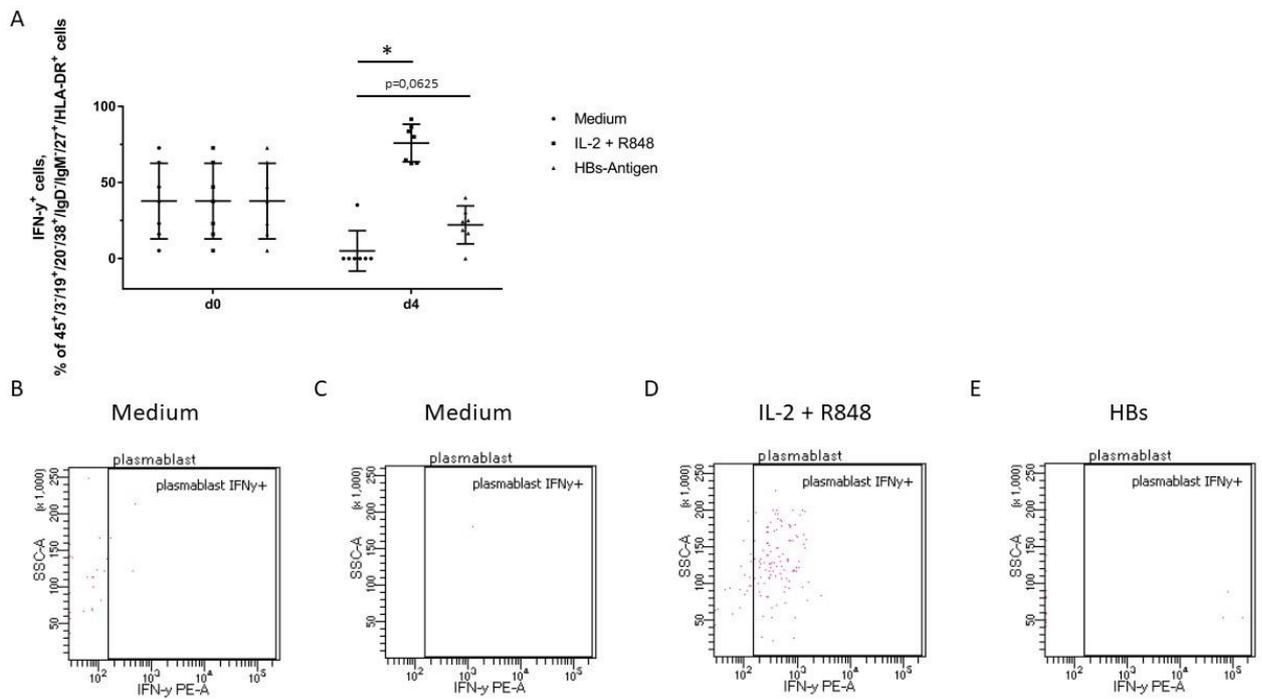


Abbildung 51: Funktionelle IFN- γ Produktion in Plasmablasten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁺/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmablasten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium p=0,0625, IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

Als ebenfalls antikörperproduzierende Subpopulation wurde das intrazelluläre IFN- γ auch bei den Plasmazellen ausgewertet. In der statistischen Bewertung konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte auch hier nur eine sehr geringe Frequenz dieser B-Zellsubpopulation beobachtet werden (Abb. 52).

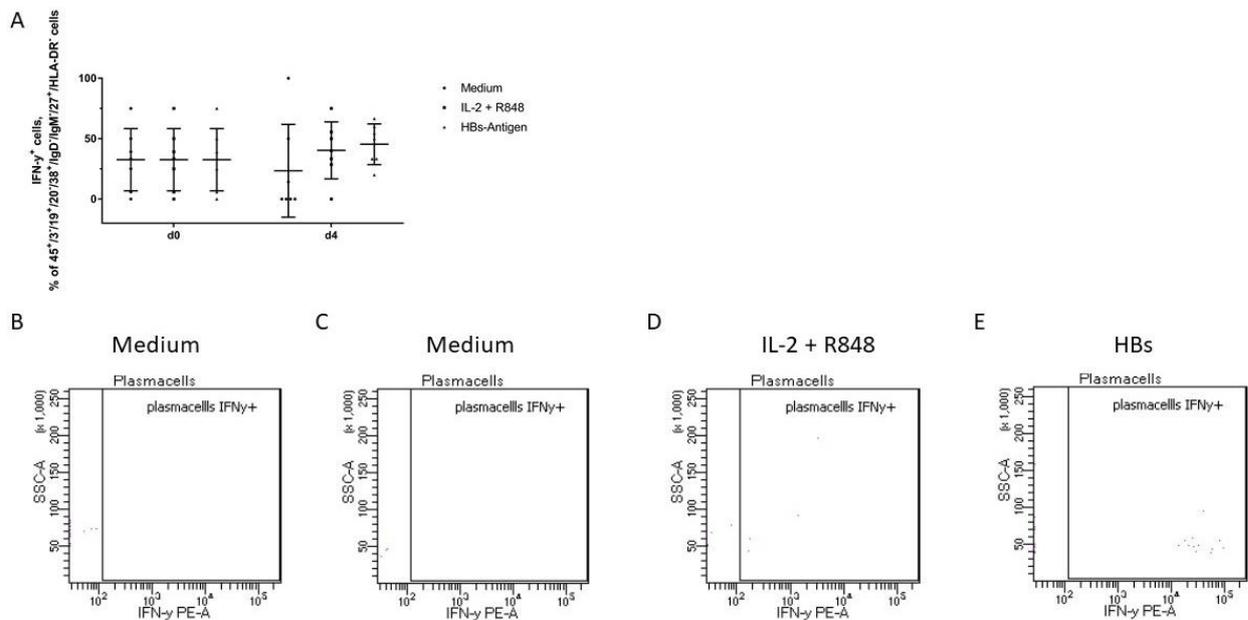


Abbildung 52: Funktionelle IFN- γ Produktion in Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmazellen unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

Wie auch bei den B-Lymphozyten zeigte sich in der Subpopulation der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻ class switched B-Zellen Veränderungen des intrazellulär messbaren IFN- γ . Diese war in der Stimulation mit HBs-Antigen durch eine nicht signifikante Abnahme gekennzeichnet ($p=0,0781$). In der Positiv-Kontrolle zeigte sich die bereits im vorhergehenden Experiment beschriebene statistisch signifikante Zunahme (Abb. 53).

Bei den non class switched memory B-Lymphozyten wurde durch die Stimulation mit HBs-Antigen keine statistisch signifikante Erhöhung der IFN- γ ⁺ Produktion erreicht. Jedoch konnte in der Stimulation mit IL-2 und R848 die, bereits beim Timeshift an Tag 2 erreichte Signifikanz nun auch an Tag 4 beobachtet werden (Abb. 54).

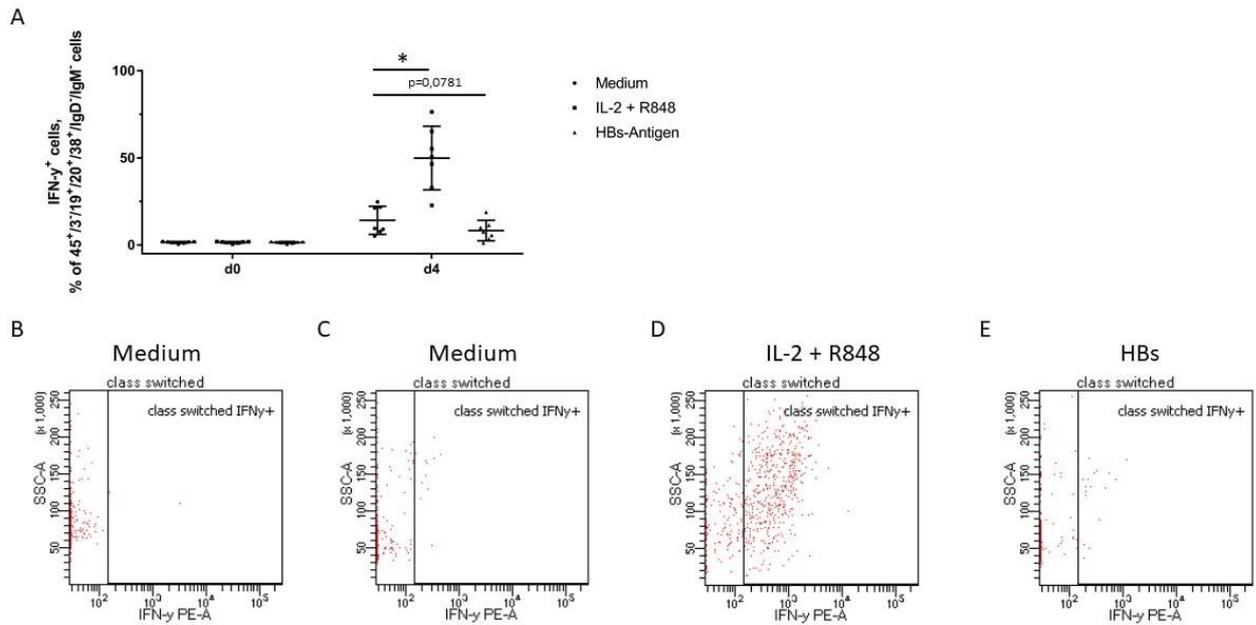


Abbildung 53: Funktionelle IFN- γ Produktion in class switched B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /IgD $^-$ /IgM $^-$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium p=0,0781, IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

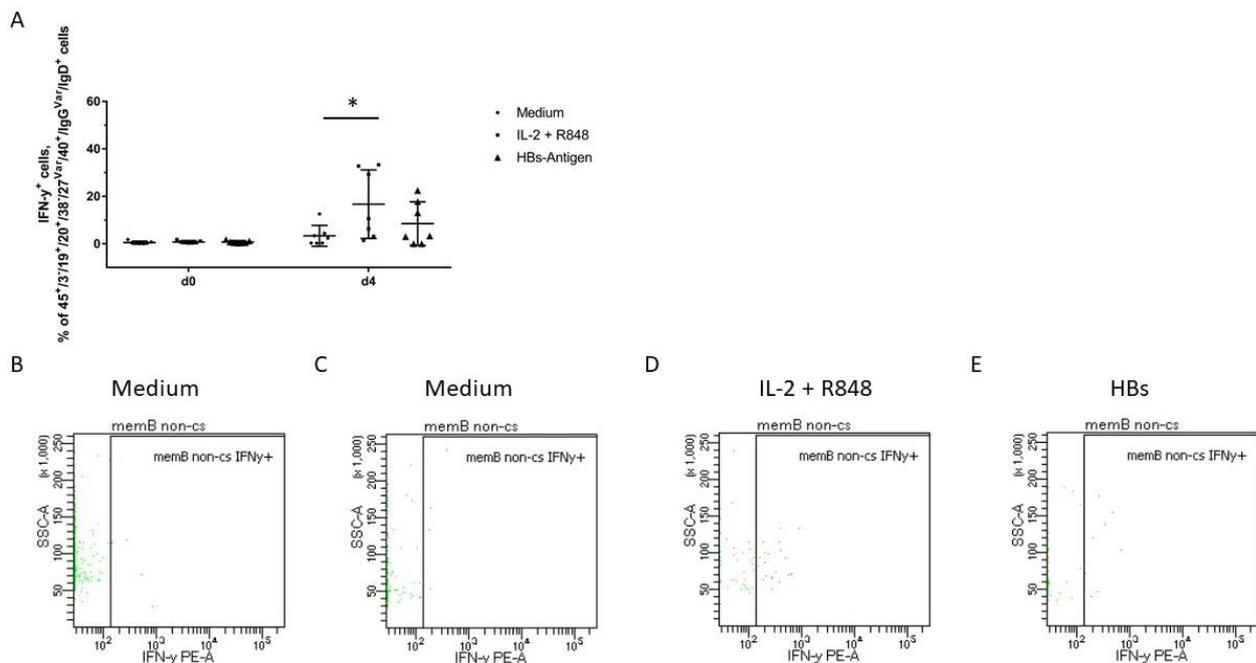


Abbildung 54: Funktionelle IFN- γ Produktion in non class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^-$ /CD27 var /CD40 $^+$ /IgG var /IgD $^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05. **[B]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

In der Subpopulation der class switched memory B-Lymphozyten konnte eine nicht signifikante Verringerung der IFN- γ ⁺ in der HBs-Stimulation beobachtet werden. In der Positiv-Kontrolle zeigte sich die bereits angedeutete Zunahme nun statistisch signifikant (Abb. 55).

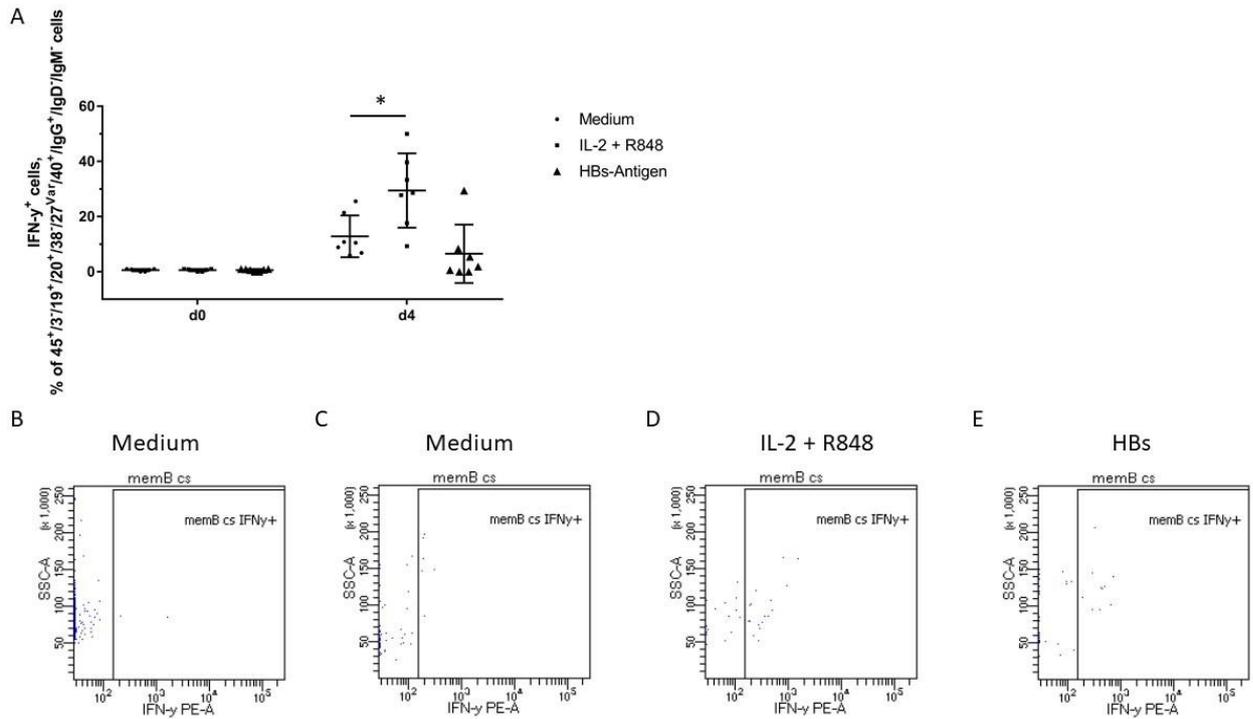


Abbildung 55: Funktionelle IFN- γ Produktion in class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/CD27^{var}/CD40⁺/IgG⁺/IgD⁺/IgM⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, Positiv-Kontrolle (n=7) vs. Negativ-Kontrolle (n=7) vs. HBs-Stimulation (n=7), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. Wilcoxon-Rank Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05. [B]: beispielhafter FACS-Dotplot an d0 [C]: beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4 [D]: beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4 [E]: beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4

5.6 Der IgG-ELISA zeigt eine individuelle IgG Produktion in der Stimulation mit Il-2 und R848

Neben der Messung von intrazellulärem IFN- γ ist das produzierte IgG ein Marker für eine zelluläre Aktivierung. Deshalb wurde zusätzlich zur Immunphänotypisierung mithilfe der FACS Analyse ein IgG ELISA des RPMI-Mediums nach Stimulation durchgeführt. Dieser erfolgte zunächst für die Positiv- und Negativ-Kontrolle zweier Proben im Verlauf über 4 Tage. Gemessen wurden die Isotypen IgG₁₋₄. (s. Materialien und Methoden)

Über die Standardverdünnungen konnte die Standardabsorptionskurve gemittelt werden.

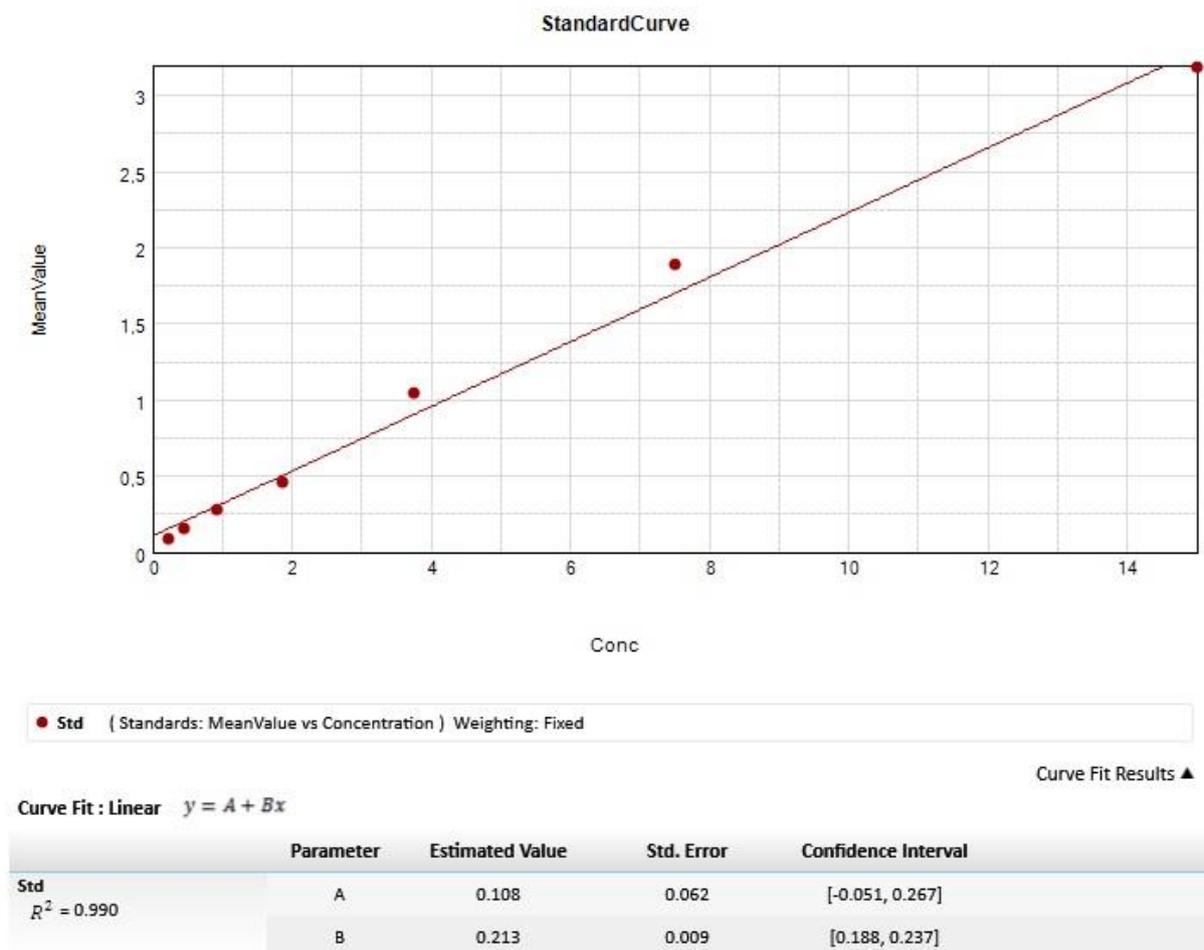


Abbildung 56: Interpolierte Standardkurve des IgG-ELISA

Dargestellt ist die Standardkurve des durchgeführten IgG ELISA nach Interpolation über die Absorption der Standardverdünnungen, X-Achse = Konzentration von IgG in ng/ml, Y-Achse = Mittelwert der gemessenen OD (n=2)

Anschließend konnte über die OD der Verdünnungsreihen der Proben und deren Verdünnungsfaktoren die ursprüngliche IgG Konzentration im Medium berechnet werden (s. Materialien und Methoden). In beiden Messungen zeigte sich in der Negativ-Kontrolle eine geringe

basale IgG Konzentration, die über den Inkubationszeitraum keine signifikante Veränderung aufwies. Im gemessenen Medium der Positiv-Kontrollen zeigte sich bei Probe 1 ein deutlicher Anstieg mit einem signifikanten Unterscheid zur Negativ-Kontrolle ($p < 0,01$). In Probe 2 zeigte sich auch ein tendenzieller Anstieg, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 57).

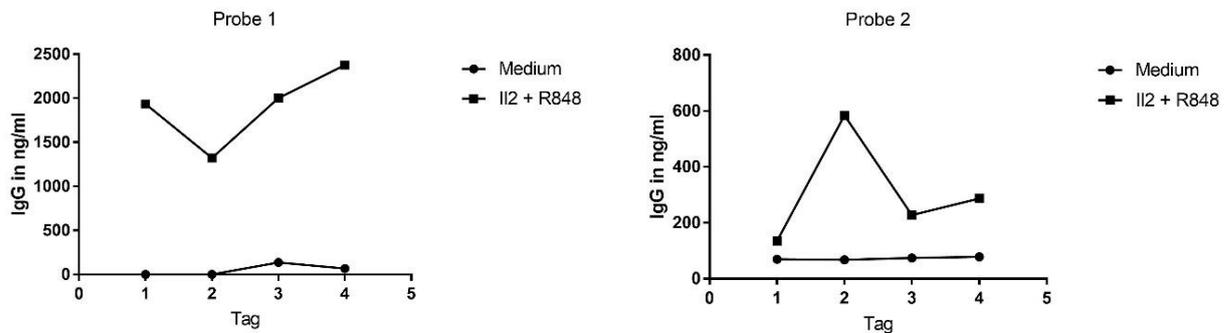


Abbildung 57: IgG-Konzentration im Medium bei Negativ- und Positiv-Stimulation über 4 Tage

Dargestellt ist die IgG-Konzentration in ng/ml im Medium während Inkubation mit Medium und IL2 + R848, gepaarter t-Test mit $p < 0,01$ bei Probe 1, n.s. bei Probe 2

In einer statistischen Betrachtung der FACS Ergebnisse der Zelldifferenzierung der B-Lymphozyten, deren Subpopulationen und auch deren IFN- γ Produktion mit den gemessenen IgG-Konzentrationen, ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation. (Daten nicht dargestellt)

5.7 Memory B-Lymphozyten haben einen Einfluss auf die Effekte der Stimulationen in den PBMC-Fractionen

Zur weiteren Untersuchung der memory B-Lymphozyten und deren Rolle in der antigenspezifischen Immunantwort wurde eine MACS-Isolation durchgeführt (S. Materialien und Methoden). Durch diese erhielt man eine PBMC-Fraktion mit angereicherten memory B-Lymphozyten (mem B, enriched) und eine PBMC-Fraktion aus denen memory B-Lymphozyten depletiert worden waren (non-mem B, depleted). Die Anreicherungsresultate sind in Abbildung 58 dargestellt. Bei den class switched memory B-Lymphozyten zeigte sich eine Anreicherung auf 14,69 % (SD = 3,51 %) gegenüber einer Depletion auf 3,02 % (SD = 0,68 %). Bei den non class switched memory B Cells konnte eine Anreicherung auf 22,06 % (SD = 2,12 %) gegenüber einer Depletion auf 14,2 % (SD = 4,2 %) erreicht werden. Es ergab sich in beiden Subpopulationen der memory B-Lymphozyten ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der angereicherten und depletierten Fraktion. Diese PBMC-

Fractionen wurden anschließend ebenfalls nach Stimulation mit der Positiv-Kontrolle und HBs-Antigen mithilfe des FACS analysiert.

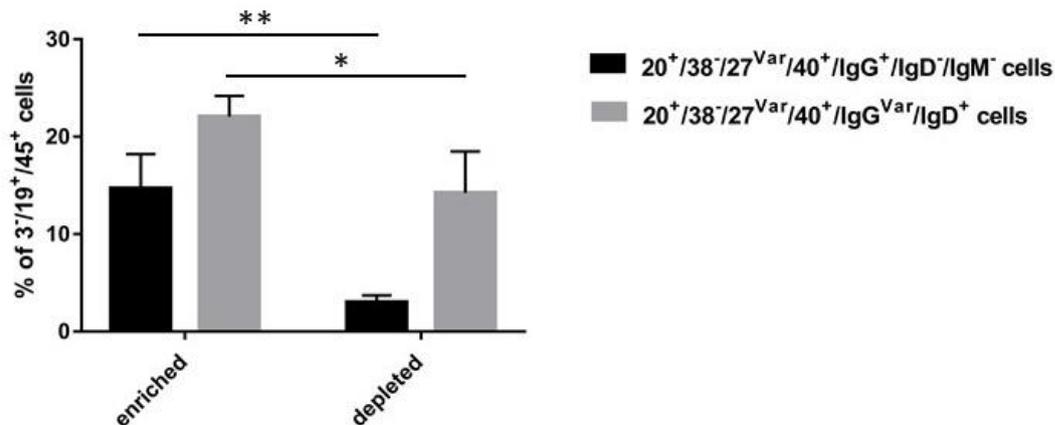


Abbildung 58: Populationen der class switched und non class switched memory B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach MACS-Separation

Darstellung der % der CD20⁺/CD38⁻/CD27^{Var}/CD40⁺/IgG^{Var}/IgD⁺ Zellen und % der CD20⁺/CD38⁻/IgD⁻/IgM⁻ Zellen an lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten nach MACS-Separation (n=3) als Balkendiagramm Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: enriched vs. depleted: class switched memory B-Cells p=<0,01, non-class switched memory B-Cells p=<0,05

In den nachfolgenden Darstellungen wird jeweils die depletierte PBMC-Fraktion der angereicherten PBMC-Fraktion gegenübergestellt. Dabei wird unterhalb der graphischen Darstellung zum einen der Zeitpunkt d0, als auch die drei Ergebnisse der HBs-Antigen Stimulation, sowie die Negativ- und Positiv-Kontrolle zum Zeitpunkt d4 in FACS-Dotplots visualisiert. Ein statistischer Vergleich der FACS-Ergebnisse erfolgte zunächst zwischen den verschiedenen Stimulantien innerhalb der Fraktionen.

5.7.1 Die Analyse der T-Lymphozyten in den Isolationsfraktionen zeigt nur einen geringen Einfluss der Stimulantien

Wie bereits in den vorhergegangenen Analysen wurde auch hier im ersten Schritt die Reaktion der T-Zellen auf Positiv-Kontrolle und HBs-Antigen untersucht. Dabei konnte in den non-memB Zellen im Vergleich der Negativ- und Positiv-Kontrolle ein tendenzielles Absinken des Anteils der T-Lymphozyten ohne statistische Signifikanz beobachtet werden (p=0,0848). Weitere Veränderungen konnten nicht beobachtet werden (Abb. 59).

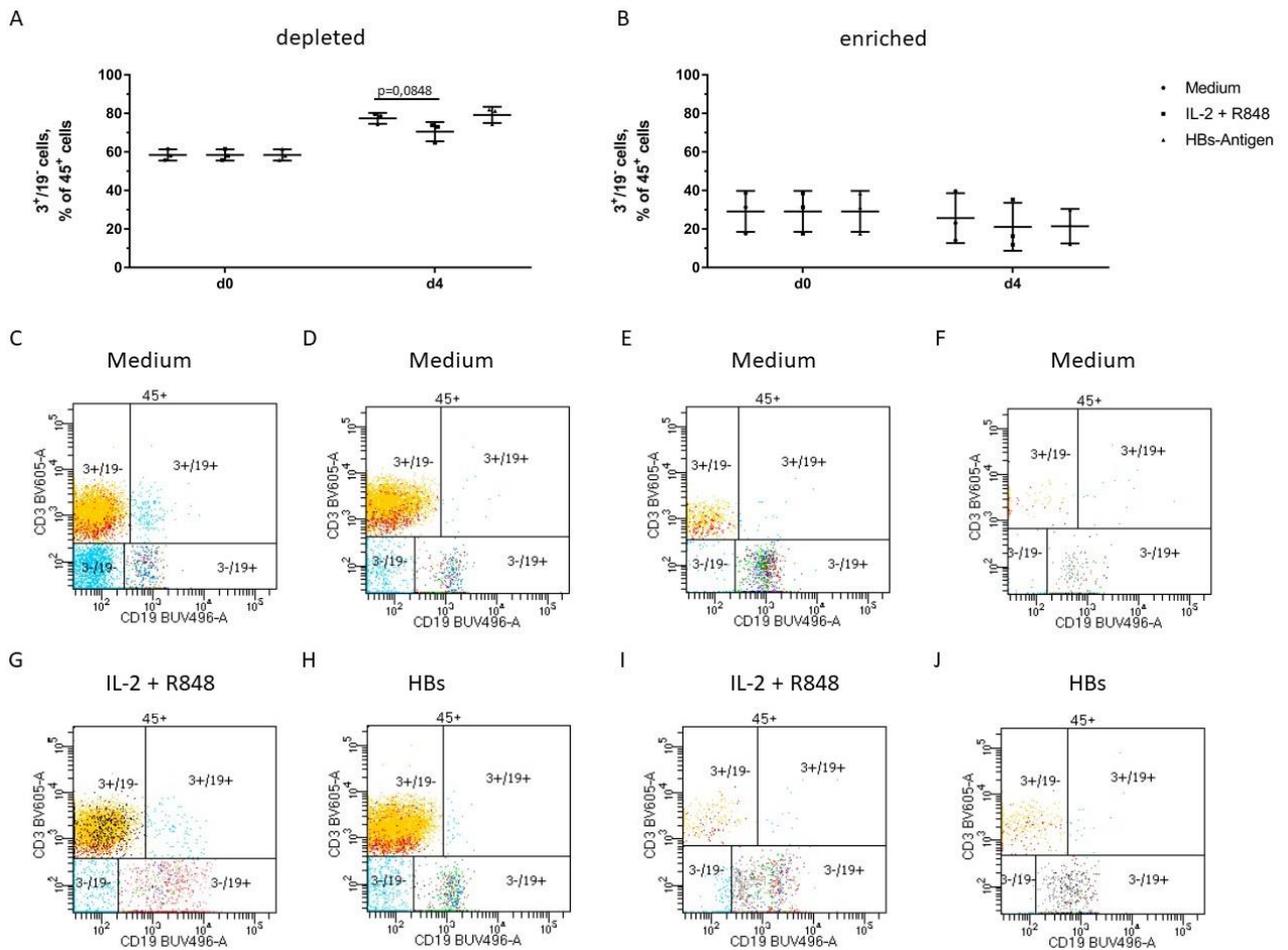


Abbildung 59: Population der CD3⁺/CD19⁺ T-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD3⁺/CD19⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., Il-2+R848 vs. Medium p=0,0848 **[B]:** % der CD3⁺/CD19⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., Il-2+R848 vs. Medium n.s. **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

5.7.1.1 CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen der T-Lymphozyten

Anschließend erfolgte die Analyse der T-Lymphozyten Subpopulationen. Dabei zeigte sich in der statistischen Analyse im Verlauf über vier Tage, weder bei den CD4⁺/CD8⁻ T Helfer Zellen (Abb. 60), noch bei den CD4⁻/CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Abb. 61) ein signifikanter Unterschied der drei Stimulationen. Diese Beobachtung war in beiden PBMC-Fraktionen zu machen.

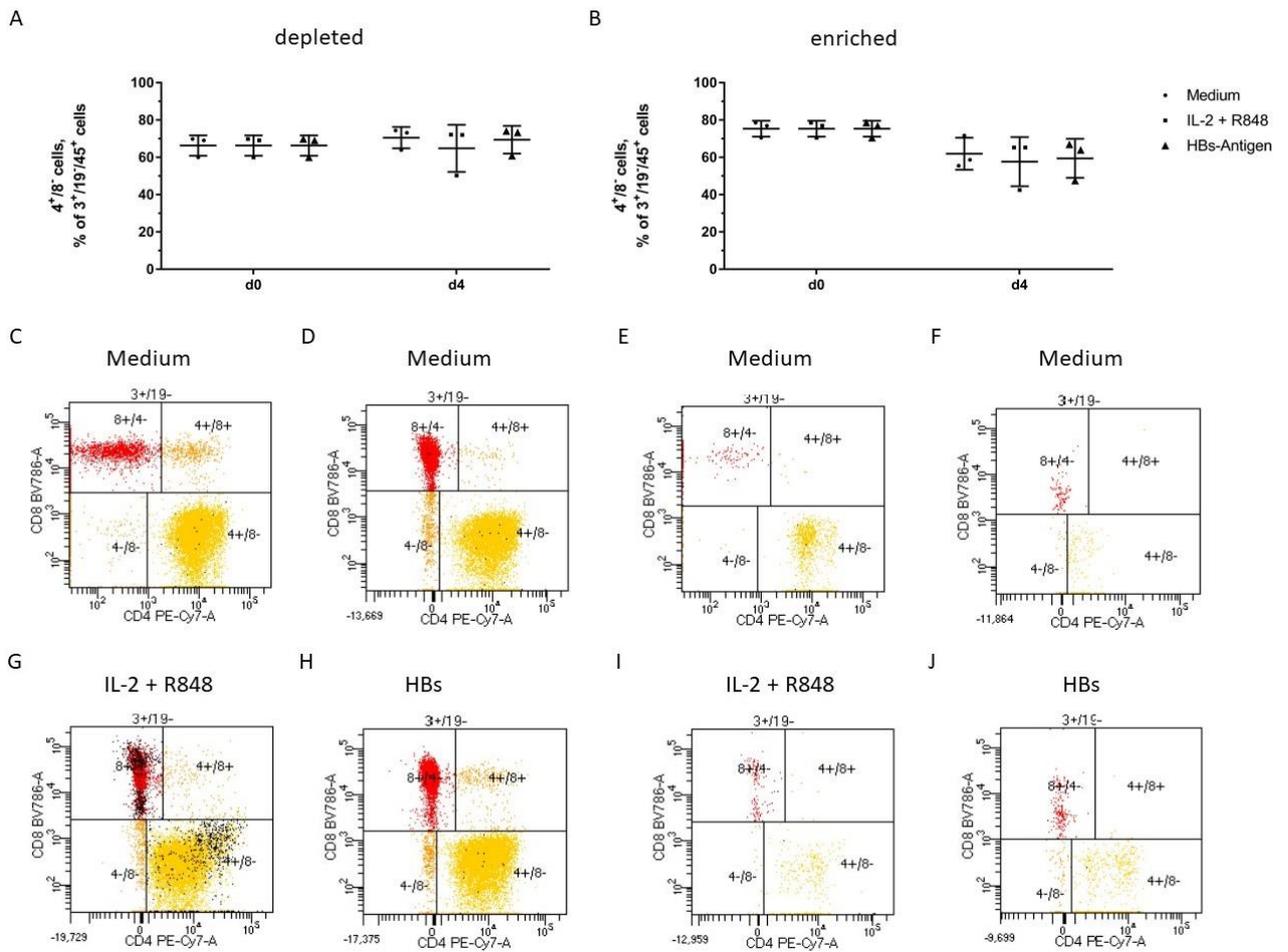


Abbildung 60: Population der der CD4⁺/CD8⁺ T-Helfer Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., Il-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** % der CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., Il-2+R848 vs. Medium n.s. **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

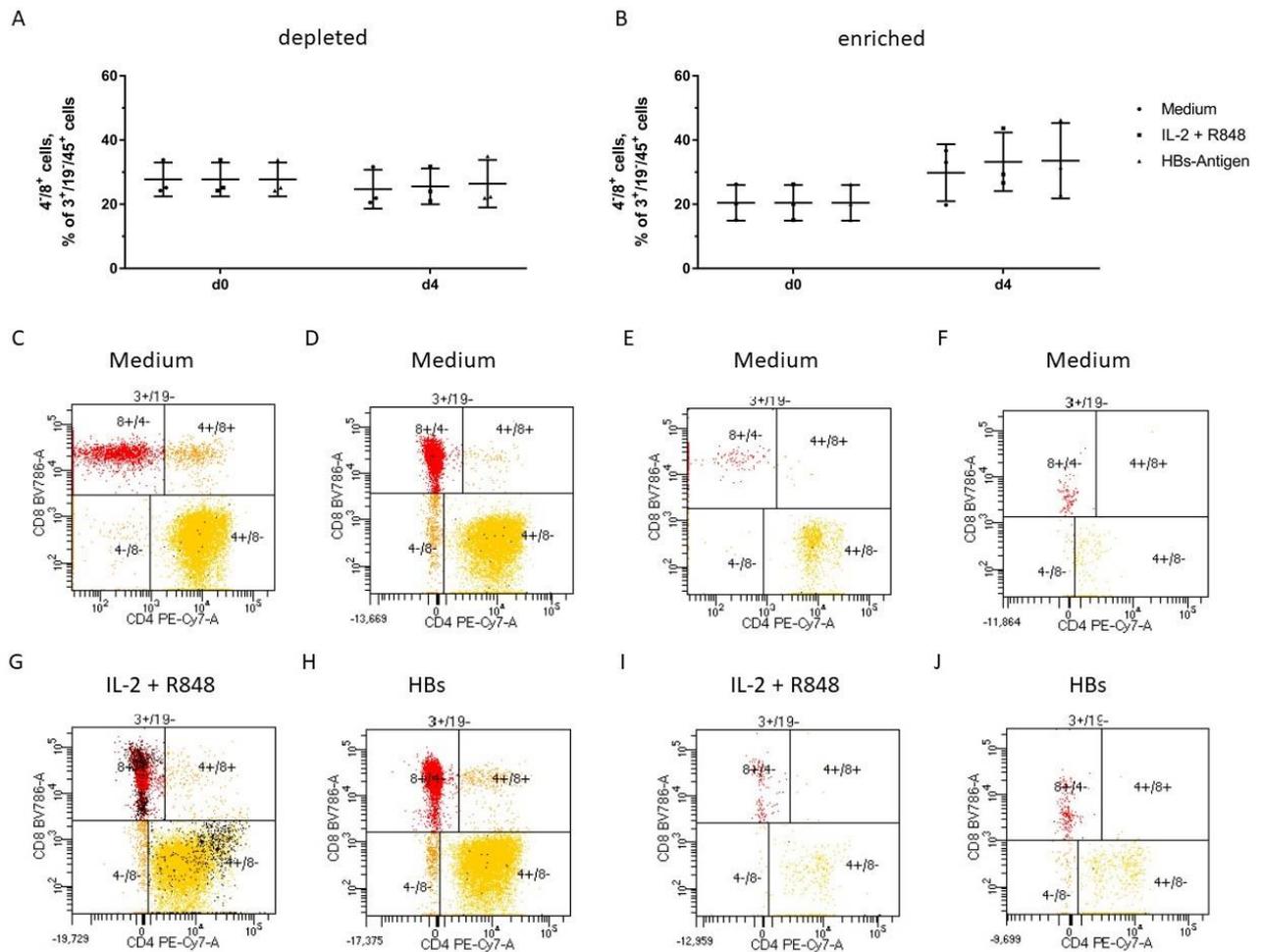


Abbildung 61: Population der CD4/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD4/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** % der CD4/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

5.7.2 Durch die Stimulantien werden bei den B-Lymphozyten in den beiden PBMC-Fraktionen unterschiedliche Antworten erreicht

Anschließend konnte mit der Analyse der B-Lymphozyten fortgefahren werden. Dazu wurden zunächst der prozentuale Anteil von CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten an lebenden CD45⁺ Leukozyten statistisch ausgewertet. Dabei entsprach auch hier d0 der Baselinemessung und d4 nach 96h. In der non-memB Fraktion zeigte sich in der Stimulation mit IL-2 und R838 eine statistisch signifikante Erhöhung des

Anteils der B-Lymphozyten. Dieser konnte ohne statistische Signifikanz ebenso in der memB Fraktion beobachtet werden. In dieser zeigte sich ebenfalls eine statistisch nicht signifikante Erhöhung des Anteils in der Stimulation mit HBs-Antigen (Abb. 62).

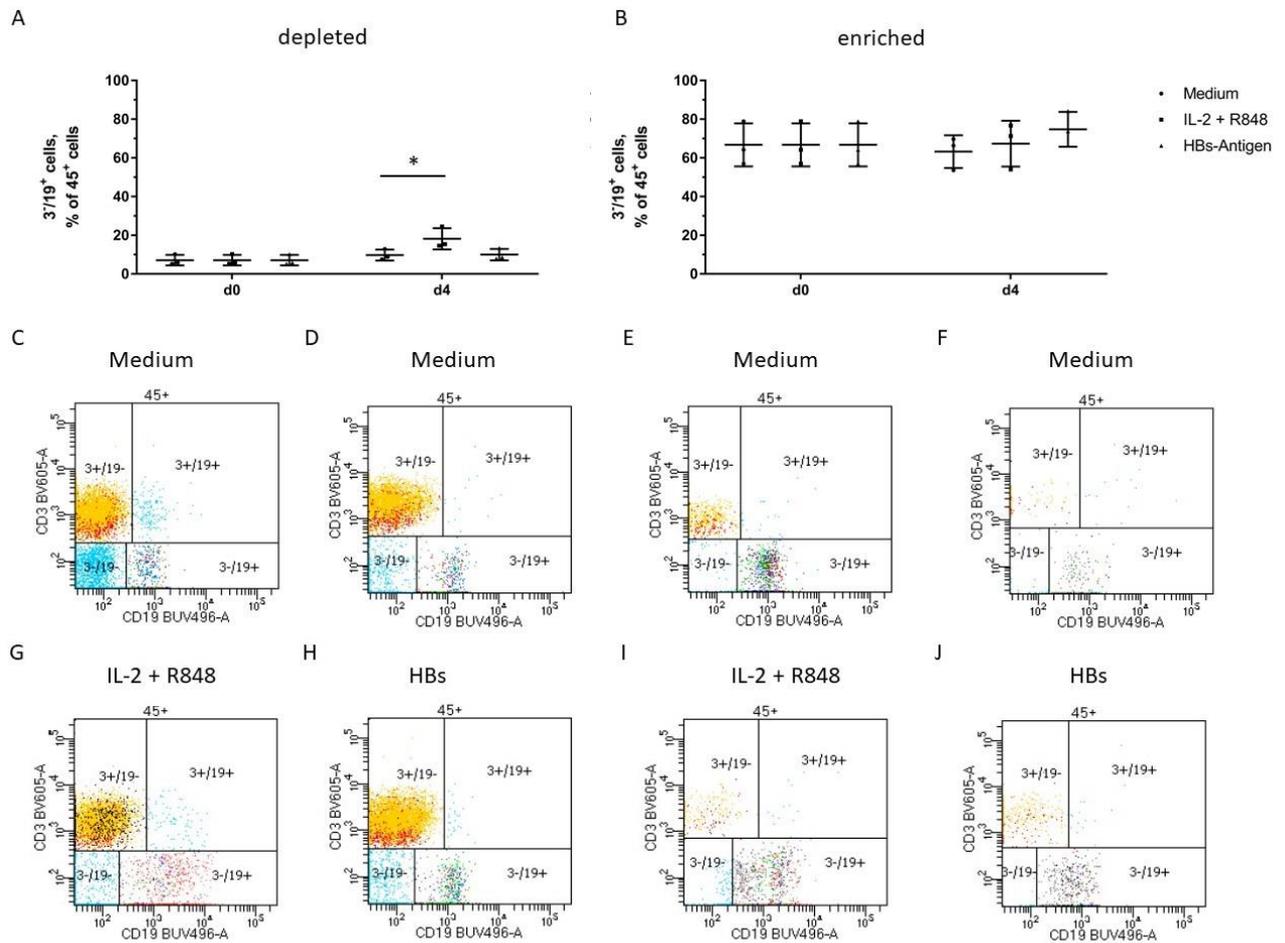


Abbildung 62: Population der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p=<0,05 **[B]:** % der CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

5.7.2.1 Bei den Subpopulationen der B-Lymphozyten wird durch die Depletion die zelluläre Antwort beeinflusst

Zur Identifizierung der antigenspezifischen memory B-Zellen und deren Differenzierung zu antikörperproduzierenden Zellen unter Stimulation, wurden anschließend die ausgewählten Subpopulationen der B-Lymphozyten analysiert. Das Gating in der FACS-Analyse erfolgte wie bereits beschrieben und immer unter FMO-Kontrolle.

5.7.2.1.1 Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen

Dabei zeigte sich in der non-memB Fraktion bei Stimulation mit HBs-Antigen beim prozentualen Anteil der $CD20^-/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten an lebenden $CD45^+/CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten im Verlauf über vier Tage eine zunehmende Erhöhung. Diese war im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nur tendenziell ($p=0,1209$). Jedoch zeigte sich diese Erhöhung im Vergleich zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle als statistisch signifikant.

Ebenso wurde eine geringe Erhöhung des Anteils der Plasmablasten in der memB Fraktion beobachtet. In der statistischen Auswertung zeigte sich dieser jedoch im Vergleich der HBs-Stimulation und der Negativ-Kontrolle als nicht signifikant. Auch konnte im Vergleich der Negativ- und Positiv-Kontrolle keine statistische Signifikanz, trotz eines tendenziellen Anstiegs, beobachtet werden ($p=0,1015$) (Abb. 63).

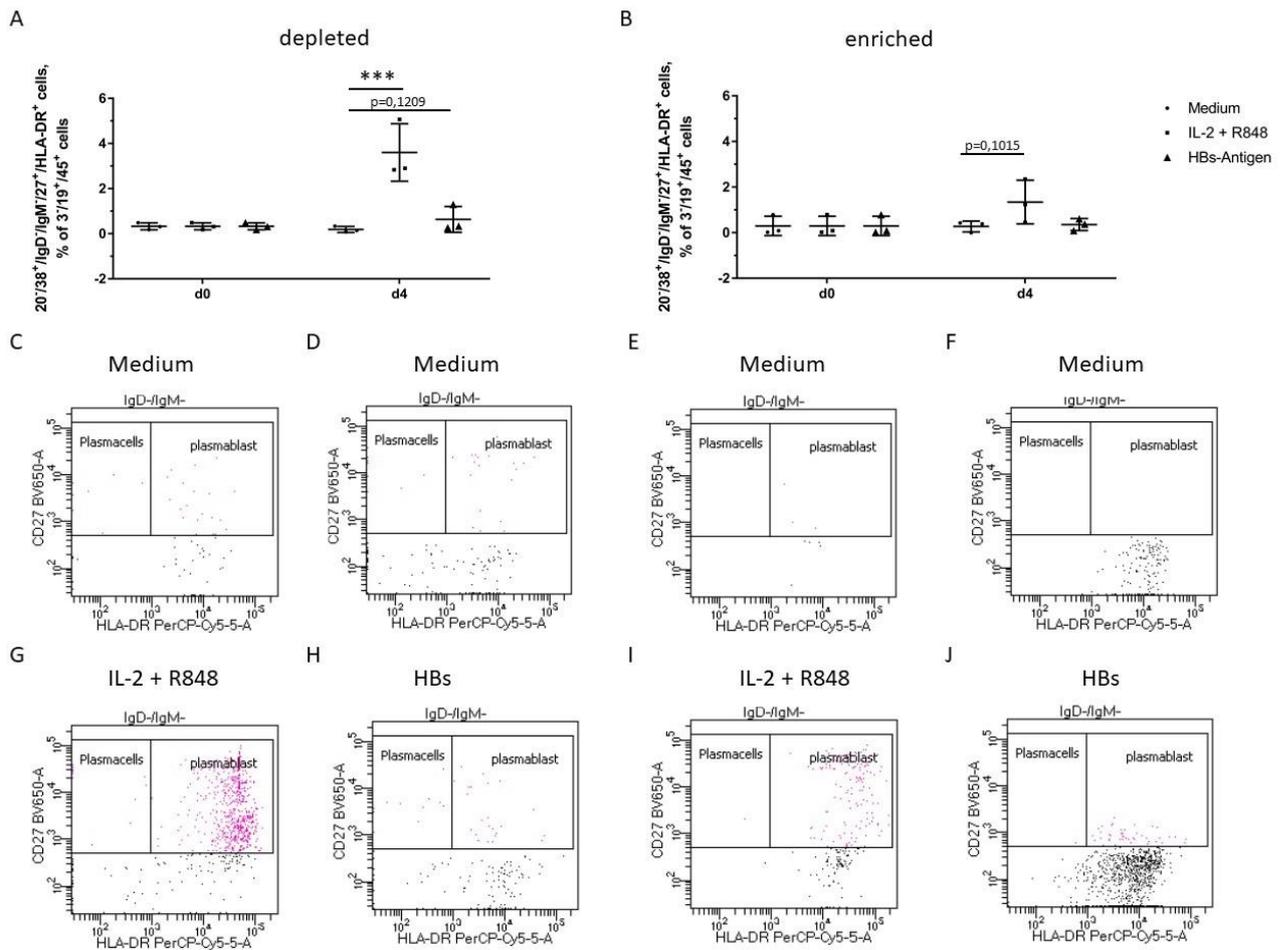


Abbildung 63: Population der Plasmablasten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium $p=0,1209$, IL-2+R848 vs. Medium $p<0,001$ **[B]:** % der $CD20/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium $p=0,1015$ **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

Bei den Plasmazellen, die durch ihre Antigene $CD20^-/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ aus den B-Lymphozyten gegatet werden konnten, zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Veränderung innerhalb des Beobachtungszeitraums. Ebenso waren nur sehr geringe Frequenzen dieser Population

in beiden Isolationsfraktionen zu beobachten, jedoch werden diese Ergebnisse aus Gründen der Vollständigkeit dargestellt (Abb.64).

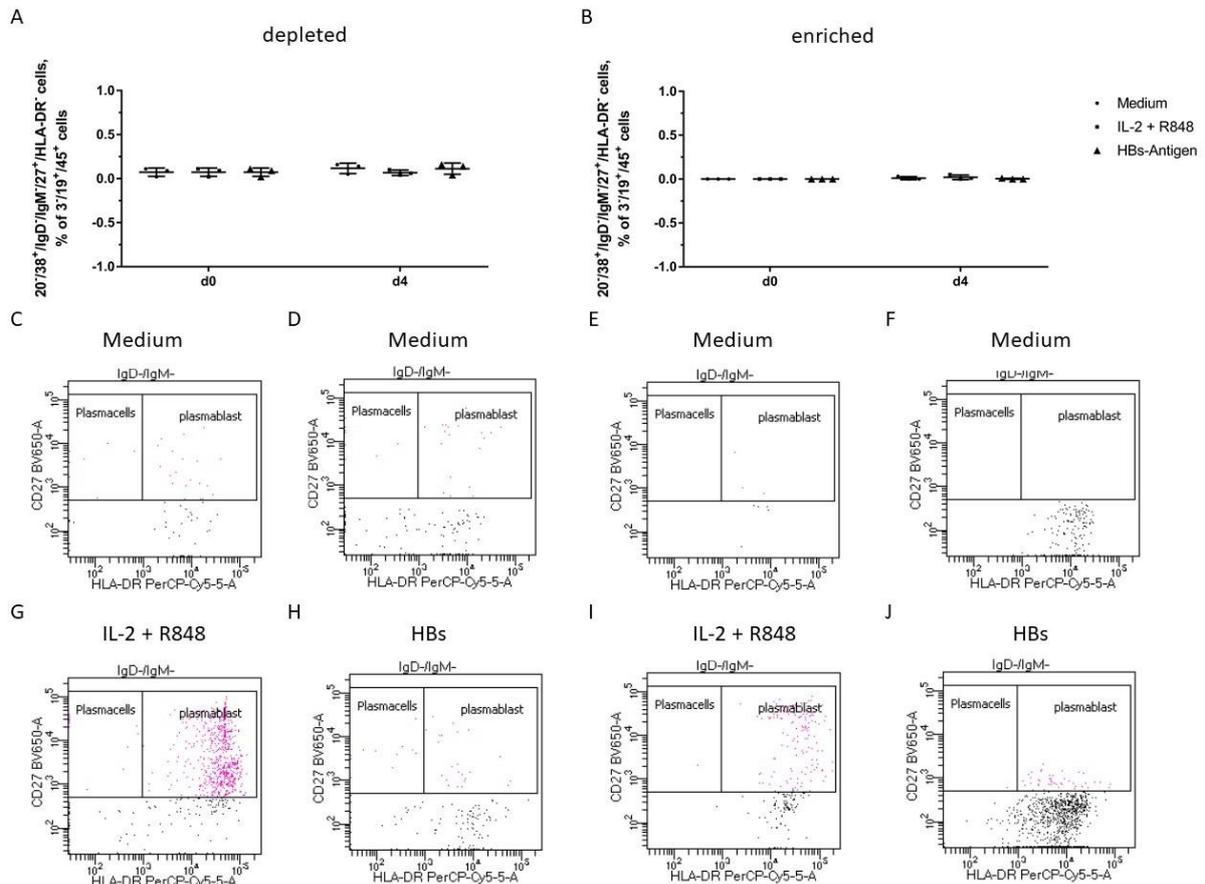


Abbildung 64: Population der Plasmazellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^-$ Plasmazellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle ($n=3$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=3$) vs. HBs-Stimulation ($n=3$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** % der $CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^-$ Plasmazellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle ($n=3$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=3$) vs. HBs-Stimulation ($n=3$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

5.7.2.1.2 Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Entwicklung der $CD45^+/CD3^+/CD19^+/CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-$ class switched B-Zellen. Dabei zeigten sich in beiden Isolationsfraktionen ähnliche Veränderungen. In der Stimulation mit HBs-Antigen konnte eine

Abnahme des Anteils an den B-Lymphozyten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle beobachtet werden. Diese war bei beiden Isolationsfraktionen statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu kam es zu einer Erhöhung des Anteils der class switched B-Zellen in der Positiv-Kontrolle. Diese Zunahme war jedoch in beiden Isolationsfraktionen nicht signifikant. Bei der memB Fraktion zeigte sich diese Tendenz deutlicher ($p=0,0592$). Ebenso war ein deutlicher Abfall von d0 auf d4 bei allen Individuen zu beobachten (Abb. 65).

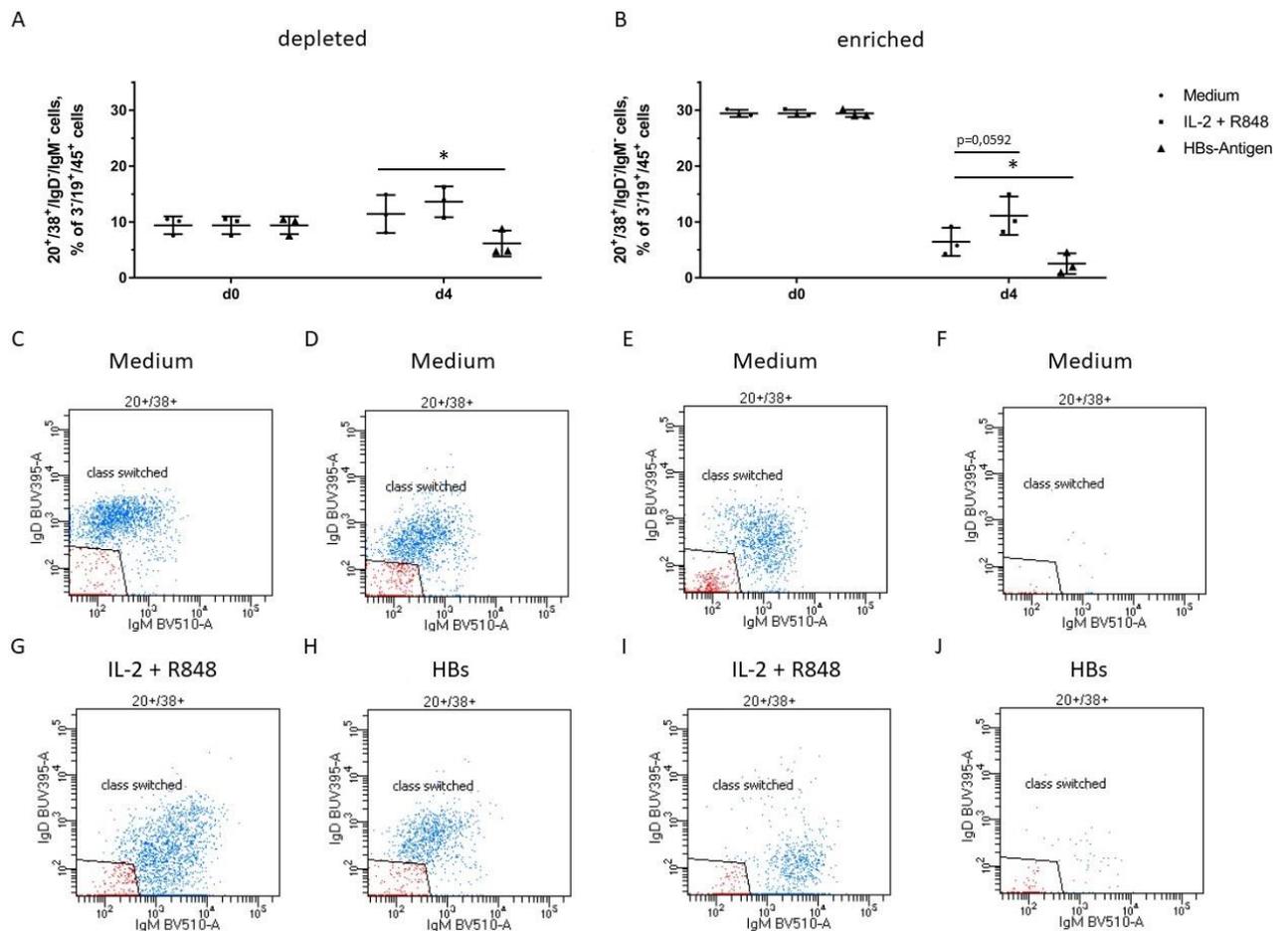


Abbildung 65: Population der class switched B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20^+/CD38^+/IgD^+/IgM^-$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle ($n=3$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=3$) vs. HBs-Stimulation ($n=3$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium $p<0,05$, IL-2+R848 vs. Medium n.s.
[B]: % der $CD20^+/CD38^+/IgD^+/IgM^-$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle ($n=3$) vs. Negativ-Kontrolle ($n=3$) vs. HBs-Stimulation ($n=3$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium $p<0,05$, IL-2+R848 vs. Medium $p=0,0592$
[C]: beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

5.7.2.1.3 B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells

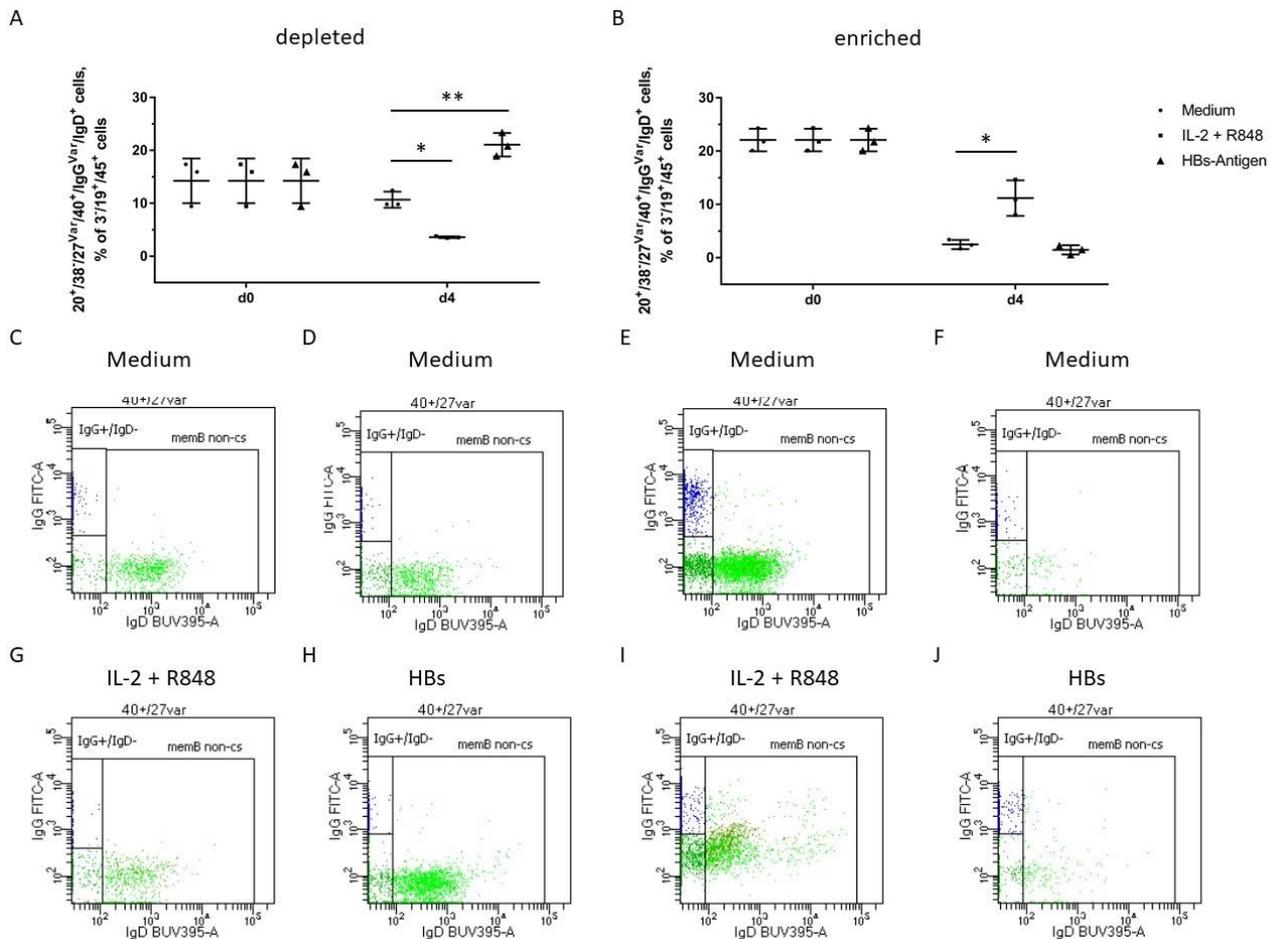


Abbildung 66: Population der non class switched memory B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20^+/CD38^+/CD27^{\text{Var}}/CD40^+/IgG^{\text{Var}}/IgD^+$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium $p < 0,01$, IL-2+R848 vs. Medium $p < 0,05$ **[B]:** % der $CD20^+/CD38^+/CD27^{\text{Var}}/CD40^+/IgG^{\text{Var}}/IgD^+$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium $p < 0,05$ **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

Abschließend erfolgte die Auswertung der Veränderung im Kompartiment der B-Gedächtniszellen. Bei den $CD20^+/CD38^+/CD27^{\text{Var}}/CD40^+/IgG^{\text{Var}}/IgD^+$ non class switched memory B Cells zeigten sich in beiden Isolationsfraktionen unterschiedliche Veränderungen. In der non-memB Fraktion konnte in der HBs-

Antigen Stimulation eine Zunahme des Anteils an B-Lymphozyten gesehen werden. In der Positiv-Kontrolle zeigte sich eine Verringerung dieses Anteils. Beide Veränderungen waren im Vergleich zu Negativ-Kontrolle statistisch signifikant. In der angereicherten memB Fraktion zeigte sich in der HBs-Stimulation eine Abnahme, während der Anteil in der Positiv-Kontrolle zunahm. Diese Veränderung war nur im Vergleich zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle signifikant (Abb. 66).

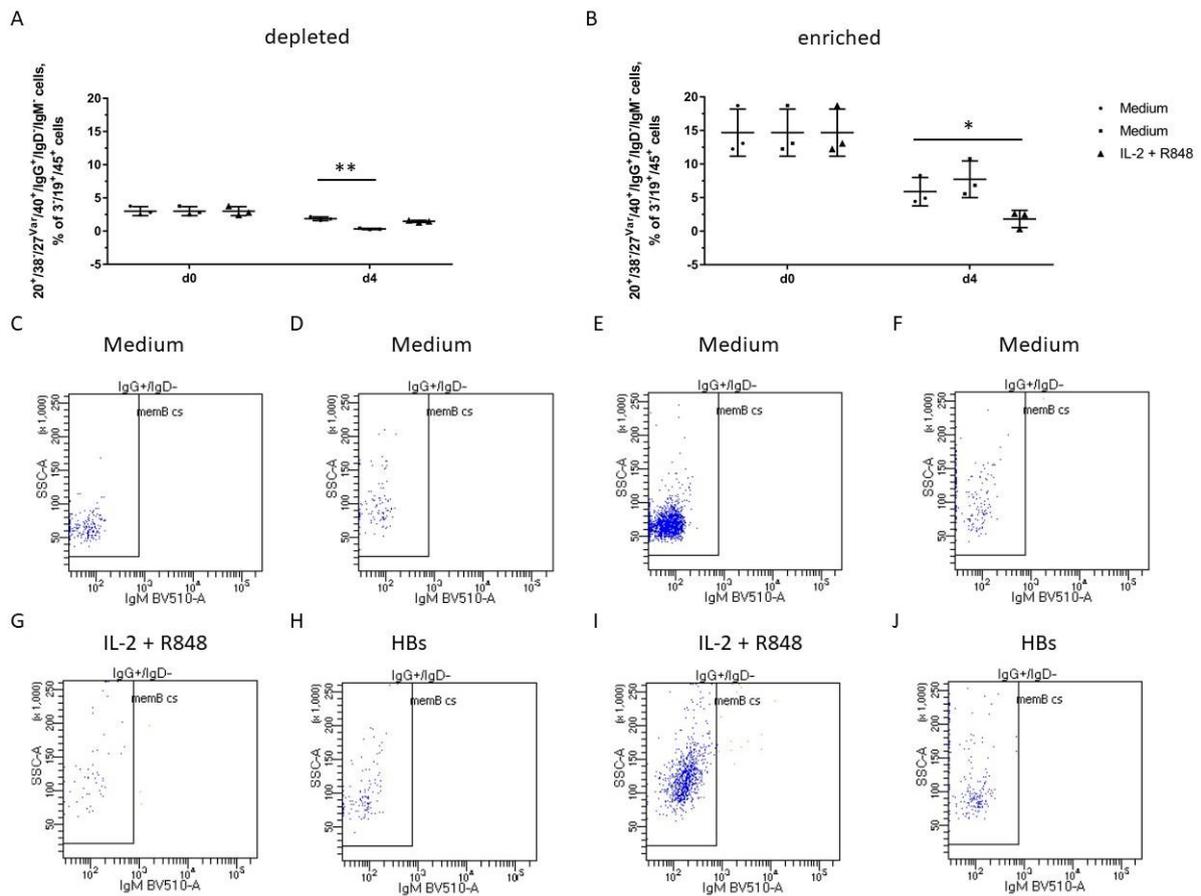


Abbildung 67: Population der class switched memory B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der $CD20^+ / CD38^+ / CD27^{\text{var}} / CD40^+ / \text{IgG}^+ / \text{IgD}^- / \text{IgM}^-$ Zellen an lebenden $CD45^+ / CD3^+ / CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p=<0,01 **[B]:** % der $CD20^+ / CD38^+ / CD27^{\text{var}} / CD40^+ / \text{IgG}^+ / \text{IgD}^- / \text{IgM}^-$ Zellen an lebenden $CD45^+ / CD3^+ / CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium p=<0,05, IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

Ebenso wurden die CD20⁺/CD38⁻/CD27^{var}/CD40⁺/IgG⁺/IgD⁻/IgM⁻ class switched memory B Cells analysiert. In der non-memB Fraktion konnte nur in der Positiv-Kontrolle eine Verringerung des Anteils an den B-Lymphozyten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle beobachtet werden. Diese war statistisch signifikant. In der angereicherten memB Fraktion zeigte sich in der HBs-Antigen Stimulation eine Abnahme, während der Anteil in der Positiv-Kontrolle tendenziell zunahm. Die Abnahme in der HBs-Antigen Stimulation war statistisch signifikant (Abb. 67).

5.7.3 Der funktioneller Assay zeigt eine Veränderung durch die Isolation auf zellulärer Ebene

Als ein Marker der Aktivierung von Lymphozyten wurde wie in den vorherigen FACS-Analysen das Zytokin IFN- γ angefärbt. Zur Kontrolle der zellulären Funktionalität erfolgte in jeder Messung eine Positiv-Kontrolle der IFN- γ Produktion (s. Materialien und Methoden).

5.7.3.1 IFN- γ Produktion in T-Lymphozyten Subpopulationen

Zunächst erfolgte die Analyse von intrazellulärem IFN- γ in den T-Lymphozyten. Es zeigte sich, dass es in der Stimulation der Stimulation mit II-2 und R848 zu einer Aktivierung der IFN- γ Produktion kam. In den CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten konnte bei beiden Isolationsfraktionen eine Erhöhung des prozentualen Anteils an IFN- γ ⁺ Zellen in der Positiv-Kontrolle im Vergleich zur Negativ-Kontrolle beobachtet werden. Diese war nur in der non-memB Fraktion signifikant. In der HBs-Stimulation konnte keine Veränderung beobachtet werden (Abb. 68).

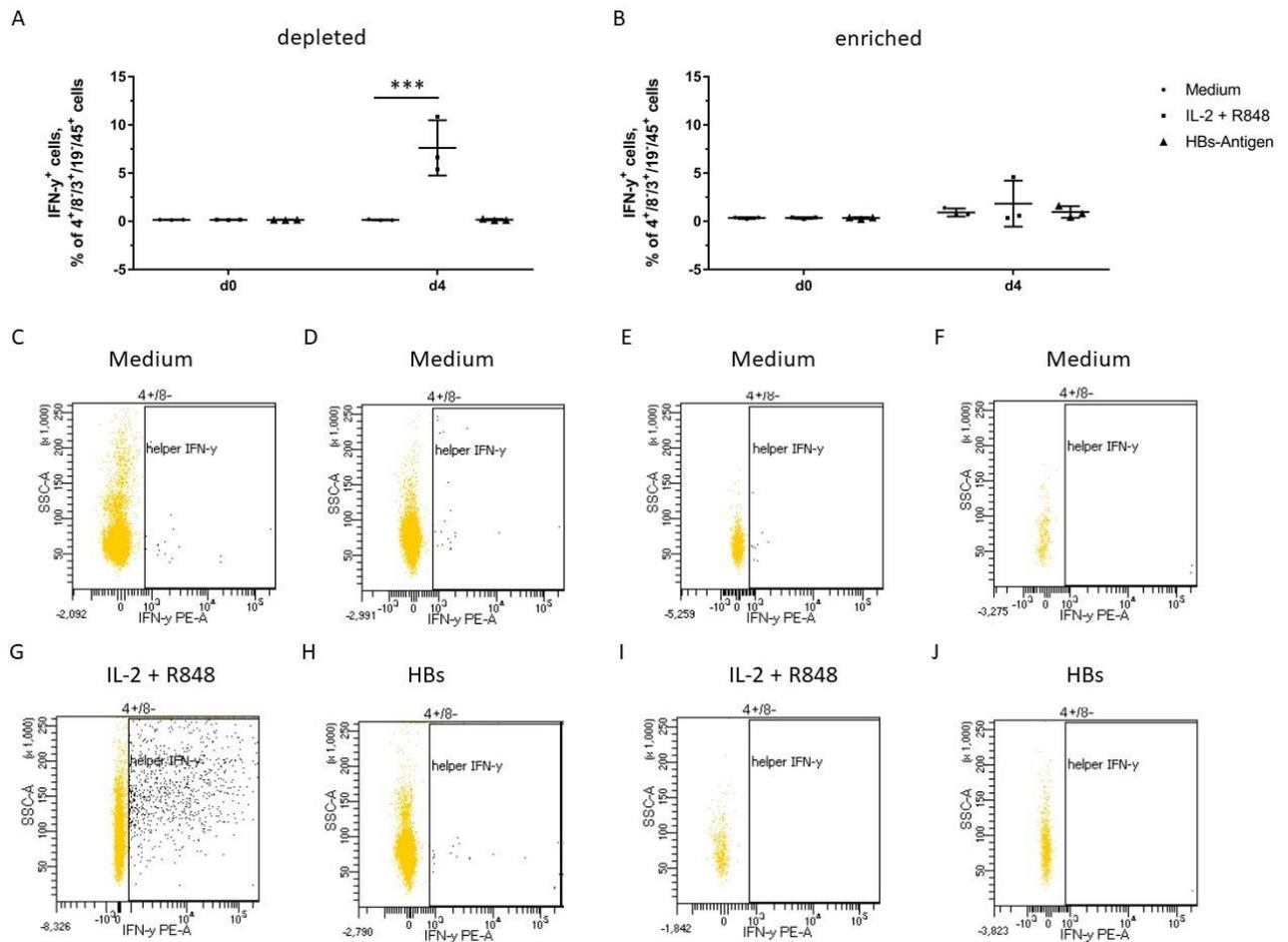


Abbildung 68: Funktionelle IFN- γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ Helfer T-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., Il-2+R848 vs. Medium p<0,001
[B]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., Il-2+R848 vs. Medium n.s. **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

Auch in den CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten war ein signifikant erhöhter prozentualer Anteil in der Positiv-Kontrolle beider Isolationsfraktionen zu sehen. Ebenfalls zeigte sich in der memB Fraktion eine geringe Erhöhung in der Stimulation mit HBs-Antigen. Diese zeigte sich statistisch signifikant. (Abb.69).

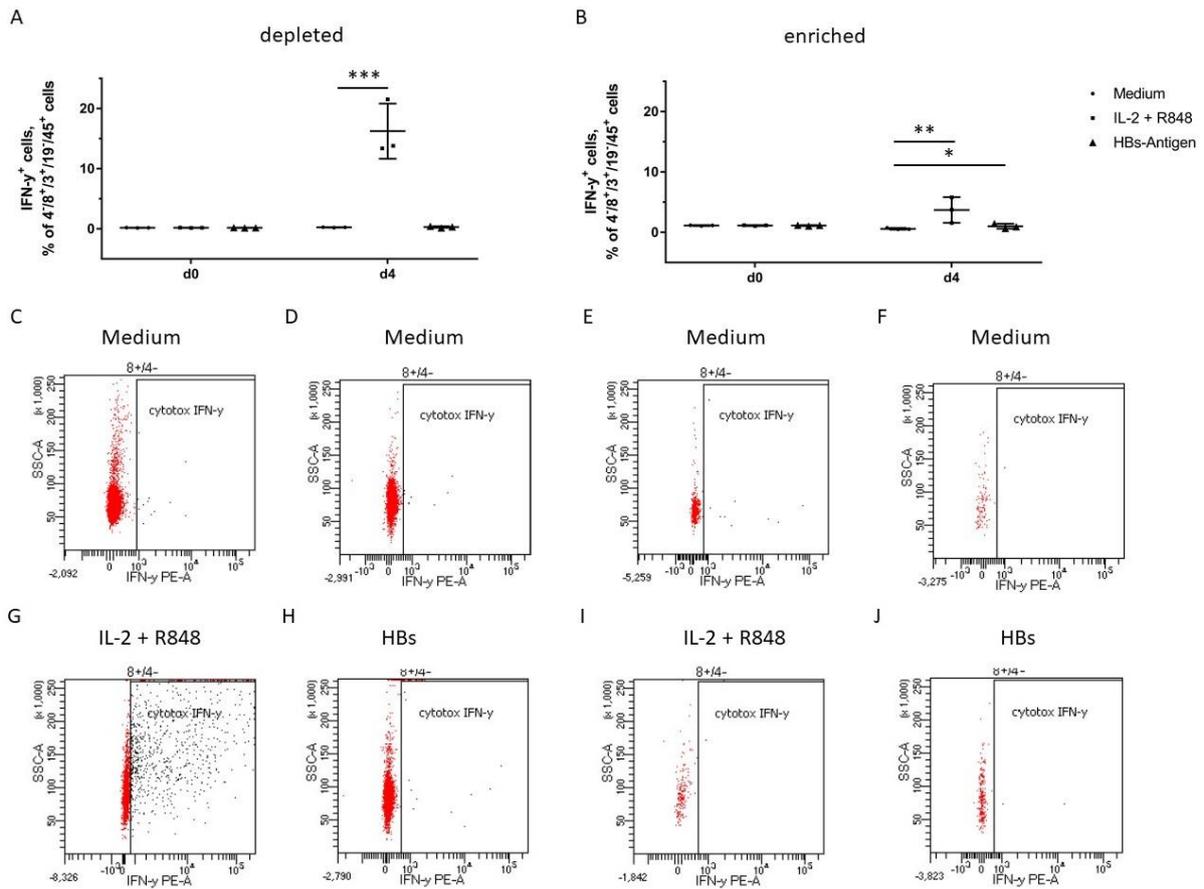


Abbildung 69: Funktionelle IFN- γ Produktion in CD4⁺/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD4⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., Il-2+R848 vs. Medium p=<0,001
[B]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD4⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium p=<0,05, Il-2+R848 vs. Medium p=<0,01
[C]: beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

5.7.3.2 IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten und deren Subpopulationen wird durch Anreicherung und Depletion nur geringfügig beeinflusst

Durch unsere intrazelluläre IFN- γ Färbung aller PBMC, konnte auch die Produktion von IFN- γ in den B-Zell Subpopulationen gemessen werden. Zunächst wurde der Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen an lebenden B-Lymphozyten statistisch analysiert. Dabei zeigte sich in der non-memB Fraktion eine signifikante Abnahme an B-Lymphozyten mit intrazellulär messbarem IFN- γ in der HBs-Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Bei der Positiv-Kontrolle konnte der bereits beobachtete signifikante

Zuwachs im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gesehen werden. In der memB Fraktion konnte diese Beobachtung in der Positiv-Kontrolle ebenfalls gemacht werden. In der Stimulation mit HBs-Antigen zeigte sich jedoch keine Veränderung (Abb. 70).

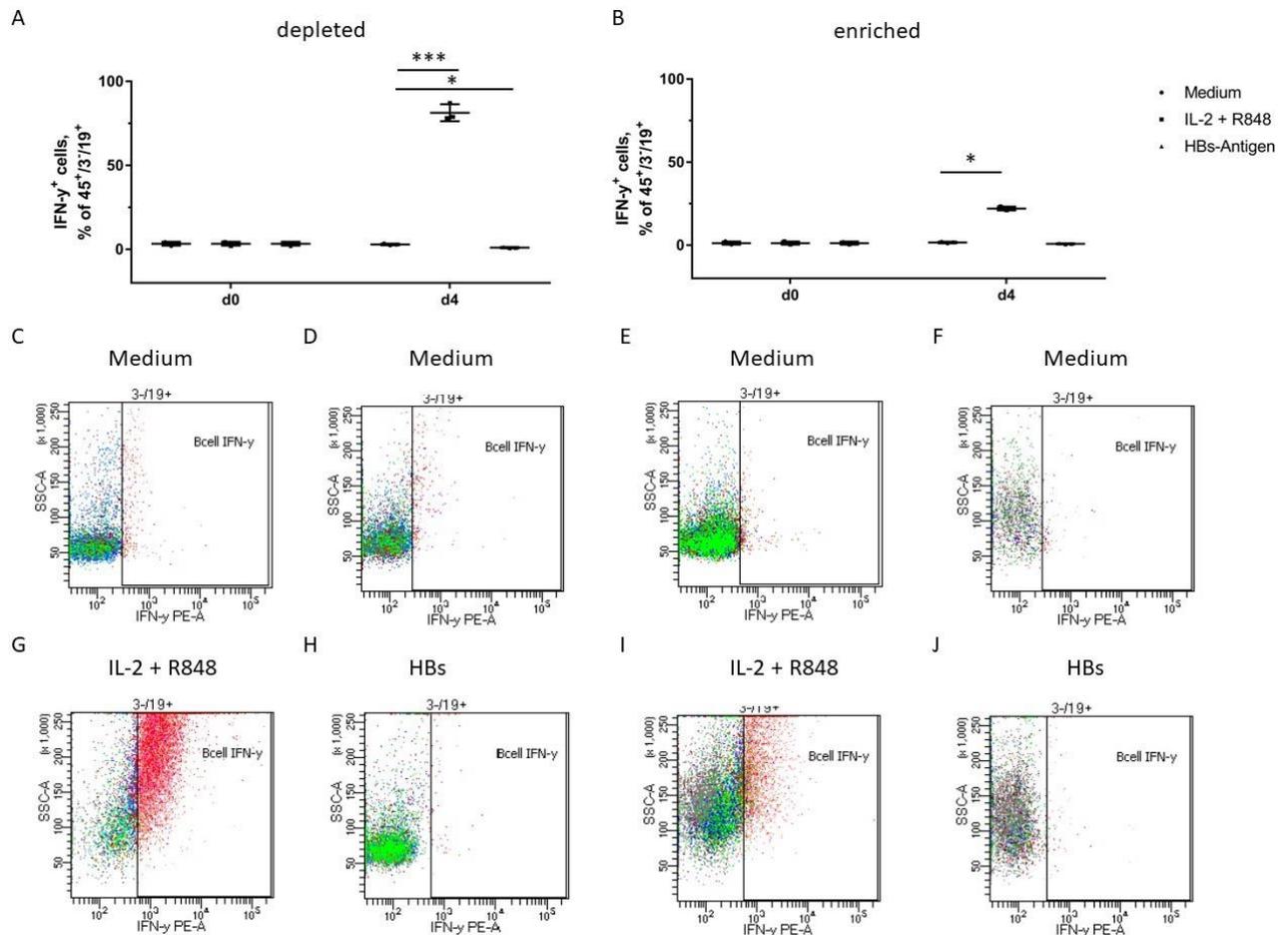


Abbildung 70: Funktionelle IFN- γ Produktion in CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium p<0,05, IL-2+R848 vs. Medium p<0,001 **[B]:** % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p<0,05 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

Analog zu den T-Lymphozyten wurden auch bei den B-Lymphozyten die Subpopulationen untersucht. Bei den Plasmablasten wurde ebenfalls bei beiden Isolationsfraktionen in der Positiv-Kontrolle ein Anstieg des intrazellulär messbaren IFN- γ beobachtet. Dieser war jedoch nur in der memB Fraktion

signifikant. In der non-memB Fraktion zeigte sich zusätzlich eine statistisch signifikante Abnahme des Anteils an den B-Lymphozyten in der HBs-Antigen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Abb. 71).

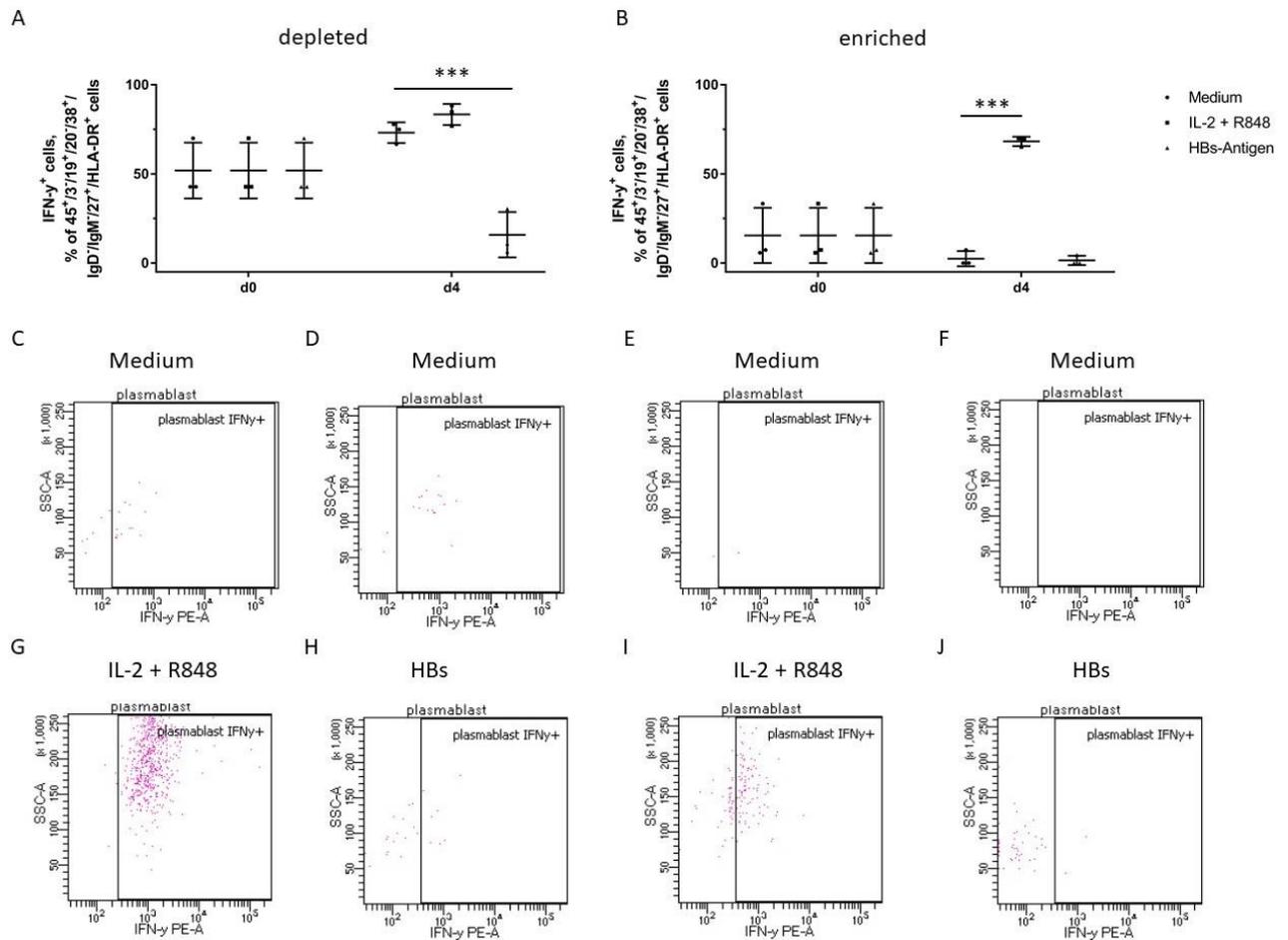


Abbildung 71: Funktionelle IFN- γ Produktion in Plasmablasten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁺/IgM⁺/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmablasten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium p=<0,001, IL-2+R848 vs. Medium n.s. **[B]:** % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁺/IgM⁺/CD27⁺/HLA-DR⁺ Plasmablasten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium p=<0,001, IL-2+R848 vs. Medium p=<0,001 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

Als ebenfalls antikörperproduzierende Subpopulation wurde das intrazelluläre IFN- γ auch bei den Plasmazellen beobachtet. Hier wurde jedoch auf eine statistische Auswertung verzichtet, da es nur sehr geringe Frequenzen dieser Subpopulation gab. Dadurch kam es zu einer starken Streuung der Ergebnisse mit fehlender Aussagekraft.

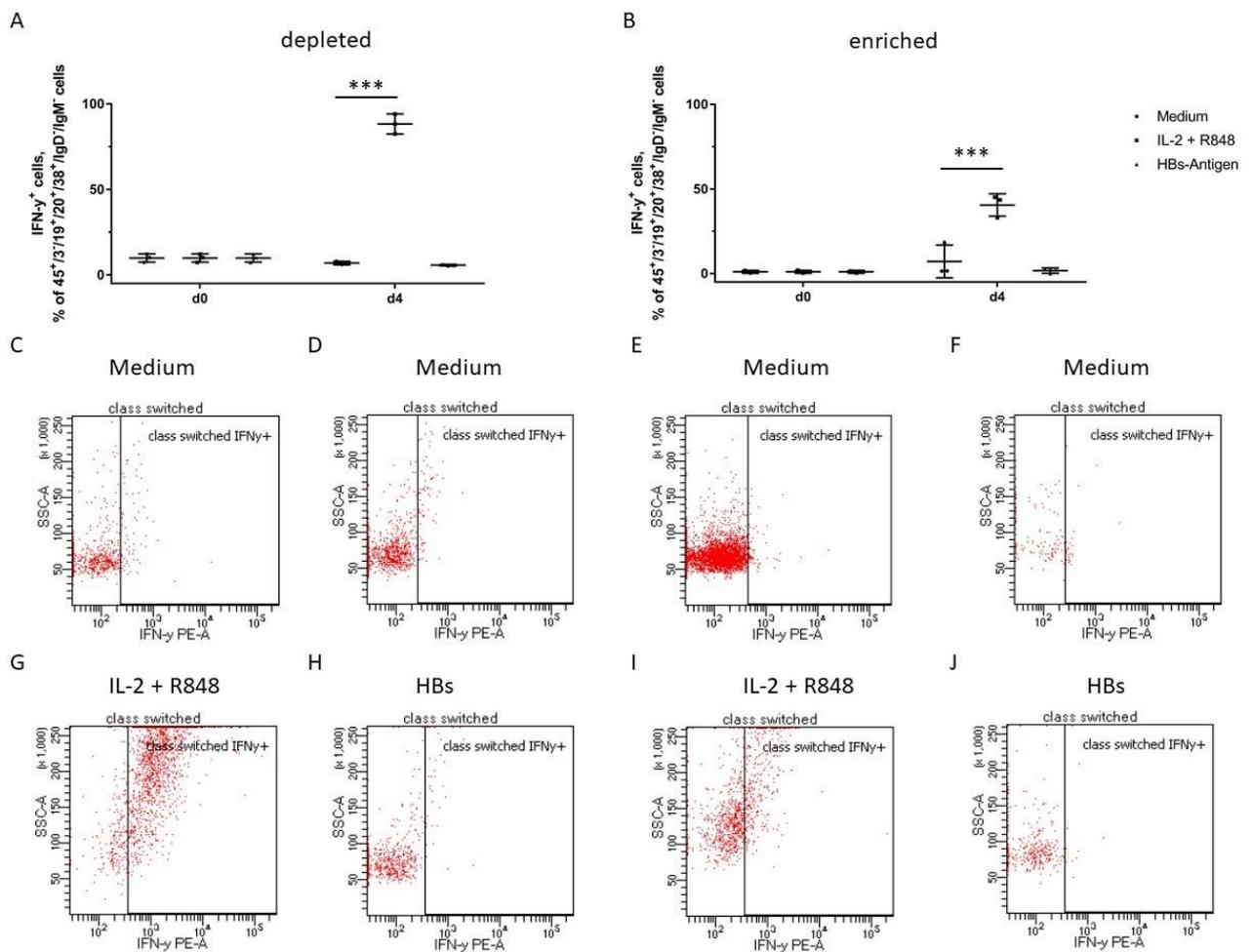


Abbildung 72: Funktionelle IFN- γ Produktion in class switched B-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium $p < 0,001$. **[B]:** % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium $p < 0,001$ **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

Wie auch bei den B-Lymphozyten zeigte sich in der Subpopulation der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻ class switched B-Zellen Veränderungen des intrazellulär messbaren IFN- γ . In der Positiv-Kontrolle zeigte sich die bereits in vorhergehenden Experimenten beschriebene statistisch signifikante Zunahme in beiden Isolationsfraktionen, wobei die Zunahme in der non-memb

Fraktion stärker ausfiel. In der HBs-Stimulation konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (Abb. 72).

Bei den non class switched memory B-Lymphozyten wurde in beiden Isolationsfraktionen durch die Stimulation mit HBs-Antigen keine statistisch signifikante Erhöhung der IFN- γ ⁺ Produktion erreicht. In der Positiv-Kontrolle wurde jedoch in beiden Isolationsfraktionen eine statistisch signifikante Erhöhung des intrazellulären IFN- γ im Vergleich zur Negativ-Kontrolle beobachtet (Abb. 73).

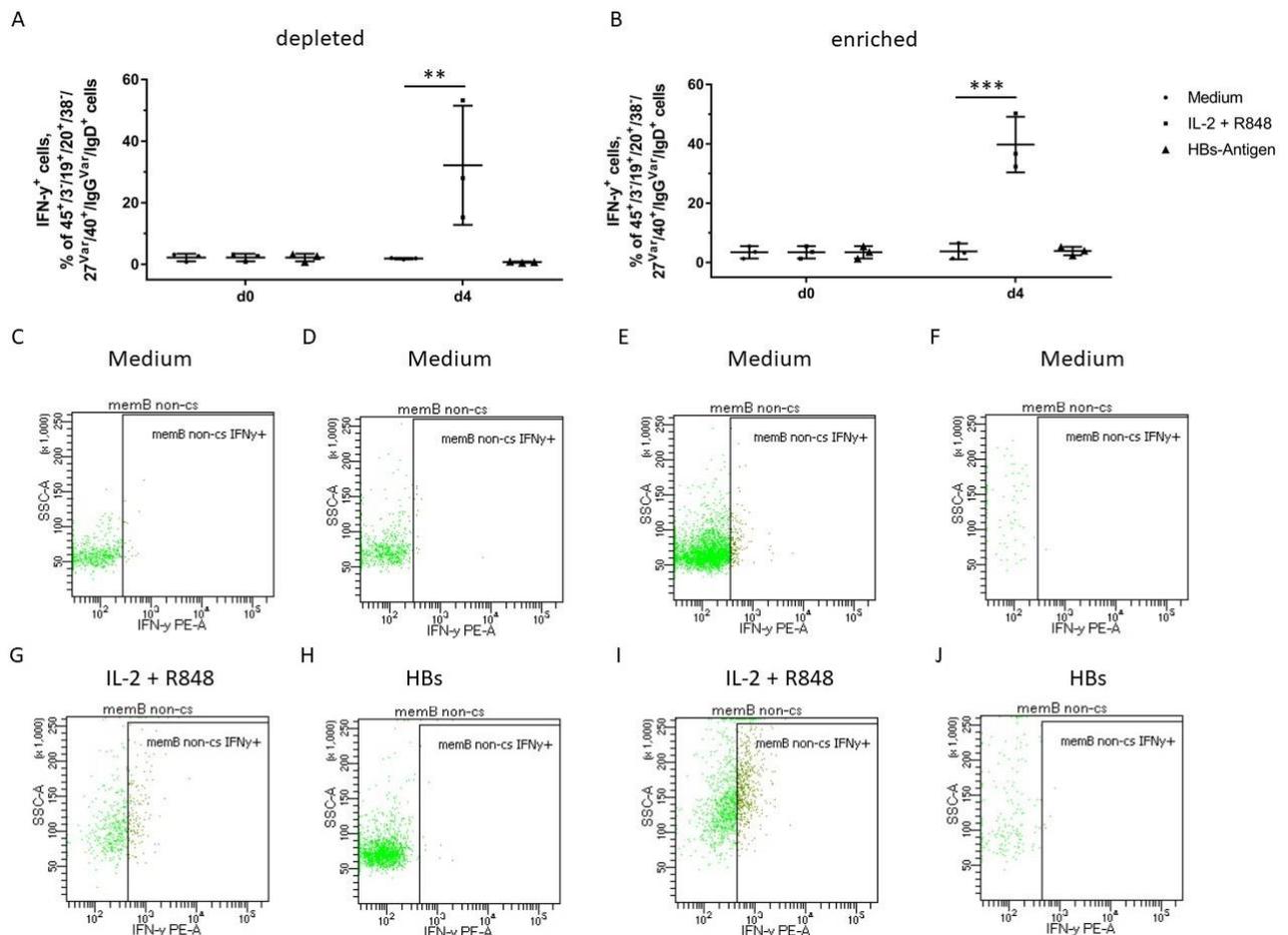


Abbildung 73: Funktionelle IFN- γ Produktion in non class switched memory B-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/CD27^{Var}/CD40⁺/IgG^{Var}/IgD⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p=<0,01. **[B]:** % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/CD27^{Var}/CD40⁺/IgG^{Var}/IgD⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium p=<0,001 **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion 05 **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

In der Subpopulation der class switched memory B-Lymphozyten konnte eine nicht signifikante Verringerung der IFN- γ ⁺ in der HBs-Stimulation beobachtet werden. Diese war in der non-memB Fraktion stärker ausgeprägt, jedoch nicht signifikant ($p=0,0751$). In der Positiv-Kontrolle zeigte sich eine in beiden Isolationsfraktionen statistisch signifikante Erhöhung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Abb. 74).

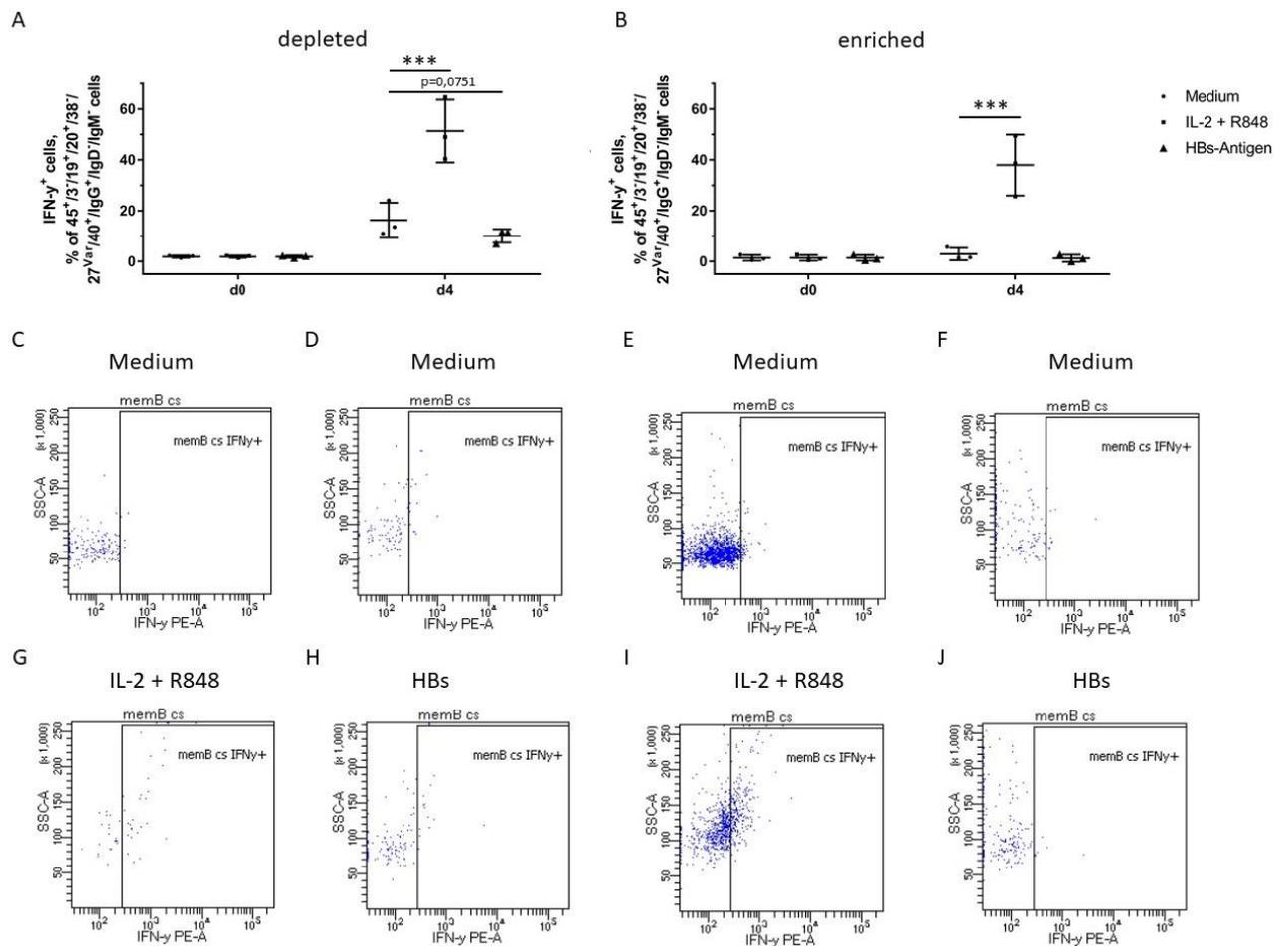


Abbildung 74: Funktionelle IFN- γ Produktion in class switched memory B-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen

[A]: % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁻/CD27^{var}/CD40⁺/IgG⁺/IgD⁺/IgM⁻ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, depletierte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium $p=0,0751$, IL-2+R848 vs. Medium $p<0,001$. **[B]:** % der IFN- γ ⁺ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁻/CD27^{var}/CD40⁺/IgG⁺/IgD⁺/IgM⁻ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, angereicherte PBMC-Fraktion, Positiv-Kontrolle (n=3) vs. Negativ-Kontrolle (n=3) vs. HBs-Stimulation (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. multipler t-Test: HBs vs. Medium n.s., IL-2+R848 vs. Medium $p<0,001$ **[C]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, depletierte Fraktion **[D]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, depletierte Fraktion **[E]:** beispielhafter FACS-Dotplot an d0, angereicherte Fraktion **[F]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Negativ-Kontrolle an d4, angereicherte Fraktion **[G]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[H]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion **[I]:** beispielhafter FACS-Dotplot der Positiv-Kontrolle d4, depletierte Fraktion **[J]:** beispielhafter FACS-Dotplot der HBs-Stimulation an d4, angereicherte Fraktion

5.8 Vergleich der PBMC vs. memB vs. non-memB durch Ratios

Um nun die Veränderungen in den unterschiedlichen Fraktionen der MACS-Separation besser bewerten zu können, wurde ein statistischer Vergleich mit den PBMC aus den vorhergehenden Stimulationen mit adjuvansfreien HBs-Antigen durchgeführt. Da kein Unterschied der Populationen an Tag 0, vor Beginn der Stimulationsperiode besteht, wurde zunächst gegen die Stimulation in Kulturmedium normalisiert. Die so erhaltenen Ratios wurden anschließend statistisch ausgewertet.

5.8.1 T-Lymphozyten werden durch die memB Zell Separation beeinflusst

Zunächst wurden die Veränderungen in der T-Zell Population untersucht und verglichen. Dabei zeigte sich, dass es sowohl in der HBs-Antigen Stimulation als auch der Positiv-Kontrolle zu Entwicklungen gekommen ist. Während sich der Anteil der T-Zellen in der HBs-Stimulation an lebenden Leukozyten bei Gesamt-PBMC und der non-memB Fraktion nur geringfügig positiv veränderte, sank dieser Anteil in den memB-Fraktion ab. Diese Abnahme zeigte sich im Vergleich zu Gesamt-PBMC statistisch signifikant und zur non-memB Fraktion tendenziell ($p=0,0557$). In der Positiv-Kontrolle sank der Anteil in der memB und non-memB Fraktion im Vergleich zu Gesamt-PBMC statistisch signifikant ab (Abb. 75).

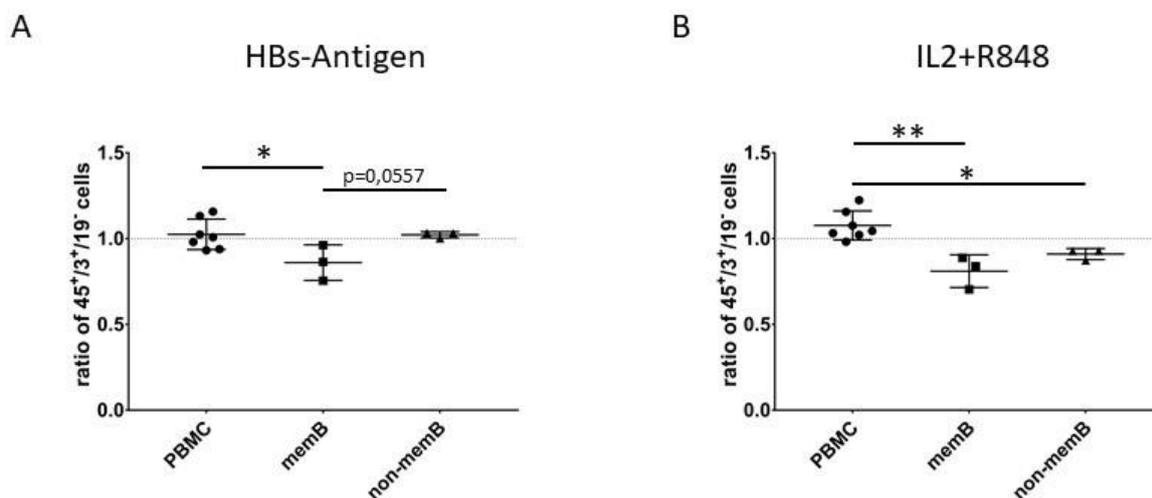


Abbildung 75: Ratios der CD3⁺/CD19⁻ T-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fractionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB $p<0,05$, PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB $p=0,0557$ **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB $p<0,01$, PBMC vs. non-memB $p<0,05$, memB vs. non-memB n.s.

5.8.1.1 CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen der T-Lymphozyten bleiben anteilig stabil

Ebenso erfolgte die weitere statistische Analyse der T-Lymphozyten Subpopulationen. Dabei zeigte sich in der Auswertung im Verlauf über vier Tage, weder bei den CD4⁺/CD8⁻ T Helfer Zellen (Abb. 76), noch bei den CD4⁺/CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Abb. 77) ein signifikanter Unterschied der drei Gruppen. Diese Beobachtung war in beiden Stimulationen zu machen.

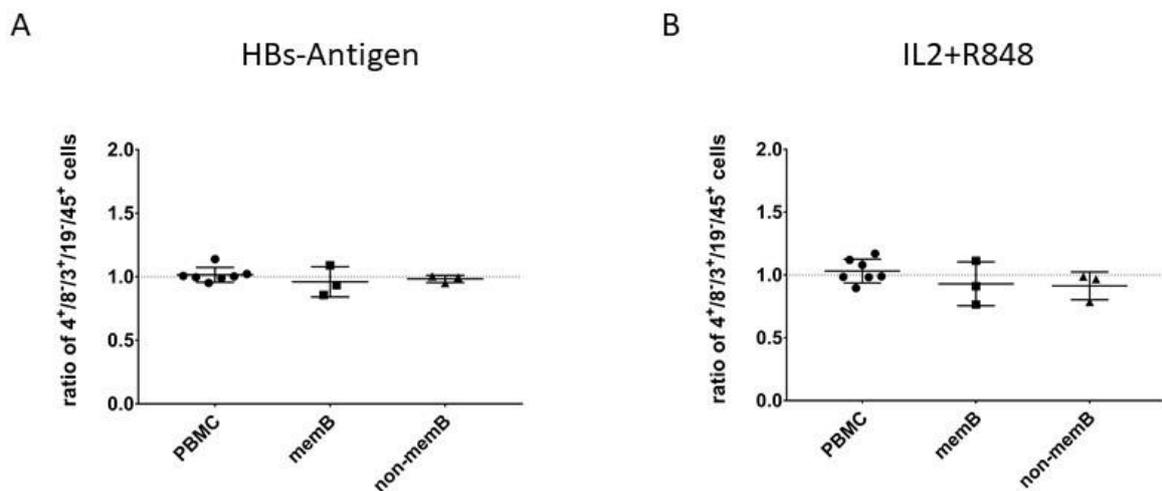


Abbildung 76: Ratios der CD4⁺/CD8⁻ T-Helfer Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s.

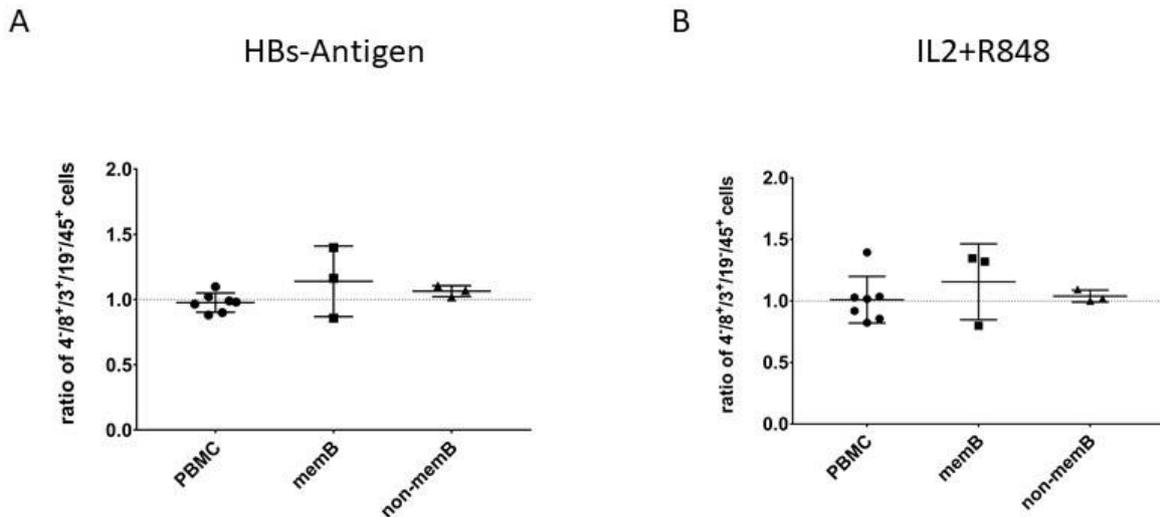


Abbildung 77: Ratios der CD4/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der CD4/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit Il-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der CD4/CD8⁺ T-Lymphozyten aus allen lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s.

5.8.2 Die Separation hat bei den B-Lymphozyten verschiedene Einflüsse

Als hauptsächlich von der MACS-Isolation beeinflusste Population, war die statistische Auswertung der Ratios in den B-Lymphozyten und deren Subpopulationen von besonderem Interesse. Dazu wurden zunächst die CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten an lebenden CD45⁺ Leukozyten in den Stimulationen im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt d4 statistisch ausgewertet. In der HBs-Stimulation kam es in allen drei Gruppen zu einem Anstieg. Dabei konnte jedoch ein statistisch signifikant niedrigerer Anstieg in der non-memB Fraktion im Vergleich zur memB Fraktion beobachtet werden. Bei der Stimulation mit Il-2 und R838 zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der Ratio in den B-Lymphozyten. Dieser fiel bei der non-memB Fraktion im Vergleich zur memB Fraktion signifikant höher aus (Abb. 78).

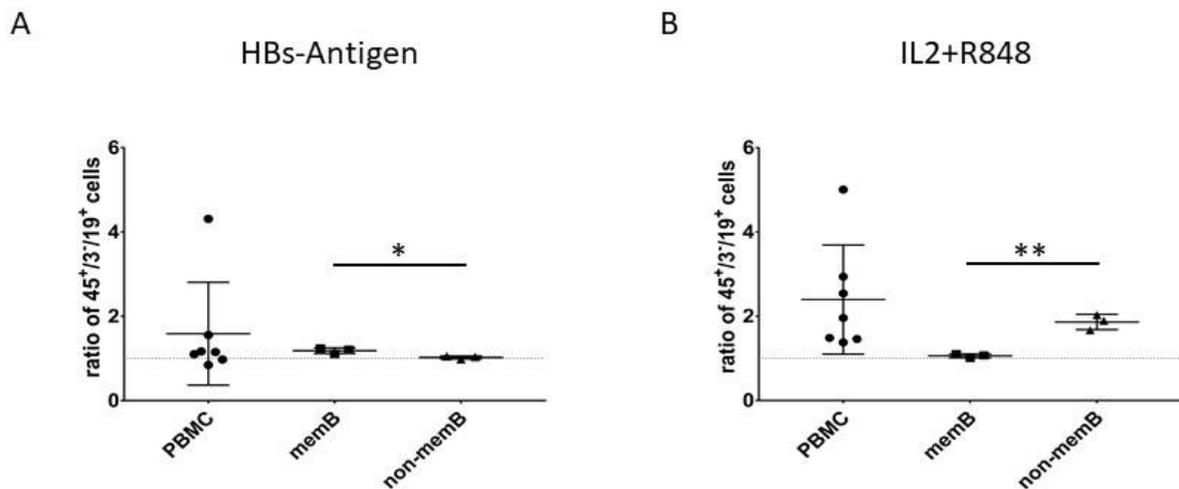


Abbildung 78: Ratios der $CD45^+/CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fractionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der $CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten aus allen lebenden $CD45^+$ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC ($n=7$) vs. memB Fraktion ($n=3$) vs. non-memB Fraktion ($n=3$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB $p<0,05$. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der $CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten aus allen lebenden $CD45^+$ Leukozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC ($n=7$) vs. memB Fraktion ($n=3$) vs. non-memB Fraktion ($n=3$), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB $p<0,05$

5.8.2.1 Subpopulationen der B-Lymphozyten

Ebenfalls wurden die Ergebnisse der vorhergehenden Experimente, in Bezug auf die Subpopulationen der B-Lymphozyten ausgewertet.

5.8.2.1.1 Antikörperproduzierende Zellen: Plasmablasten und Plasmazellen

Dabei zeigte sich in den Gesamt-PBMC und der non-memB Fraktion bei Stimulation mit HBs-Antigen beim prozentualen Anteil der $CD20^-/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten an lebenden $CD45^+/CD3^-/CD19^+$ B-Lymphozyten, im Verlauf über vier Tage eine zunehmende Erhöhung. In der memB Fraktion zeigte sich keine entsprechende Veränderung im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle. In der Positiv-Kontrolle zeigten sich starke Erhöhungen der Ratio in den Gesamt-PBMC und den non-memB. Ebenfalls war eine, wenngleich geringerer, Anstieg in der memB-Fraktion zu beobachten. Es ist zu beachten, dass durch das Fehlen von Plasmablasten in einer Negativ-Kontrolle der memB-Fraktion

hier nur zwei Messpunkte einfließen konnten. Keine der Veränderungen zeigte sich in der statistischen Auswertung signifikant (Abb. 79).

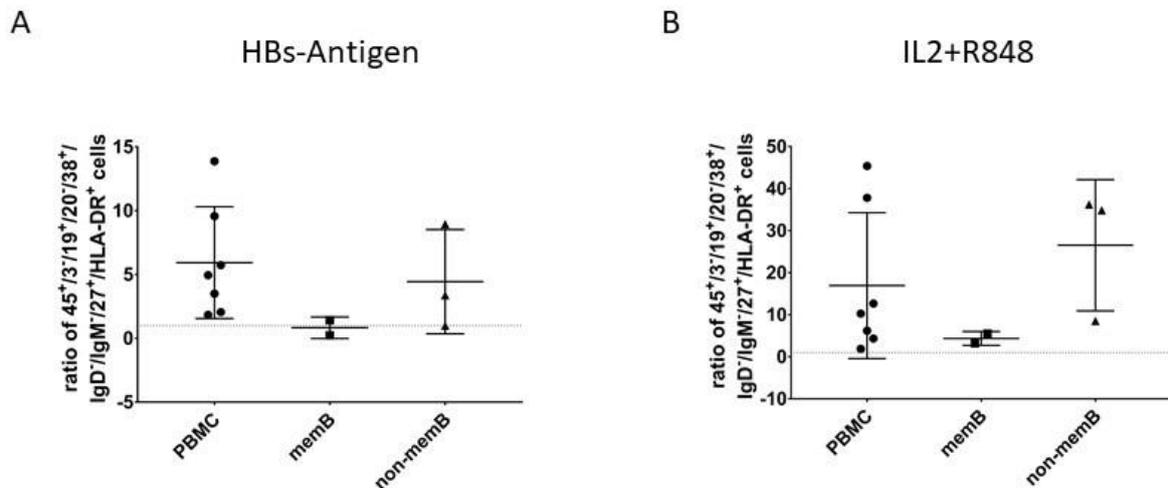


Abbildung 79: Ratios der Plasmablasten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=2) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Plasmablasten an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=2) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s.

Bei den Plasmazellen, die durch ihre Antigene aus den B-Lymphozyten gegatet werden konnten, zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Veränderung innerhalb des Beobachtungszeitraums. Es waren nur sehr geringe Frequenzen dieser Population in beiden Isolationsfraktionen zu beobachten, jedoch werden diese Ergebnisse aus Gründen der Vollständigkeit dargestellt. Ebenfalls zeigt sich, durch die fehlende Möglichkeit der Berechnung eines Verhältnisses auf Grundlage von 0% $CD20^+/CD38^+/IgD^-/IgM^-/CD27^+/HLA-DR^+$ Zellen von B-Lymphozyten in der Negativ-Kontrolle der memB Fraktion, eine deutliche Limitation der statistischen Analyse und Bewertung (Abb. 80).

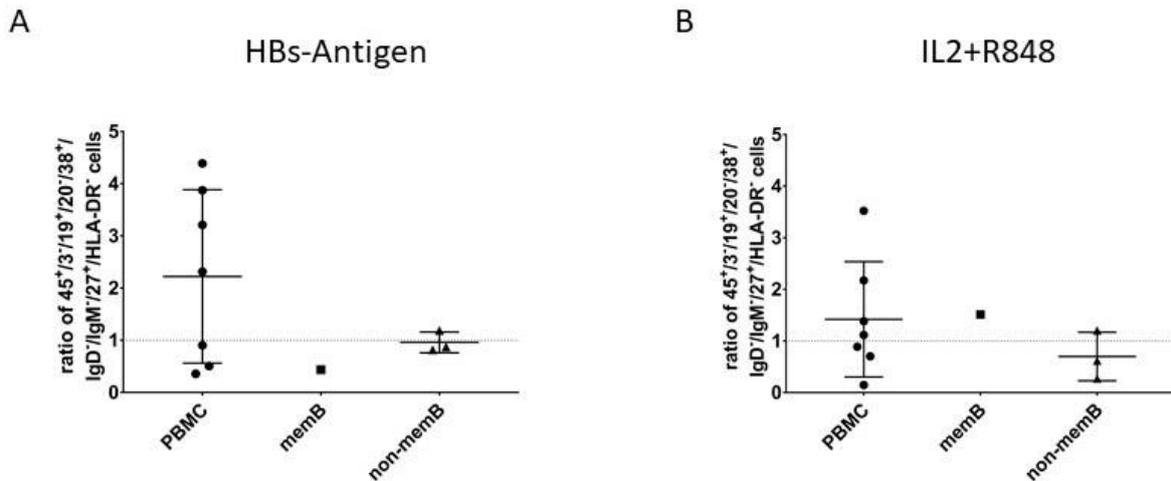


Abbildung 80: Ratios der Plasmazellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fractionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁺/HLA-DR⁻ Plasmazellen an lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=1) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD27⁺/HLA-DR⁻ Plasmazellen an lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁺ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=1) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s.

5.8.2.1.2 Isotypengewechselte B-Zellen: Class switched B Cells

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Entwicklung der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺/CD20⁺/CD38⁺/IgD⁻/IgM⁻ class switched B-Zellen. Dabei zeigten sich bereits im MACS-Experiment in beiden Isolationsfraktionen ähnliche Veränderungen. In der Stimulation mit HBs-Antigen konnte eine Abnahme des Verhältnisses an B-Lymphozyten zur Negativ-Kontrolle in allen Gruppen beobachtet werden. Diese war jedoch nur tendenziell zu sehen. Die deutlichere Tendenz bestand im Vergleich der Ratios der Gesamt-PBMC mit der memB Fraktion (p=0,0891). Im Gegensatz dazu kam es zu einer Erhöhung des Anteils der class switched B-Zellen in der Positiv-Kontrolle in den Isolationsfraktionen. Diese war in Vergleich der Ratios der Gesamt-PBMC mit der memB Fraktion statistisch signifikant (Abb. 81).

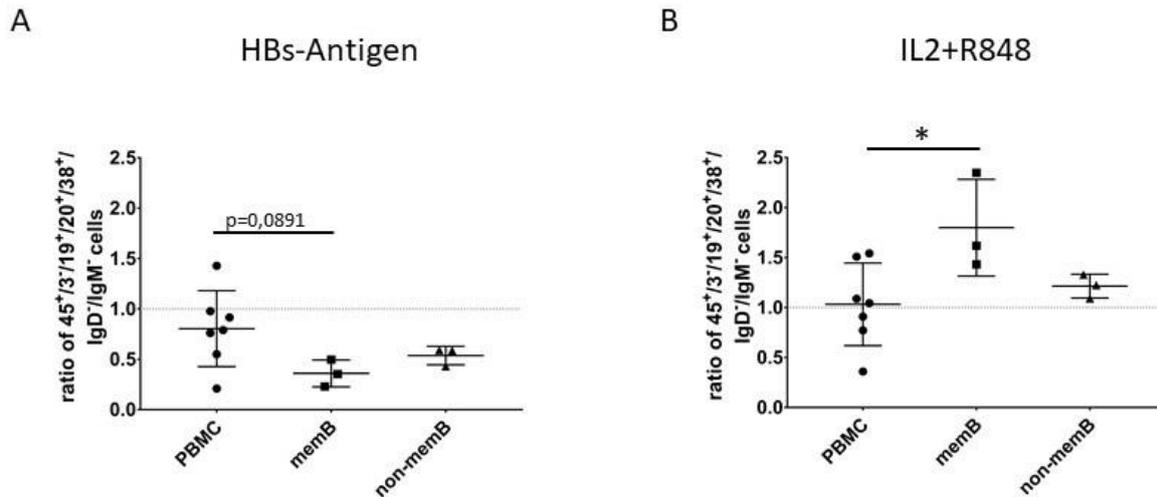


Abbildung 81: Ratios der class switched B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^+/CD38^+/IgD^+/IgM^-$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB $p=0,0891$, PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^+/CD38^+/IgD^+/IgM^-$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB $p<0,05$, PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s.

5.8.2.1.3 B-Gedächtniszellen: Non class switched memory B Cells und class switched memory B Cells

Abschließend erfolgte statistische Auswertung der Veränderung der Verhältnisse von Stimulation zu Negativ-Kontrolle im Kompartiment der B-Gedächtniszellen. Bei den $CD20^+/CD38^+/CD27^{Var}/CD40^+/IgG^{Var}/IgD^+$ non class switched memory B Cells zeigten sich in der HBs-Stimulation unterschiedliche Tendenzen. Während in den Gesamt-PBMC eine Abnahme des Verhältnisses zu beobachten war, sank auch das Verhältnis in der memB Fraktion. In der non-memB Fraktion konnte eine Zunahme des Anteils an B-Lymphozyten gesehen werden, der signifikant zur memB Fraktion und den Gesamt-PBMC war. In der Positiv-Kontrolle zeigte sich eine Verringerung des Verhältnisses in den Gesamt-PBMC und der non-memB Fraktion. Beide Veränderungen waren im Vergleich zur Erhöhung der Ratio in der memB Fraktion statistisch signifikant (Abb.82).

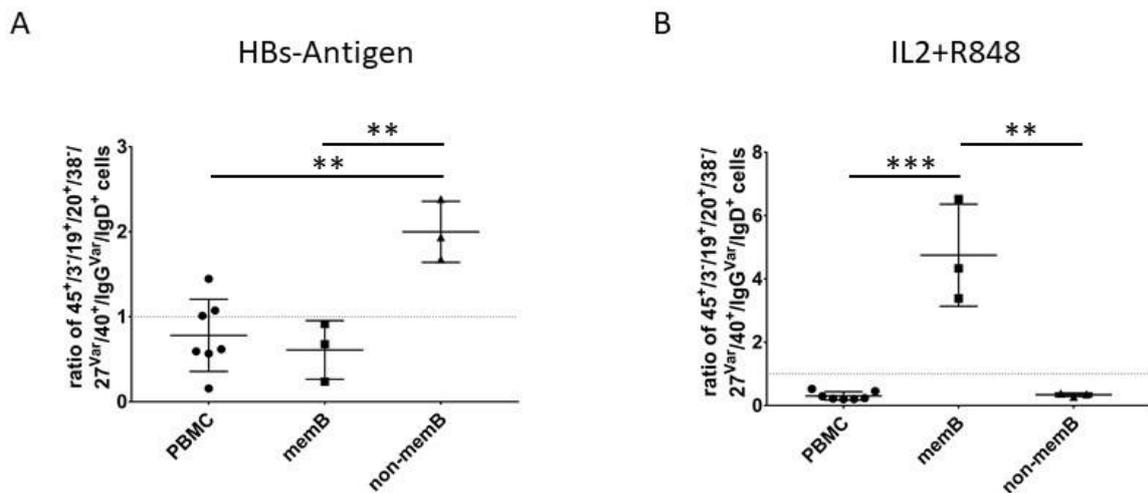


Abbildung 82: Ratios der non class switched memory B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^+/CD38^-/CD27^{Var}/CD40^+/IgG^{Var}/IgD^+$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB $p < 0,01$, memB vs. non-memB $p < 0,01$ **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^+/CD38^-/CD27^{Var}/CD40^+/IgG^{Var}/IgD^+$ Zellen an lebenden $CD45^+/CD3^+/CD19^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB $p < 0,001$, PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB $p < 0,01$

Abschließend wurden die Verhältnisse der $CD20^+/CD38^-/CD27^{Var}/CD40^+/IgG^+/IgD^-/IgM^-$ class switched memory B Cells analysiert. In HBs Stimulation kam es in allen Gruppen zum Absinken der Ratios. Am deutlichsten war dieser Abfall bei der memB Fraktion zu beobachten. Dieser war im Vergleich zur non-memB Fraktion nicht statistisch signifikant ($p=0,0618$). Auch der Vergleich von Gesamt-PBMC zur non-memB Fraktion war nicht statistisch signifikant ($p=0,1024$). In der Positiv-Kontrolle zeigte sich eine Verringerung des Verhältnisses in den Gesamt-PBMC und der non-memB Fraktion. Beide Veränderungen waren dabei im Vergleich zur Erhöhung der Ratio in der memB Fraktion statistisch signifikant (Abb. 83).

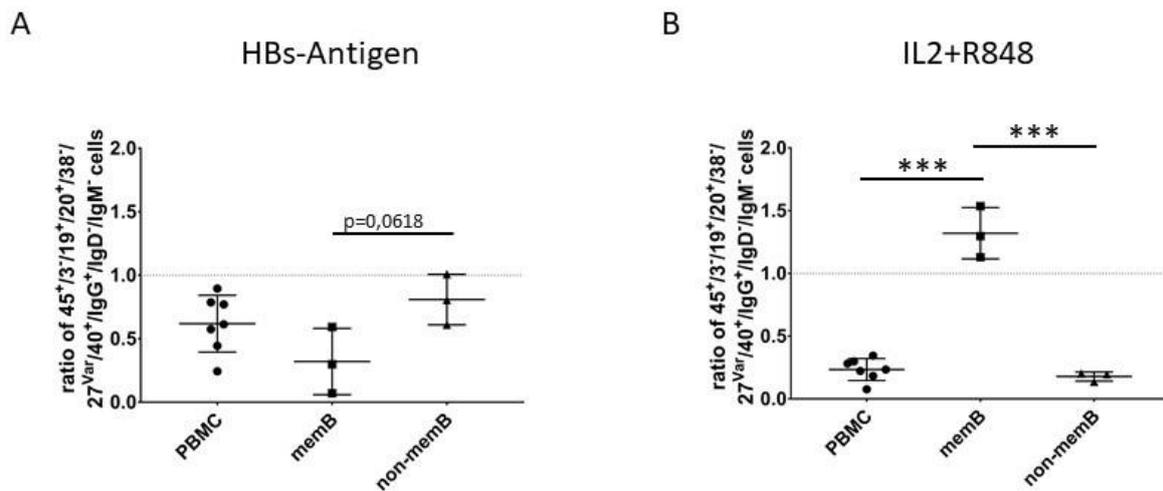


Abbildung 83: Ratios der class switched memory B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^{+}/CD38^{-}/CD27^{Var}/CD40^{+}/IgG^{+}/IgD^{+}/IgM^{+}$ Zellen an lebenden $CD45^{+}/CD3^{-}/CD19^{+}$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB $p=0,1024$, memB vs. non-memB $p=0,0618$ **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der $CD20^{+}/CD38^{-}/CD27^{Var}/CD40^{+}/IgG^{+}/IgD^{+}/IgM^{+}$ Zellen an lebenden $CD45^{+}/CD3^{-}/CD19^{+}$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB $p<0,001$, PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB $p<0,001$

5.8.3 Der funktionelle Assay zeigt Unterschiede in der Stimulationsantwort

Auch die Verhältnisse des funktionellen Markers IFN- γ in den Subpopulationen der Leukozyten wurde entsprechend untersucht.

5.8.3.1 IFN- γ Produktion in T-Lymphozyten Subpopulationen

In den $CD4^{+}/CD8^{-}$ T-Lymphozyten konnte bei der Stimulation mit HBs-Antigen bei allen Gruppen eine durchschnittliche Erhöhung des Verhältnisses des prozentualen Anteils an IFN- γ^{+} Zellen zur Negativ-Kontrolle beobachtet werden. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede gesehen werden. In der Stimulation mit IL-2+R848 zeigte sich bei allen Gruppen eine deutlichere Erhöhung des Verhältnisses. Diese war bei der non-memB Fraktion stärker ausgeprägt als bei den anderen beiden Gruppen und bei den Gesamt-PBMC wiederum stärker als in der memB Fraktion. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jeweils statistisch signifikant (Abb. 84). Auch in den $CD4^{-}/CD8^{+}$ T-Lymphozyten waren ähnliche Beobachtungen wie bei den T Helfer Zellen zu machen. In der HBs-Stimulation zeigte sich ebenfalls keine statistische Signifikanz. In der Positiv-Kontrolle konnte im Vergleich der Verhältnisse von Gesamt-PBMC und memB Fraktion nur ein tendenzieller Unterscheid beobachtet werden ($p=0,0845$). Die Erhöhung in der non-memB Fraktion war im Vergleich zu Gesamt-PBMC und memB Fraktion signifikant stärker ausgeprägt (Abb.85).

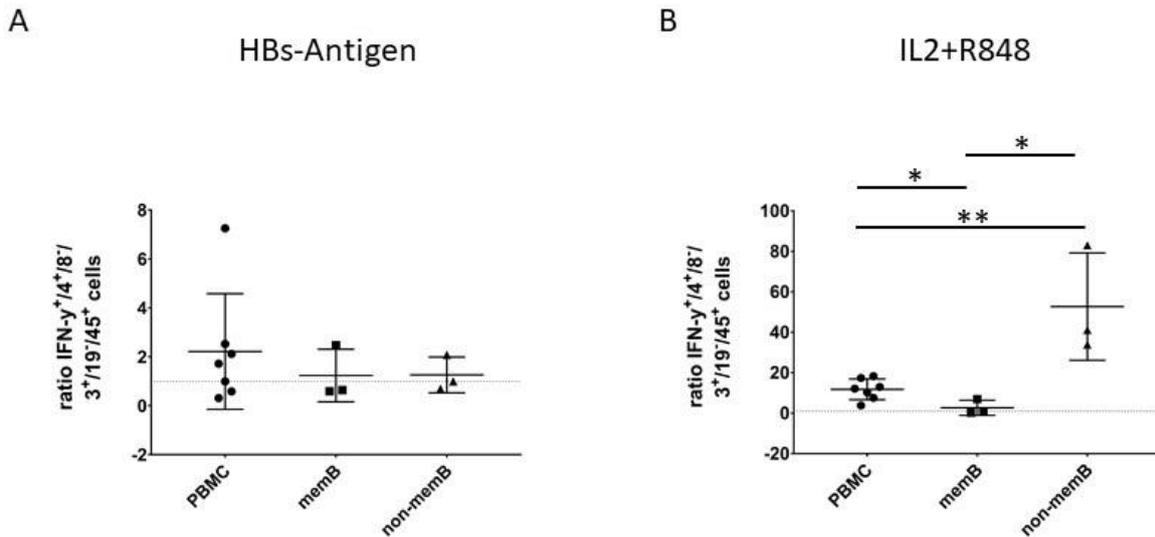


Abbildung 84: Ratio der funktionellen IFN- γ Produktion in CD4⁺/CD8⁺ Helfer T-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fractionen

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB p<0,05, PBMC vs. non-memB p<0,01, memB vs. non-memB p<0,05

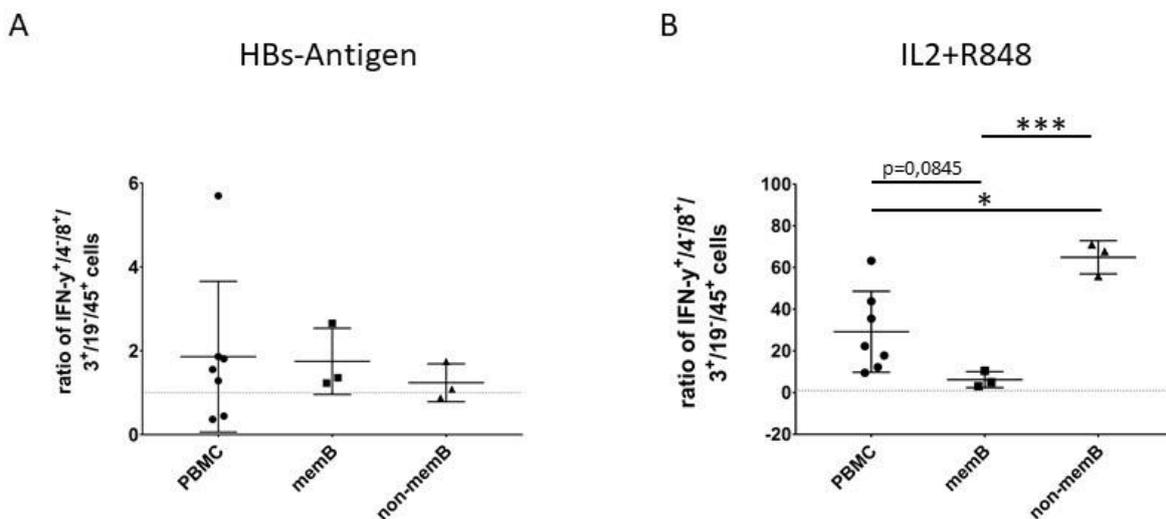


Abbildung 85: Ratio der funktionellen IFN- γ Produktion in CD4⁺/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fractionen

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45⁺/CD3⁺/CD19⁻/CD4⁺/CD8⁻ T-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB p<0,0845, PBMC vs. non-memB p<0,05, memB vs. non-memB p<0,001

5.8.3.2 IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten und deren Subpopulationen

Auch im Verhältnis der IFN- γ produzierenden Zellen an lebenden B-Lymphozyten zeigten sich Unterschiede. In der Stimulation mit HBs-Antigen zeigte sich eine Abnahme des Verhältnisses in allen Gruppen ohne signifikanten Unterschied. In der Positiv-Kontrolle konnte eine deutliche Zunahme der Verhältnisse zur Negativ-Kontrolle beobachtet werden. Dabei war diese in der non-memB Gruppe signifikant am stärksten ausgeprägt. Zwischen den Gesamt-PBMC und der memB Fraktion konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (Abb. 86).

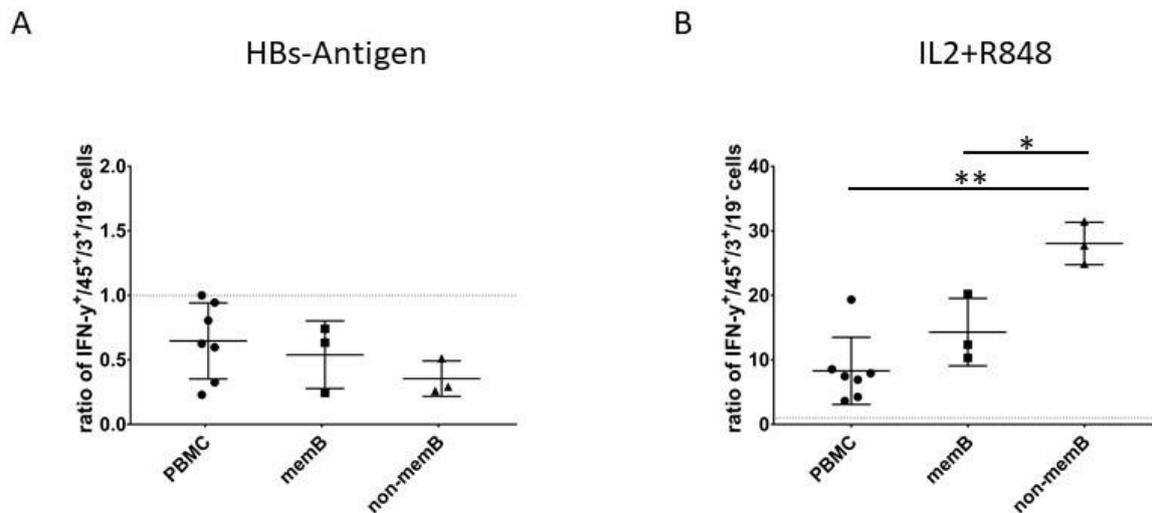


Abbildung 86: Ratio der funktionellen IFN- γ Produktion in CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^-$ B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fractionen

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^-$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^-$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB p=<0,01, memB vs. non-memB p=<0,05

Auf die gleiche Weise wurden die Subpopulationen der B-Lymphozyten untersucht. Bei den Plasmablasten und Plasmazellen war aufgrund der geringen Frequenz in der Negativ-Kontrolle keine vergleichende statistische Auswertung der Verhältnisse möglich.

Wie auch bei den B-Lymphozyten zeigte sich in der Subpopulation der CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /IgD $^-$ /IgM $^-$ class switched B-Zellen Veränderungen des intrazellulär messbaren IFN- γ . In der Stimulation HBs-Antigen zeigte sich eine Abnahme des Verhältnisses zur Negativ-Kontrolle. Diese war bei der non-memB Fraktion am deutlichsten ausgeprägt, jedoch nicht statistisch signifikant. In der Positiv-Kontrolle konnte eine erhöhte Ratio in allen Gruppen beobachtet werden. Dabei war der Unterschied der Gesamt-PBMC zu den Isolationsfraktion statistisch signifikant (Abb. 87).

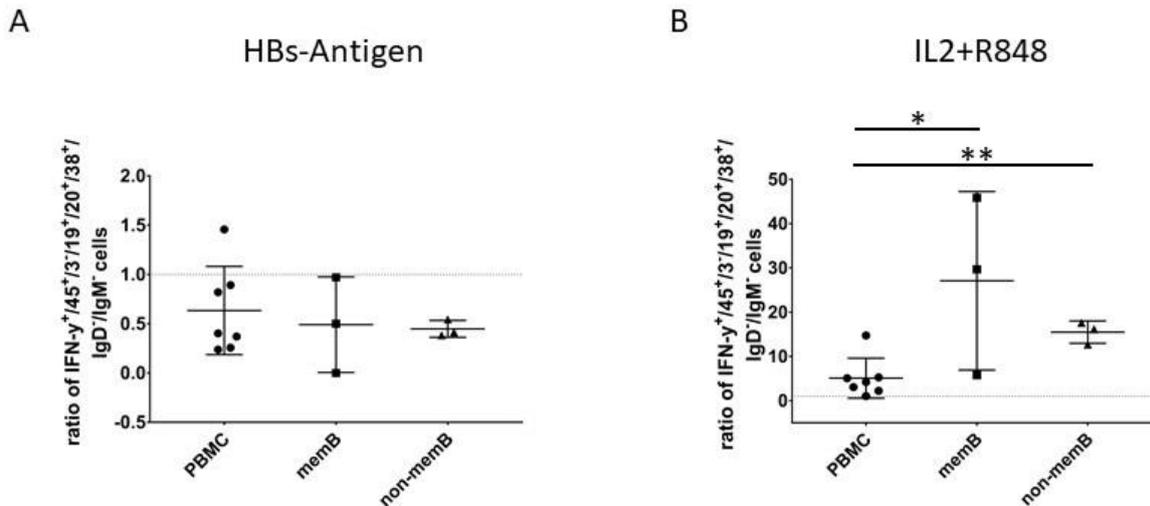


Abbildung 87: Ratio der funktionellen IFN- γ Produktion in class switched B-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fractionen

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /IgD $^+$ /IgM $^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /IgD $^+$ /IgM $^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB p<0,05, PBMC vs. non-memB p<0,01, memB vs. non-memB n.s.

Bei den non class switched memory B-Lymphozyten konnte in der Stimulation mit HBs-Antigen kein statistisch signifikanter Unterschied der IFN- γ^+ Produktion gemessen werden. In der Positiv-Kontrolle wurde jedoch in der memB Fraktion im Verhältnis eine statistisch signifikant stärkere Erhöhung des intrazellulären IFN- γ , im Vergleich Gesamt-PBMC und tendenziell zur non-memB Fraktion beobachtet (p=0,0965) (Abb. 88).

In der Subpopulation der class switched memory B-Lymphozyten konnte eine Verringerung der IFN- γ^+ in der HBs-Stimulation, ohne signifikanten Unterschied beobachtet werden. In der Positiv-Kontrolle zeigte sich Erhöhungen Verhältnisse zur Negativ-Kontrolle. Diese war in der memB Fraktion im Vergleich zu Gesamt-PBMC und non-memB Fraktion, signifikant deutlicher ausgeprägt. In den Gesamt-PBMC war eine tendenziell höhere Ratio im Vergleich zur non-memB Fraktion zu beobachten (p=0,0572) (Abb. 89).

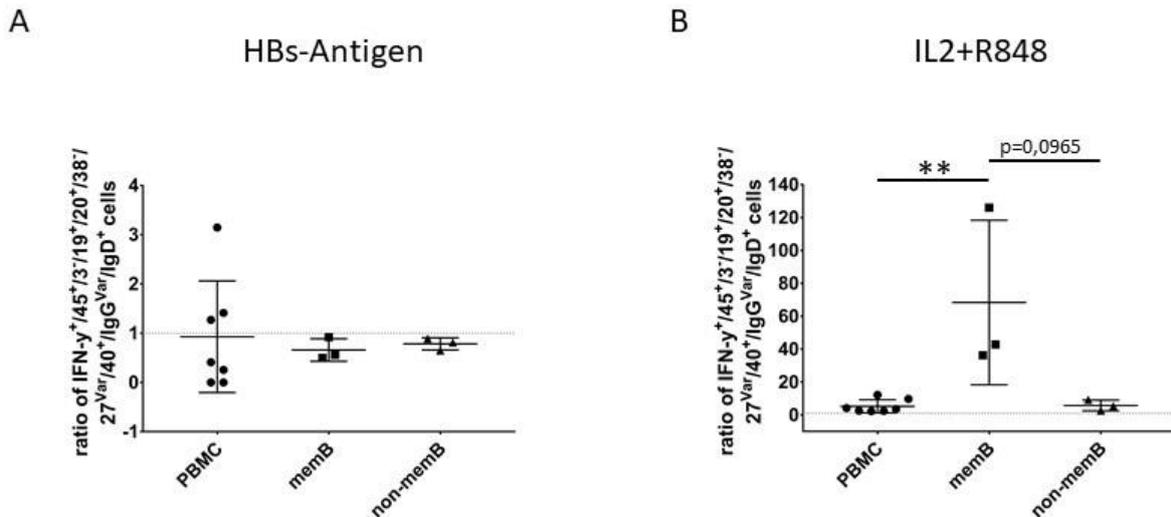


Abbildung 88: Ratio der funktionellen IFN- γ Produktion in non class switched memory B-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /CD27 var /CD40 $^+$ /IgG var /IgD $^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /CD27 var /CD40 $^+$ /IgG var /IgD $^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB p=<0,01, memB vs. non-memB p=0,0965

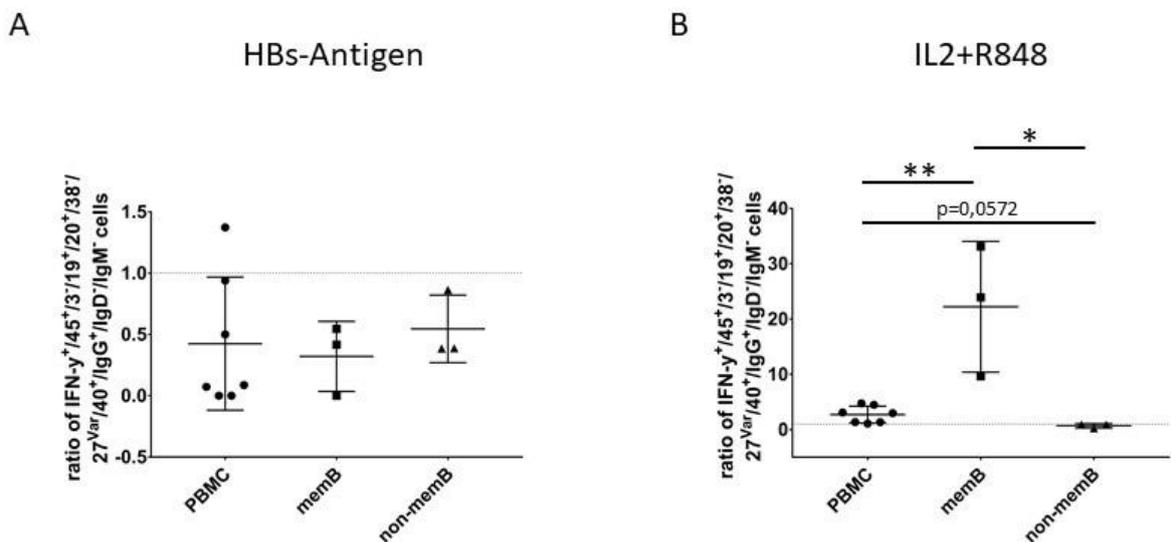


Abbildung 89: Ratio der funktionellen IFN- γ Produktion in class switched memory B-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen

[A]: Verhältnis der Stimulation mit HBs-Antigen zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /CD27 var /CD40 $^+$ /IgG $^+$ /IgD $^+$ /IgM $^+$ B-Lymphozyten unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB n.s., PBMC vs. non-memB n.s., memB vs. non-memB n.s. **[B]:** Verhältnis der Stimulation mit IL-2+R848 zu Negativ-Kontrolle der % der IFN- γ^+ Zellen aus den lebenden CD45 $^+$ /CD3 $^+$ /CD19 $^+$ /CD20 $^+$ /CD38 $^+$ /CD27 var /CD40 $^+$ /IgG $^+$ /IgD $^+$ /IgM $^+$ B-Lymphozyten n unter Stimulation über 4 Tage, PBMC (n=7) vs. memB Fraktion (n=3) vs. non-memB Fraktion (n=3), dargestellt als Scatter-Plot mit Mittelwert und Standardabweichung. gepaarter t-Test: PBMC vs. memB p=<0,01, PBMC vs. non-memB p=0,0572, memB vs. non-memB p=<0,05

6 Diskussion

In der Therapie des terminalen Organversagens, stellt die Transplantation solider Organe die derzeit beste Therapieoption dar (Black et al. 2018, Abecassis et al. 2008, Kaufman et al. 2000). Trotz deutlicher Fortschritte in der Transplantationsimmunologie zeigt sich noch immer ein nicht zufriedenstellendes Langzeitüberleben des Grafts. Obwohl das Risikoprofil für eine Abstoßung in der Routine bei jedem Patienten vor Transplantation durch verschiedene immunologische Tests erfasst wird, kommt es immer wieder zu akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen (Karahan et al. 2020, Karahan et al. 2016, Lachmann et al. 2013). Auch kann die immunsuppressive Medikation durch Nebenwirkungen eine Funktionsverschlechterung des Organs herbeiführen (Suwelack et al. 2018).

Nach Transplantation erfolgt nach Leitlinie oder bei Funktionsverschlechterung ein fortgeführtes Immunmonitoring mit der Luminex-Technologie, um eine de novo Synthese oder ein Wiederauftreten von Anti-HLA-Antikörpern nachweisen zu können (Suwelack et al. 2018, Haarberg et al. 2014). Hierdurch werden jedoch nur bestimmte Alloantigene gemessen und eine immunologische Reaktion auf andere Spender-spezifische Antigene wird nicht detektiert. Ebenso wird in der Forschung derzeit die Rolle von B-Gedächtniszellen in der Immunantwort diskutiert, die über eine reine Differenzierung zu ASC hinausgeht (Zhang 2018, Heidt et al. 2012a).

Nachdem zuvor gezeigt wurde, dass über einen total-IgG ELISpot HBs-Antigen-spezifische memory B-Lymphozyten detektiert werden konnten, wollten wir untersuchen, inwiefern die Detektion von Spender-spezifischen memory B-Lymphozyten den Outcome von Nierentransplantationspatienten beeinflusst (Tian et al. 2018, Bauer et al. 2006).

Der total-IgG ELISpot wurde zunächst an 8 Empfängern einer Nierentransplantation vor Transplantation durchgeführt, um Spender-spezifische präformierte memory B-Lymphozyten zu identifizieren. Parallel erfolgte dazu die routinemäßige Antikörperdiagnostik und ein HBs-Antigen spezifischer ELISpot.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass der ELISpot-Assay auch bei immunsupprimierten Patienten angewandt werden kann und durch die Positiv-Kontrolle, wie in der Literatur vorbeschrieben, eine deutliche Stimulation der ASC erreicht werden kann. (Jahnmatz et al. 2013, Pinna et al. 2009) Obwohl im Verlauf des Beobachtungszeitraums Abstoßungsreaktionen stattfanden, konnten wir keinen Zusammenhang mit unseren Spender-spezifischen ELISpot-Messungen feststellen. Auch die Antikörperdiagnostik auf DSA war interessanterweise im vorliegenden Versuchsaufbau mit dem klinischen Verlauf nicht in Einklang zu bringen. Wir nehmen jedoch an, dass dies an der geringen Stichprobenmenge lag, da die Korrelation von HLA- und non-HLA-Antikörpern mit klinisch

manifestierten Abstoßungsreaktion in der Literatur bekannt und etabliert ist (Wehmeier et al. 2020, Kauke 2017). Auf der Suche nach möglichen Ursachen für die variablen und negativen Spitzzahlen konnten wir feststellen, dass stets eine verbleibend hohe Grundaktivität in der Negativ-Kontrolle gemessen wurde. Als deutlichste Störgröße wurden die gemessenen Spitzzahlen in den inaktivierten Spender-Milz-PBMC identifiziert. Obwohl zuvor gezeigt wurde, dass eine Gesamtstrahlendosis von 30 Gy zur Inaktivierung der Spender-Milz-PBMC führte, konnten in den Negativ-Kontrollen der Spenderzellen Spots detektiert werden. Die Art und Höhe der Bestrahlung wurde bereits im „Standard Operating Protocol“ des Donor-Alloantigen-spezifischen Interferon- γ ELISpot Assay und von anderen Arbeitsgruppen zur Inaktivierung von Stimulatorzellen verwendet. (Carroll et al. 2016, Kim et al. 2007, Nickel et al. 2004, Gebauer et al. 2002) Dies kann möglicherweise auf eine verbleibende Restaktivität der Spender-Milz-PBMC zurückgeführt werden. Ebenfalls ist zu bedenken, dass APC und diverse Subpopulationen B-Lymphozyten auf ihrer Zelloberfläche Immunglobuline präsentieren und damit im total-IgG Assay an die Nachweisplatte gebunden wurden. Bei der anschließenden Nachweisreaktion wären diese ebenfalls angefärbt worden.

Damit scheint der total IgG-ELISpot der Antikörperdiagnostik unterlegen zu sein und kann somit in seiner derzeitigen Form nicht als ergänzendes diagnostisches Mittel im Immunomonitoring genutzt werden.

Aus diesen Gründen wurde beschlossen, eine aussagekräftigere Methode zum Nachweis Spender-spezifischer memory B-Lymphozyten zu identifizieren und zu etablieren. Bei der Immunophänotypisierung über eine Messung im Durchflusszytometer konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass sich bei Stimulation mit Antigenen oder Zytokinen Subpopulationen der B-Zellen oder T-Zellen differenzieren (Auladell et al. 2019, Shiu et al. 2015, Bauer et al. 2006). Auch Stoffwechselforgänge im Sinne einer Zytokinproduktion ließen sich nachweisen (Smith et al. 2015). Limitierend machte sich jedoch die geringe Anzahl der pro Panel verwendbaren Antikörper bemerkbar. Dabei wurden für verschiedene Populationen wie T-Zellen, B-Zellen oder Monozyten und deren Subpopulationen unterschiedliche Messungen und Färbungen vorgenommen. Eine Interaktion war folglich nur indirekt messbar. Mit dem FACS Fortessa war es uns nun möglich, ein Panel mit 15 Fluorochromen zu erstellen. Dadurch konnte nicht nur die Population der B-Lymphozyten untersucht werden, sondern auch die T-Lymphozyten und das intrazellulär angereicherte Zytokin IFN- γ .

In unseren Baselinemessungen von gesunden und freiwilligen Probanden konnten wir an Tag 0 zunächst die grundlegenden Anteile der Lymphozyten-Subpopulationen an lebenden PBMC messen. Dabei war in allen Messungen festzustellen, dass der Anteil der Leukozyten an PBMC in unseren Probanden der in der Literatur bekannten Range entspricht. Diese Beobachtungen einer stabilen Grundmessung konnte ebenfalls für die T-Lymphozyten, sowie deren CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen

gemacht werden (Golubovskaya et al. 2016, Lozano-Ojalvo et al. 2015, Mahnke et al. 2013). Als zweite beobachtete Population der Leukozyten, waren die B-Lymphozyten ebenfalls, im Vergleich mit den Angaben zur gesunden Gesamtpopulation, normwertig (Kleiveland 2015, Morbach et al. 2010). Die Subpopulation der class switched und non class switched memory B Zellen zeigten sich bei allen Probanden in vergleichbarer Menge. Ein Abgleich mit der Literatur ist bei diesen Zellentitäten nur begrenzt möglich, da wie, bereits beschrieben, derzeit noch keine FACS-Messungen in den Veröffentlichungen zu finden sind, die diese Menge an Oberflächenantigenen abgleichen. (Wu et al. 2011, Morbach et al. 2010, Sanz et al. 2008)

Die Plasmablasten waren bei allen Baselinemessungen an der unteren Grenze der Angaben in der Literatur (Pinder et al. 2017, Perez-Andres et al. 2010, Wrammert et al. 2008). Die Plasmazellen waren ebenfalls mit einer sehr geringen Frequenz nachzuweisen. Aufgrund ihrer Tendenz im gesunden Individuum ins Knochenmark zu wandern, ist das nur sehr sporadische Antreffen im peripheren Blut nachvollziehbar (Perez-Andres et al. 2010, Kunkel et al. 2003). Die Anteile der class-switched B-Lymphozyten an allen B-Lymphozyten zeigten sich bei allen Probanden auf einem ähnlichen Niveau. Da in dieser Kategorie nicht weiter differenziert wurde, konnte in der Literaturrecherche kein genaues Korrelat gefunden werden, um die gemessenen Frequenzen abschließend zu bewerten. Es ist jedoch zusammenfassend ersichtlich, dass die mit unserem Panel gemessenen Populationen mit den bereits bekannten Angaben anderer Forschungsgruppen in Einklang zu bringen sind.

In der anschließenden Inkubation in Kulturmedium über 4 Tage, konnten wir sehen, dass die Anteile der T- und B-Lymphozyten, sowie ihrer Subpopulationen, im Verlauf stabil blieben. Ebenso konnte durch die Vitalitätsmessungen nachgewiesen werden, dass es während der Inkubation ohne weitere Zugabe von Zytokinen oder Wachstumsstimulantien zu keinem signifikanten Zelluntergang kam. In dessen Folge wären die Ergebnisse der Inkubationsschritte nicht zu bewerten gewesen.

Auf dieser Grundlage aufbauend kann nun auch das Ergebnis der viertägigen Stimulation mit R848 und IL-2 bewertet werden. Es zeigte sich, dass durch die Stimulation mit der Positiv-Kontrolle keine Erhöhung des Anteils der T-Lymphozyten an Leukozyten oder der Anteile der Subpopulationen induziert wird. Andererseits konnte schon frühzeitig eine Erhöhung der IFN- γ Produktion in beiden Subpopulationen beobachtet werden, die nach 72h ihr Maximum erreichte, um nach 96h weiterhin nachweisbar zu sein. Diese Produktion war in den zytotoxischen T-Zellen deutlich stärker ausgeprägt. Diese Tendenz ist nicht verwunderlich, da die IFN- γ Produktion in dieser Zellentität für ihre immunologische Funktion essentiell ist (Bhat et al. 2017, Murphy 2011). Die erhöhte Zytokinproduktion in den T-Lymphozyten ist möglicherweise auf die Stimulation mit IL-2 und R848 zurückzuführen, da dieses die IFN- γ Produktion induziert (Sa et al. 2013, Caron et al. 2005).

Während somit am Anteil der T-Lymphozyten, abgesehen vom intrazellulären IFN- γ , keine deutlichen Veränderungen zu beobachten sind, führt die Stimulation mit R848 und IL-2 zu einer konsekutiven Erhöhung der B-Lymphozyten. Diese leichte Erhöhung ist ebenfalls in den class-switched B-Zellen zu sehen. Von den eingesetzten Stimulanzien ist bekannt, dass sie in Kombination die Proliferation und Differenzierung von memory B-Lymphozyten stimulieren. (Jahnmatz et al. 2013, Pinna et al. 2009) Interessanterweise scheint die Differenzierung zu überwiegen, da es im Verlauf zu einem Abfall der non class switched und class switched memory B-Lymphozyten kam, während der Anteil der Plasmablasten im Verlauf signifikant anstieg. Damit konnte gezeigt werden, dass die Positiv-Stimulation von B-Gedächtniszellen über IL-2 und R848 nicht nur im ELISpot, FluoroSpot oder ELISA, sondern auch in durchflusszytometrischen Untersuchungen genutzt werden kann (Hadjilaou et al. 2015, Jahnmatz et al. 2013, Pinna et al. 2009)

Es ist bekannt, dass die immunologische Reaktion der B-Lymphozyten erst mit deutlicher Verzögerung zum angeborenen Immunsystem und den T-Lymphozyten erfolgt (Murphy 2011, Maglione et al. 2009, Jourdan et al. 2009). Wir konnten jedoch zeigen, wie diese Reaktionen parallel abliefen und die B-Lymphozyten auch schon nach 24h geringe Antworten auf die Stimulation zeigten. Ebenfalls konnte man daraus folgern, dass bei Untersuchung der Stimulation von Gesamt-PBMC nach 96h sowohl die T- als auch die B-Lymphozyten bewertet werden können. Die Beobachtungen in Negativ- und Positiv-Kontrolle der nachfolgenden Experimente unterstützten diese Annahme.

In der Untersuchung der Effekte einer Antigen-spezifischen Stimulation wurde zunächst, wie im ELISpot, der Impfstoff EngerixB genutzt. Wie in den anderen Baselinemessungen, war die Vitalität gut und damit ein Beginn der Stimulation möglich. Da bekannt war, dass das Hepatitis-B-Surface Antigen sehr immunogen ist, wurden zunächst zwei Konzentrationen an HBs-Antigen im Impfstoff getestet (Bauer et al. 2006, Bauer 2002). Dabei zeigte sich jedoch nach 96h ein deutlicher Zelluntergang, der zuvor nicht beobachtet werden konnte. In der Auswertung schien es, dass es in Abhängigkeit von der Konzentration des Impfstoffes zu einem Zelluntergang kam. Dies war möglicherweise auf weitere Zusatzstoffe wie das Adjuvans Aluminiumhydroxid zurückzuführen (Krewski et al. 2007, Goto et al. 1993). Damit war auch ein weiterer Störfaktor für die Ergebnisse im ELISpot zu identifizieren.

Aufgrund dieser Annahme wurde der Ansatz der Antigen-spezifischen Stimulation dadurch verbessert, dass adjuvansfreies HBs-Antigen in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt wurde. Erfreulicherweise zeigte sich bei 7 Probanden nach 4 Tagen Inkubation eine deutliche Verbesserung der Zellvitalität. Als neue Beobachtung zeigte sich ein leicht erhöhter Anteil der gesamten T-Zellen an Leukozyten. Nachdem sich der Anteil an B-Lymphozyten in der Positiv-Kontrolle ebenfalls erhöht hat, können diese beiden Veränderungen durch Proliferation beider Lymphozytensubpopulationen bedingt worden sein. Ebenfalls wäre dieser Anstieg durch eine Abnahme der CD3⁻/CD19⁻ und CD3⁺/CD19⁺

Zellen möglich. Da keine BD Trucount Messung zur Angabe der genauen Zellzahl, sondern eine prozentuale Event-Messung durchgeführt wurde, kann dies nicht abschließend geklärt werden.

Auf zellulärer Ebene der Subpopulationen der B-Lymphozyten konnten in der Antigen-spezifischen Stimulation wichtige Beobachtungen gemacht werden. Zunächst kam es in den class switched memory B-Lymphozyten zu einer deutlicheren Reduktion, während in den non class switched memory B-Lymphozyten nur eine visuelle Abnahme sichtbar war. Dieser Unterschied in den Gedächtniszellen, kann darauf zurückgeführt werden, dass die Probanden schon vor Jahren gegen das Hepatitis B auslösende DNA-Virus geimpft worden waren. Dadurch wurde ein Isotypenwechsel angeregt und folglich vor allem eine Proliferation von Antigen-spezifischen class switched Gedächtniszellen induziert. Diese waren nun durch das entsprechende Antigen zur Differenzierung angeregt worden. Folglich kam es zu einem Anstieg der Plasmablasten. Interessanterweise zeigte sich durch die Antigen-Stimulation kein Effekt auf den Anteil der class switched B-Lymphozyten. Diese Beobachtungen decken sich mit den theoretischen Vorgängen in den Lymphozyten Populationen bei Kontakt mit HBs-Antigen bei sensibilisierten Probanden. (Vanwolleghem et al. 2020, Murphy 2011, Bauer et al. 2006, Hebeis et al. 2004, Cupps et al. 1984)

Folglich hat sich also gezeigt, dass durch ein Antigen in Probanden mit vorbestehender Sensibilisierung, eine immunologische und durchflusszytometrisch messbare Immunreaktion *in vitro* erreicht werden kann. Dieser Effekt war jedoch nur messbar, als das Antigen nicht mit weiteren zytotoxischen Substanzen kombiniert zugegeben wurde. Ebenfalls hatte sich gezeigt, dass durch die FACS-Untersuchungen mehrere Zellentitäten erfasst und kontrolliert werden konnten, was einen deutlichen Vorteil gegenüber einer Methode wie dem total IgG-ELISpot darstellt, der nur ASC identifizieren kann.

Auf Grundlage der Erkenntnisse aus dem ELISpot und den FACS-Untersuchungen könnte in Zukunft eine Spender-spezifische Stimulation die Rolle von präformierten memory B-Lymphozyten im Transplantatempfänger näher beleuchten. Dadurch würde durch engmaschigere Kontrollen oder eine gezielte Antikörper-Therapie eine Abstoßungsreaktion vor klinischem Auftreten verhindert werden können. Folglich könnte damit das Transplantatüberleben deutlich verbessert werden. (Wehmeier et al. 2020, Karahan et al. 2020, Karahan et al. 2016, Chong et al. 2015)

Die Spender-spezifische Stimulation sollte jedoch durch ein Lysat der Spender-Milz-PBMC erfolgen, um eine Restaktivität der Spenderzellen zu minimieren und gleichzeitig eine spezifischere Messung mit unserem Panel am Durchflusszytometer möglich zu machen (Shiu et al. 2015).

In einem weiteren Schritt sollte in dieser Arbeit die Rolle der memory B-Lymphozyten in der Reaktion auf ein bekanntes Antigen, sowie mögliche Interaktionen mit anderen Lymphozyten untersucht werden. Dieser Einblick sollte durch die Depletion und Anreicherungen über eine MACS-Isolation

erfolgen. Innerhalb der Isolationsfraktionen konnten zwischen den Stimulationen bei den T-Lymphozyten und den beiden Subpopulationen keine Unterschiede beobachtet werden.

Bei den B-Lymphozyten war zunächst eine leichte, nicht signifikante Zunahme in der angereicherten Fraktion bei Antigen-Stimulation, während die depletierte Fraktion auf gleichem Niveau blieb. Bei den Gedächtniszellen zeigten sich gegensätzliche Entwicklungen der Isolationsfraktionen. Zunächst führte die Antigenstimulation bei den non class switched Gedächtniszellen zu einer signifikanten Zunahme in der Depletionsfraktion, während diese in den angereicherten PBMC geringfügig absanken. Auf der anderen Seite nahmen die class switched Gedächtniszellen in der angereicherten Fraktion ab, während die Depletionsfraktion wiederum das Niveau beibehielt.

Obwohl zu erwarten gewesen wäre, dass in der angereicherten Fraktion unter Antigen-Stimulation der Anteil der Plasmablasten deutlich zunehmen würde, blieb dieser nahezu auf gleichem Niveau. In der depletierten Fraktion war lediglich ein tendenzieller Anstieg der Plasmablasten unter Antigen-Stimulation zu beobachten.

Es zeigte sich also, dass die Depletion, beziehungsweise Anreicherung, von memory B-Lymphozyten weitreichende Folgen für die Immunantwort hatte. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Effekte zunächst nur innerhalb der Fraktionen statistisch ausgewertet werden konnten und ein Vergleich nur indirekt möglich war. Um also ausschließen zu können, dass die vorherige Isolation die Messbarkeit der Effekte der Stimulantien auf die PBMC-Fraktionen beeinflusst hatte, wurden die Ratios zur Negativ-Kontrolle gebildet. Nun konnte man die Effekte der Stimulationen auf Gesamt-PBMC, angereicherte memory B-Lymphozyten und die depletierten non-memory B-Lymphozyten PBMC vergleichen.

Direkt auffallend war, dass die Antigenstimulation bei den T-Lymphozyten in den normalen PBMC zu keiner Veränderung führte, während diese in der memB-Fraktion deutlich abnahmen. Andererseits konnten zwischen allen drei Gruppen keine Unterschiede in den T-Helfer und zytotoxischen T-Lymphozyten gefunden werden. Jedoch zeigte sich im funktionellen Assay der Positiv-Kontrolle eine deutlich erhöhte Stimulierung der IFN- γ Produktion in der Depletions-Fraktion, während diese in der angereicherten Fraktion niedriger war. Bei den B-Lymphozyten zeigte sich, dass die zuvor beobachtete unterschiedliche Zunahme zwischen den Isolationsfraktion signifikant war. Im Vergleich zu Gesamt-PBMC war jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar.

Während die class-switched memory B-Zellen in allen Fraktionen absanken, zeigte sich bei den non class switched memory B-Lymphozyten in der non-memB Fraktion eine deutliche Zunahme. Diese sanken wie erwartet in den beiden anderen Gruppen leicht ab. Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass sich die PBMC im Bereich der B-Gedächtniszellen in der depletierten Fraktion gegensätzlich zu Gesamt-PBMC verhalten. Trotzdem erfolgte durch Antigen-Stimulation eine Zunahme der Plasmablasten in allen Fraktionen, in der non-memB Fraktion jedoch nur tendenziell.

Somit könnte durch das Antigen in der Fraktion, aus der B-Gedächtniszellen depletiert worden waren, nicht nur eine verstärkte Differenzierung angeregt worden sein, sondern auch eine Proliferation. Diese hätte somit die entstandene Populationslücke ersetzt. Es gibt Hinweise, dass es nach Depletion von B-Lymphozyten *in vivo* zu einer deutlich verstärkten Proliferation der memory B-Lymphozyten kommt (Adlowitz et al. 2015, Heidt et al. 2012a). Um diese Frage zu klären bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen mit einem Proliferations-Assay.

Limitierend ist jedoch zu sagen, dass das verwendete Kit auf der Bindung von CD27⁺ Zellen beruht. Durch die Eigenschaften der B-Gedächtniszellen eine variable Ausprägung von CD27 auf ihrer Zelloberfläche zu besitzen, konnten mit dem verwendeten Kit nicht alle memory B-Lymphozyten depletiert werden.

Eine Beschreibung der Veränderungen im B-Zell-Kompartiment nach Depletion und Anreicherung ist in wissenschaftlichen Publikationen nur selten zu finden, da die Fragestellungen sich meist auf die memory B-Lymphozyten und deren Veränderungen beschränkten (Waltari et al. 2019, Franz et al. 2011). Unsere Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass memory B-Lymphozyten nicht nur durch ihre Differenzierung zu ASC einen Einfluss auf das Immunsystem haben, sondern möglicherweise auch durch Stimulation, Kostimulation oder Inhibition auf T-Lymphozyten wirken (Shiu et al. 2015). Durch diese Effekte würde die Interaktion von B- und T-Lymphozyten in einem neuen Licht dargestellt. Die derzeitige Annahme ist, dass diese Interaktion maßgeblich in Richtung T-Lymphozyten auf B-Lymphozyten verläuft (Peterson et al. 2018, Bishop 2016, Chtanova et al. 2004). Es sollten mit der verbesserten Immunophänotypisierung Untersuchungen von weiteren Subpopulationen der T-Lymphozyten, wie den T_{reg}, nach Depletion bestimmter B-Lymphozyten erfolgen, um Hinweise auf weitere Interaktionen zu erhalten.

Im Zuge unserer Messungen mit dem funktionellen Assay konnte wir nicht nur die Stimulation und Aktivierung in T-Lymphozyten untersuchen. Es konnte ebenfalls in den Subpopulationen der B-Lymphozyten eine geringe basale IFN- γ Produktion nachgewiesen werden.

Durch die Stimulation mit R848 und Il-2 wurde nicht nur die Differenzierung von B-Gedächtniszellen zu ASC erreicht, sondern auch die intrazelluläre IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten angeregt. Ein deutlicher Anstieg konnte in den class switched B-Zellen beobachtet werden. Auch die weiteren Subpopulationen zeigten eine erhöhte IFN- γ Produktion nach Stimulation. Im Antigen-spezifischen Ansatz konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Jedoch kam es bei den class switched memory B-Lymphozyten zu einer Abnahme der IFN- γ produzierenden Zellen. Möglicherweise hatten sich also aktivierte B-Gedächtniszellen bereits zu ASC differenziert oder wurden durch andere zelluläre Interaktionen bei Antigenkontakt gehemmt. (Gupta et al. 2020, Pohl et al. 2020, Ratajczak et al. 2018)

In den Isolationsversuchen konnten keine veränderten Effekte der Stimulationen auf die IFN- γ Produktion detektiert werden.

IFN- γ wurde bereits im Zusammenhang mit NK-Zellen und den T-Zellen genannt. Jedoch wird dieses auch von B-Zellen produziert. Während bei der T-Zell Immunantwort die Rolle der IFN- γ produzierenden Subpopulationen gut erforscht ist, ist über die IFN- γ^+ B-Zellen noch wenig bekannt. (Ballesteros-Tato et al. 2014, Gray et al. 2007) In der Population der class switched B-Lymphozyten könnten die B-Effektorzellen oder innate B-Cells inkludiert sein, die für ihre IFN- γ Produktion bekannt sind (Barabas et al. 2017, Bao et al. 2014, Harris et al. 2005). Über die Produktion des IFN- γ in B-Gedächtniszellen und ASC finden sich nur wenige Informationen in der wissenschaftlichen Literatur. Durch die Costimulation von IFN- γ und T-Lymphozyten wird die Differenzierung der memory B-Lymphozyten angeregt (Jackson et al. 2016, Vazquez et al. 2015). Damit könnte in den B-Lymphozyten wiederum die Produktion des immunologisch aktiven IFN- γ aktiviert werden (Risley et al. 2020). Im Sinne einer positiven Feedback-Schleife würde dieses wiederum die T-Lymphozyten und andere Leukozyten stimulieren. Ein ähnlicher Mechanismus ist bei dendritischen Zellen bekannt (Pan et al. 2004).

Ein wichtiger Aspekt der IFN- γ Produktion ist die Möglichkeit, dass diese in Zukunft auch als Aktivierungsmarker für B-Lymphozyten genutzt werden können. In T-Lymphozyten ist dieser Mechanismus schon besser untersucht und etabliert (Bhat et al. 2017, Whitmire et al. 2005). Als Marker für die Aktivierung von B-Lymphozyten wird bisher deren Produktion von Immunglobulinen genutzt (Shi et al. 2019, Bauer et al. 2006). In unserem IgG ELISA konnten erhöhte IgG Konzentrationen nach Stimulation mit Il-2 und R848 nachgewiesen werden. Eine statistisch signifikante Korrelation mit der IFN- γ Produktion war in Anbetracht der geringen Datenmenge nicht möglich, jedoch sollte dieser Zusammenhang in Zukunft weiter untersucht werden. In der Durchflusszytometrie könnte man damit eine Aktivierung bestimmter B-Zell Subpopulationen nachweisen. Dadurch würden in diesem Setting zusätzliche Untersuchungen mit einem Immunglobulin ELISA nur noch in bestimmten Fragestellungen nötig.

Durch die umfangreichen Erkenntnisse dieser Arbeit könnte in Zukunft weiter erforscht werden, wie sich das Immungedächtnis eines Patienten nach Organtransplantation verhält. Unsere Daten wurden jedoch nur an wenigen Patienten im ELISpot und wenigen Probanden in den Ansätzen der Antigen-Stimulation erhoben. Deshalb sollten nach unserer Etablierung entsprechende Wiederholungen der Experimente mit höherer Fallzahl durchgeführt werden. Wenn diese positiv verlaufen, könnte sich durch eine patientenspezifischere Therapie das Überleben der Transplantate deutlich verbessern.

7 Zusammenfassung

(Simon Theiner, 2022)

Antigen-spezifische memory B-Lymphozyten in der Transplantation - Immunophänotypisierung im Impfmodell und die Rolle von memory B-Lymphozyten in der Immunantwort

In der Therapie des terminalen Organversagens, stellt die Transplantation solider Organe die derzeit beste Therapieoption dar. Das Langzeitüberleben des Grafts ist jedoch noch immer nicht zufriedenstellend. Es hat sich herausgestellt, dass memory B-Lymphozyten gegen diverse Alloantigene des Grafts bereits vor einer Transplantation im Empfänger präformiert sein können, jedoch mit der üblichen Antikörperdiagnostik nicht detektiert werden. Deshalb sollte das Vorhandensein und die Rolle dieser präformierten memory B-Lymphozyten im klinischen Outcome von Nierentransplantationspatienten untersucht werden.

Dazu wurde zunächst ein Spender-spezifischer total-IgG ELISpot durchgeführt. Zusätzlich konnten wir anhand einer umfangreichen Immunophänotypisierung gesunder Probanden mittels FACS, die Effekte einer Antigen-spezifischen Stimulation untersuchen. Dabei wurde durch Depletion und Anreicherung die Rolle der memory B-Lymphozyten in der immunologischen Reaktion *in vitro* näher beleuchtet.

Die Auswertungen des total-IgG ELISpot zeigte, dass der verwendete Assay in unserem Ansatz der Antikörperdiagnostik in Bezug auf eine Abstoßungsreaktion unterlegen ist. Wir konnten jedoch ein FACS-Panel erstellen und etablieren, mit dem sich sowohl Subpopulationen der B-Lymphozyten, als auch der T-Lymphozyten untersuchen ließen. Durch die Stimulation mit R848 und Il-2 konnte eine Differenzierung der memory B-Lymphozyten zu ASC erreicht werden. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls bei der Antigen-spezifischen Stimulation mit adjuvansfreiem HBs-Antigen. Durch die Messung von IFN- γ produzierenden Zellen konnten wir zeigen, dass die Immunantwort der B- und T-Lymphozyten parallel abläuft und die Aktivierung der T-Lymphozyten auch nach 96h signifikant messbar bleibt. Eine Depletion oder Anreicherung von memory B-Lymphozyten führt zu teils deutlich veränderten Effekten der Stimulation in den Leukozytensubpopulationen. Einerseits konnten wir einen hemmenden Effekt der memory B-Lymphozyten auf die IFN- γ Produktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten beobachten, andererseits auch eine verstärkte Proliferation der depletierten Subpopulation. Abschließend konnten durch unsere IFN- γ Messungen eine Produktion in allen identifizierten B-Lymphozyten-Subpopulationen nachgewiesen werden, die durch unsere Stimulationen zusätzlich erhöht werden konnte. Eine Verwendung des FACS-Panels zur Immunophänotypisierung sollte in einem Spender-spezifischen Ansatz fortgesetzt werden, um weitere Interaktionen identifizieren zu können und das Verständnis der Transplantationsimmunologie zu verbessern. Ebenfalls könnte durch weitere Untersuchungen der memory B-Lymphozyten und der IFN- γ Produktion in B-Lymphozyten Fortschritte in der Immunologie gemacht werden.

8 Summary

(Simon Theiner, 2022)

Antigen-specific memory B-lymphocytes in transplantation - immunophenotyping in a vaccination model and the role of memory B-lymphocytes in the immune response

In the therapy of terminal organ insufficiency, the transplantation of solid organs is the best treatment. There are no satisfactory longtime survival rates of the allografts yet. Though these are not detected by conventional antibody diagnostics, it has been shown that, alloreactive memory B-Cells against the graft may be preexistent in transplant recipients. Thus, we wanted to investigate the existence and the role of preformed memory B-lymphocytes in clinical outcomes of recipients of a kidney transplant.

For this purpose, a donor-specific total-IgG ELISpot was first performed. Additionally, we were able to study the effects of an antigen-specific stimulation, by extensive immunophenotyping of healthy individuals via a FACS-Assay. The role of memory B-lymphocytes in the immunological reaction *in vitro* was examined more detailed by the means of depletion and enrichment.

The evaluation of the total-IgG ELISpot showed that the assay used in our first approach was inferior to the antibody diagnostics with regard of transplant rejection. However, we were able to create and establish a FACS panel with which subpopulations of both B lymphocytes and T lymphocytes could be examined. By stimulating with R848 and Il-2, a differentiation of the memory B-lymphocytes to ASC could be achieved. This effect was also shown in the antigen-specific stimulation with adjuvant-free HBs-antigen. By the identification of IFN- γ producing cells, we were able to show, that the immune response of the B- and T-lymphocytes takes place side by side and the activation of the T lymphocytes remains significantly measurable even after 96 hours. Depletion or enrichment of memory B-lymphocytes leads to partly significantly changed effects of the stimulations in the leukocyte subpopulations. At the one hand, we were able to observe an inhibitory effect of the memory B-lymphocytes on the IFN- γ production of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes, on the other hand, an increased proliferation of the depleted subpopulation was depicted. Finally, our IFN- γ measurements showed production in all identified B-lymphocyte subpopulations, which could be additionally increased by our stimulations.

Use of the FACS panel for immunophenotyping should be continued in a donor-specific approach in order to identify further interactions and improve understanding of the transplant immunology. Further studies of the memory B-lymphocytes and the IFN- γ production in B-lymphocytes could also lead to knowledge and progress in immunology.

9 Literaturverzeichnis

- Abecassis, M., Bartlett, S. T., Collins, A. J., et al. 2008. Kidney transplantation as primary therapy for end-stage renal disease: a National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQITM) conference. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3, 471-80.
- Ada, G. 2001. Vaccines and Vaccination. *N Engl J med* 345 (14), S.1042-1053.
- Adlowitz, D. G., Barnard, J., Bielar, J. N., et al. 2015. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLoS One*, 10, e0128269.
- Auladell, M., Nguyen, T. H., Garcillan, B., et al. 2019. Distinguishing naive- from memory-derived human B cells during acute responses. *Clin Transl Immunology*, 8, e01090.
- Baker, R. J., Hernandez-Fuentes, M. P., Brookes, P. A., et al. 2001. Loss of Direct and Maintenance of Indirect Alloresponses in Renal Allograft Recipients: Implications for the Pathogenesis of Chronic Allograft Nephropathy. *The Journal of Immunology*, 167, 7199-7206.
- Ballesteros-Tato, A., Stone, S. L. & Lund, F. E. 2014. Innate IFN γ -producing B cells. *Cell Res*, 24, 135-6.
- Bao, Y., Liu, X., Han, C., et al. 2014. Identification of IFN- γ -producing innate B cells. *Cell Res*, 24, 161-76.
- Barabas, S., Spindler, T., Kiener, R., et al. 2017. An optimized IFN- γ ELISpot assay for the sensitive and standardized monitoring of CMV protein-reactive effector cells of cell-mediated immunity. *BMC Immunol*, 18, 14.
- Bauer, T. 2002. Dissertation Tanja Bauer.pdf.
- Bauer, T. & Jilg, W. 2006. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*, 24, 572-7.
- Benvenuto, L. J., Anderson, M. R. & Arcasoy, S. M. 2018. New frontiers in immunosuppression. *J Thorac Dis*, 10, 3141-3155.
- Berlot, G., Rossini, P. & Turchet, F. 2015. Biology of immunoglobulins. *Transl Med UniSa*, 11, 24-7.
- Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., et al. 2017. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis*, 8, e2836.
- Biorad. 2020. *Antibody Titration* [Online]. Hercules, CA: BioRad. Available: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-antibody-titration.html> [Accessed 29.12.2020].
- Biosciences, B. 2019. *B_cell_markers* [Online]. www.bdbiosciences.com: BD Biosciences. Available: https://www.bdbiosciences.com/eu/s/b_cell_markers_chart [Accessed 29.12.2020].
- Bishop, G. A. 2016. B cell-T cell interaction: antigen bridge to antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, 16, 467.

- Black, C. K., Termanini, K. M., Aguirre, O., et al. 2018. Solid organ transplantation in the 21(st) century. *Ann Transl Med*, 6, 409.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V., et al. 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19, 41-52.
- Bordon, Y. 2015. B cells: Whatever will B cell be? *Nat Rev Immunol*, 15, 132.
- Botto, M., Kirschfink, M., Macor, P., et al. 2009. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol*, 46, 2774-83.
- Brauer, M., Gunther, A., Pleul, K., et al. 2019. [How many potential organ donors are there really? : Retrospective analysis of why determination of irreversible loss of brain function was not performed in deceased patients with relevant brain damage]. *Anaesthetist*, 68, 22-29.
- Braun, F. & Rahmel, A. 2020. [Amendments to the Transplantation Act and impact on the donor situation in Germany]. *Chirurg*, 91, 905-912.
- Bundesregierung 2017. Dritter Bericht der Bundesregierung über den Fortgang der eingeleiteten Reformprozesse, mögliche Missstände und sonstige aktuelle Entwicklungen in der Transplantationsmedizin. In: BUNDESTAG, D. (ed.).
- Bunnapradist, S. & Ambuhl, P. M. 2008. Impact of gastrointestinal-related side effects on mycophenolate mofetil dosing and potential therapeutic strategies. *Clin Transplant*, 22, 815-21.
- Cai, J., Terasaki, P. I., Mao, Q., et al. 2006. Development of nondonor-specific HLA-DR antibodies in allograft recipients is associated with shared epitopes with mismatched donor DR antigens. *Am J Transplant*, 6, 2947-54.
- Carbone, F. R., Kurts, C., Bennett, S. R., et al. 1998. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today*, 19, 368-73.
- Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., et al. 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol*, 175, 1551-7.
- Carroll, R., Troelnikov, A. & Chong, A. S. 2016. Virtual Global Transplant Laboratory Standard Operating Protocol for Donor Alloantigen-specific Interferon-gamma ELISPOT Assay. *Transplant Direct*, 2, e111.
- Cassens, U. 1996. Das CD34- und CD45-Antigen als Detektionsparameter für die durchflußzytometrische Analyse. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 23, 7-8.
- Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S3-23.
- Chong, A. S. & Sciammas, R. 2015. Memory B cells in transplantation. *Transplantation*, 99, 21-8.
- Choo, S. Y. 2007. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*, 48, 11-23.
- Chtanova, T., Tangye, S. G., Newton, R., et al. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*, 173, 68-78.

- Clark, G., Stockinger, H., Balderas, R., et al. 2016. Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clin Transl Immunology*, 5, e57.
- Clavarino, G., Delouche, N., Vettier, C., et al. 2016. Novel Strategy for Phenotypic Characterization of Human B Lymphocytes from Precursors to Effector Cells by Flow Cytometry. *PLoS One*, 11, e0162209.
- Clem, A. S. 2011. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis*, 3, 73-8.
- Cupps, T. R., Gerin, J. L., Purcell, R. H., et al. 1984. In vitro antigen-induced antibody responses to hepatitis B surface antigen in man. Kinetic and cellular requirements. *J Clin Invest*, 74, 1204-13.
- Davenport, M. P., Smith, N. L. & Rudd, B. D. 2020. Building a T cell compartment: how immune cell development shapes function. *Nat Rev Immunol*, 20, 499-506.
- Dragun, D., Catar, R. & Philippe, A. 2016. Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kidney Int*, 90, 280-288.
- Dragun, D. & Hegner, B. 2009. Non-HLA antibodies post-transplantation: clinical relevance and treatment in solid organ transplantation. *Contrib Nephrol*, 162, 129-39.
- Dso. 2019a. *Aktive Warteliste NierenTx 2019* [Online]. Deutsche Stiftung Organspende. Available: www.dso.de/DSO-Infografiken/Aktive%20WL_NierenTX_2019.png [Accessed 29.12.2020].
- Dso. 2019b. *Organspender 2019* [Online]. Deutsche Stiftung Organspende. Available: https://dso.de/DSO-Infografiken/Organspender_2019.png [Accessed 29.12.2020].
- Duncan, M. D. & Wilkes, D. S. 2005. Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections. *Proc Am Thorac Soc*, 2, 449-55.
- Durgeau, A., Virk, Y., Corgnac, S., et al. 2018. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 9, 14.
- El-Sayed, A. 2018. Advances in rabies prophylaxis and treatment with emphasis on immunoresponse mechanisms. *Int J Vet Sci Med*, 6, 8-15.
- Ellis, T. M., Schiller, J. J., Roza, A. M., et al. 2012. Diagnostic accuracy of solid phase HLA antibody assays for prediction of crossmatch strength. *Hum Immunol*, 73, 706-10.
- Enderby, C. 2015. An Overview of Immunosuppression in Solid Organ Transplantation. *Am J Manag Care*, Am J Manag Care. 2015;21:S12-S23, S12-S23.
- Engel, P., Boumsell, L., Balderas, R., et al. 2015. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*, 195, 4555-63.
- Farber, D. L., Yudanin, N. A. & Restifo, N. P. 2014. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14, 24-35.
- Franz, B., May, K. F., Jr., Dranoff, G., et al. 2011. Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. *Blood*, 118, 348-57.

- Gaston, R. S., Cecka, J. M., Kasiske, B. L., et al. 2010. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation*, 90, 68-74.
- Gebauer, B. S., Hricik, D. E., Atallah, A., et al. 2002. Evolution of the Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for Post-Transplant Alloreactivity as a Potentially Useful Immune Monitoring Tool. *American Journal of Transplantation*, 2, 857-866.
- Gibney, E. M., Cagle, L. R., Freed, B., et al. 2006. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 2625-9.
- Gloor, J. M., Winters, J. L., Cornell, L. D., et al. 2010. Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant*, 10, 582-9.
- Golubovskaya, V. & Wu, L. 2016. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 8.
- Gordon, S. & Martinez-Pomares, L. 2017. Physiological roles of macrophages. *Pflugers Arch*, 469, 365-374.
- Goto, N., Kato, H., Maeyama, J., et al. 1993. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine*, 11, 914-918.
- Gray, D., Gray, M. & Barr, T. 2007. Innate responses of B cells. *European Journal of Immunology*, 3304-3310.
- Green, A. M., Difazio, R. & Flynn, J. L. 2013. IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*, 190, 270-7.
- Gressner, A. M., Arndt, T., Lackner, K. J., et al. 2019. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*.
- Gupta, S., Su, H. & Agrawal, S. 2020. CD8 Treg Cells Inhibit B-Cell Proliferation and Immunoglobulin Production. *Int Arch Allergy Immunol*, 181, 947-955.
- Haarberg, K. M. & Tambur, A. R. 2014. Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Br Med Bull*, 110, 23-34.
- Haas, M., Loupy, A., Lefaucheur, C., et al. 2018. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant*, 18, 293-307.
- Hadjilaou, A., Green, A. M., Coloma, J., et al. 2015. Single-Cell Analysis of B Cell/Antibody Cross-Reactivity Using a Novel Multicolor FluoroSpot Assay. *J Immunol*, 195, 3490-6.
- Harris, D. P., Goodrich, S., Gerth, A. J., et al. 2005. Regulation of IFN- Production by B Effector 1 Cells: Essential Roles for T-bet and the IFN- Receptor. *The Journal of Immunology*, 174, 6781-6790.
- Hebeis, B. J., Klenovsek, K., Rohwer, P., et al. 2004. Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help. *J Exp Med*, 199, 593-602.
- Heck, M., Fresenius, M. & Busch, C. 2015. Blut und Blutprodukte. *Klinikmanual Anästhesie*.

- Heidt, S., Hester, J., Shankar, S., et al. 2012a. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant*, 12, 1784-92.
- Heidt, S., Roelen, D. L., De Vaal, Y. J., et al. 2012b. A NOVel ELISPOT assay to quantify HLA-specific B cells in HLA-immunized individuals. *Am J Transplant*, 12, 1469-78.
- Hirayama, D., Iida, T. & Nakase, H. 2017. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci*, 19.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C., et al. 1999. Phylogenetic Perspective in Innate Immunity. *Science*, 284, 1313-1318.
- Hou, H., Zhou, Y., Yu, J., et al. 2018. Establishment of the Reference Intervals of Lymphocyte Function in Healthy Adults Based on IFN-gamma Secretion Assay upon Phorbol-12-Myristate-13-Acetate/Ionomycin Stimulation. *Front Immunol*, 9, 172.
- Hughes, A. D., Lakkis, F. G. & Oberbarnscheidt, M. H. 2018. Four-Dimensional Imaging of T Cells in Kidney Transplant Rejection. *J Am Soc Nephrol*, 29, 1596-1600.
- Im, M., Chae, H., Kim, T., et al. 2011. Comparative quantitative analysis of cluster of differentiation 45 antigen expression on lymphocyte subsets. *Korean J Lab Med*, 31, 148-53.
- Issa, F., Schiopu, A. & Wood, K. J. 2010. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance. *Expert Rev Clin Immunol*, 6, 155-69.
- Jackson, S. W., Jacobs, H. M., Arkatkar, T., et al. 2016. B cell IFN-gamma receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. *J Exp Med*, 213, 733-50.
- Jahnmatz, M., Kesa, G., Netterlid, E., et al. 2013. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods*, 391, 50-9.
- Jiang, Y., Villeneuve, P. J., Schaubel, D., et al. 2013. Long-term follow-up of kidney transplant recipients: comparison of hospitalization rates to the general population. *Transplant Res*, 2, 15.
- Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., et al. 2009. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*, 114, 5173-81.
- Jurkiewicz, M. J. 1990. Nobel Laureate: Joseph E. Murray, clinical surgeon, scientist, teacher. *Arch Surg*, 125, 1423-4.
- Karahan, G. E., Claas, F. H. & Heidt, S. 2016. B Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*, 7, 686.
- Karahan, G. E., Claas, F. H. J. & Heidt, S. 2020. Pre-existing Alloreactive T and B Cells and Their Possible Relevance for Pre-transplant Risk Estimation in Kidney Transplant Recipients. *Front Med (Lausanne)*, 7, 340.
- Kaufman, D. B., Leventhal, J. R., Elliott, M. D., et al. 2000. Pancreas transplantation at Northwestern University. *Clin Transpl*, 239-46.

- Kauke, T. 2017. *Bedeutung von donorspezifischen HLA-Antikörpern nach solider Organtransplantation*. LMU Ludwig-Maximilians-Universität.
- Kim, J. & Hematti, P. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol*, 37, 1445-53.
- Kim, S. H., Oh, E. J., Kim, M. J., et al. 2007. Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients. *Transplant Proc*, 39, 3057-60.
- Kleiveland, C. R. 2015. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: VERHOECKX, K., COTTER, P., LOPEZ-EXPOSITO, I., KLEIVELAND, C., LEA, T., MACKIE, A., REQUENA, T., SWIATECKA, D. & WICHERS, H. (eds.) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH).
- Kobayashi, S. D. & Deleo, F. R. 2009. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1, 309-333.
- Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., et al. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 10 Suppl 1, 1-269.
- Kugelberg, E. 2015. B cell memory: Making sense in humans. *Nat Rev Immunol*, 15, 133.
- Kunkel, E. J. & Butcher, E. C. 2003. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol*, 3, 822-9.
- Kurd, N. & Robey, E. A. 2016. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev*, 271, 114-26.
- Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. 2015. Memory B cells. *Nat Rev Immunol*, 15, 149-59.
- Lachmann, N., Todorova, K., Schulze, H., et al. 2013. Luminex((R)) and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother*, 40, 182-9.
- Lakkis, F. G., Arakelov, A., Konieczny, B. T., et al. 2000. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nature Medicine*, 6, 686-688.
- Lam, N. N., Boyne, D. J., Quinn, R. R., et al. 2020. Mortality and Morbidity in Kidney Transplant Recipients With a Failing Graft: A Matched Cohort Study. *Can J Kidney Health Dis*, 7, 2054358120908677.
- Lamb, K. E., Lodhi, S. & Meier-Kriesche, H. U. 2011. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant*, 11, 450-62.
- Lee, H., Han, E., Choi, A. R., et al. 2018. Clinical impact of complement (C1q, C3d) binding De Novo donor-specific HLA antibody in kidney transplant recipients. *PLoS One*, 13, e0207434.
- Levitsky, J. 2011. Next level of immunosuppression: drug/immune monitoring. *Liver Transpl*, 17 Suppl 3, S60-5.
- Li, X. C. 2010. The significance of non-T-cell pathways in graft rejection: implications for transplant tolerance. *Transplantation*, 90, 1043-7.
- Liu, M. & Guo, F. 2018. Recent updates on cancer immunotherapy. *Precis Clin Med*, 1, 65-74.

- Loupy, A., Haas, M., Roufosse, C., et al. 2020. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 20, 2318-2331.
- Lozano-Ojalvo, D., Lopez-Fandino, R. & Lopez-Exposito, I. 2015. PBMC-Derived T Cells. In: VERHOECKX, K., COTTER, P., LOPEZ-EXPOSITO, I., KLEIVELAND, C., LEA, T., MACKIE, A., REQUENA, T., SWIATECKA, D. & WICHERS, H. (eds.) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH).
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., et al. 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135.
- Maglione, P. J. & Chan, J. 2009. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Immunol*, 39, 676-86.
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., et al. 2013. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*, 43, 2797-809.
- Maltzman, J. S. & Koretzky, G. A. 2003. Azathioprine: old drug, new actions. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1222-1224.
- Marshall, J. L., Zhang, Y., Pallan, L., et al. 2011. Early B blasts acquire a capacity for Ig class switch recombination that is lost as they become plasmablasts. *Eur J Immunol*, 41, 3506-12.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., et al. 2018. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14, 49.
- Mayer, K., Müller, M., Schmidt, J., et al. 2015. Intensivbehandlung nach Transplantation solider Organe. *Die Intensivmedizin*.
- Medzhitov, R. & Janeway, C. 2000. Innate Immunity. *The New England Journal of Medicine*, 343, 338-344.
- Mehra, N. K., Siddiqui, J., Baranwal, A., et al. 2013. Clinical relevance of antibody development in renal transplantation. *Ann N Y Acad Sci*, 1283, 30-42.
- Minton, K. 2015. B cell memory: A second chance for antibodies. *Nat Rev Immunol*, 15, 131.
- Monien, S., Salama, A. & Schonemann, C. 2006. ELISA methods detect HLA antibodies with variable sensitivity. *Int J Immunogenet*, 33, 163-6.
- Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G., et al. 2010. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol*, 162, 271-9.
- Muntean, A. & Lucan, M. 2013. Immunosuppression in kidney transplantation. *Clujul Med*, 86, 177-80.
- Murphy, K. M. 2011. *Janeway's Immunobiology*, Taylor & Francis Group.
- Ndungo, E. & Pasetti, M. F. 2020. Functional antibodies as immunological endpoints to evaluate protective immunity against Shigella. *Hum Vaccin Immunother*, 16, 197-205.
- Nicholson, L. B. 2016. The immune system. *Essays Biochem*, 60, 275-301.

- Nickel, P., Presber, F., Bold, G., et al. 2004. Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for Donor-Reactive Interferon-Gamma-Producing Cells Identifies T-Cell Presensitization and Correlates with Graft Function at 6 and 12 Months in Renal-Transplant Recipients. *Transplantation*, 78, 1640-1646.
- Ochando, J., Fayad, Z. A., Madsen, J. C., et al. 2020. Trained immunity in organ transplantation. *Am J Transplant*, 20, 10-18.
- Opelz, G., Wujciak, T., Back D., et al. 1994. Einfluß der HLA-Kompatibilität auf die Nierentransplantation. *Infusionsther Transfusionsmed*, 21, 198-202.
- Pan, J., Zhang, M., Wang, J., et al. 2004. Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunol Lett*, 94, 141-51.
- Paul, S. & Lal, G. 2017. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 8, 1124.
- Pena, J. R., Fitzpatrick, D. & Saidman, S. L. 2013. Complement-dependent cytotoxicity crossmatch. *Methods Mol Biol*, 1034, 257-83.
- Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., et al. 2013. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*, 37, 273-83.
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., et al. 2010. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*, 78 Suppl 1, S47-60.
- Petersone, L., Edner, N. M., Ovcinnikovs, V., et al. 2018. T Cell/B Cell Collaboration and Autoimmunity: An Intimate Relationship. *Front Immunol*, 9, 1941.
- Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*, 131, 959-71.
- Pils, U. & Anderhuber, F. 2018. Anatomie des Lymphsystems. *Journal für Ästhetische Chirurgie*, 12, 51-58.
- Pinder, C. L., Kratochvil, S., Cizmeci, D., et al. 2017. Isolation and Characterization of Antigen-Specific Plasmablasts Using a Novel Flow Cytometry-Based Ig Capture Assay. *J Immunol*, 199, 4180-4188.
- Pinna, D., Corti, D., Jarrossay, D., et al. 2009. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur J Immunol*, 39, 1260-70.
- Pohl, A. P., Venkatesha, S. H., Zhang, A. H., et al. 2020. Suppression of FVIII-Specific Memory B Cells by Chimeric BAR Receptor-Engineered Natural Regulatory T Cells. *Front Immunol*, 11, 693.
- Przybilla, B., Thomas, P. & Summer, B. 2001. Allergische Reaktionen auf Metallimplantate. *Dtsch Arztebl International*, 98, 1971-.
- Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., et al. 1999. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*, 55, 713-23.
- Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. 2016. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am*, 42, 15-31, vii.

- Ratajczak, W., Niedzwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Deptula, B., et al. 2018. Immunological memory cells. *Cent Eur J Immunol*, 43, 194-203.
- Resop, R. S. & Uittenbogaart, C. H. 2015. Human T-Cell Development and Thymic Egress: An Infectious Disease Perspective. *For Immunopathol Dis Therap*, 6, 33-49.
- Rheinlander, A., Schraven, B. & Bommhardt, U. 2018. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett*, 196, 22-32.
- Risley, C. A., Stone, S. L., Scharer, C. D., et al. 2020. Interferon gamma signaling regulates the generation of influenza-specific memory B cells. *The Journal of Immunology*, 204, 171.8-171.8.
- Rosenzweig, S. D. & Holland, S. M. 2005. Defects in the interferon-g and interleukin-12 pathways. *Immunological Reviews*, 203, 38-47.
- Rosser, E. C. & Mauri, C. 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42, 607-12.
- Sa, Q., Woodward, J. & Suzuki, Y. 2013. IL-2 produced by CD8+ immune T cells can augment their IFN-gamma production independently from their proliferation in the secondary response to an intracellular pathogen. *J Immunol*, 190, 2199-207.
- Sanz, I., Wei, C., Lee, F. E., et al. 2008. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol*, 20, 67-82.
- Sawitzki, B., Harden, P. N., Reinke, P., et al. 2020. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *The Lancet*, 395, 1627-1639.
- Schlosser, H. A., Thelen, M., Dieplinger, G., et al. 2017. Prospective Analyses of Circulating B Cell Subsets in ABO-Compatible and ABO-Incompatible Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*, 17, 542-550.
- Schoenborn, J. R. & Wilson, C. B. 2007. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses.
- Schroeder, H. W., Jr. & Cavacini, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S41-52.
- Schulze, T. J. & Bugert, P. 2018. Granulocytes: From Basic Research to Clinical Use. *Transfus Med Hemother*, 45, 288-289.
- Schwenk, R., Asher, L. V., Chalom, I., et al. 2003. Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-based vaccine. *Parasite Immunology*, 25, 17-25.
- Scott, K., Manunta, M., Germain, C., et al. 2005. Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology*, 116, 245-254.
- Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., et al. 2014. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol*, 5, 448.

- Shi, Z., Zhang, Q., Yan, H., et al. 2019. More than one antibody of individual B cells revealed by single-cell immune profiling. *Cell Discovery*, 5.
- Shiu, K. Y., McLaughlin, L., Rebollo-Mesa, I., et al. 2015. B-lymphocytes support and regulate indirect T-cell alloreactivity in individual patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int*, 88, 560-8.
- Sinkovics, J. G. & Horvath, J. C. 2005. Human natural killer cells: A comprehensive review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 27, 5-47.
- Slifka M. K., A. I. J. 2018. Plotkin's Vaccines. 84–95.
- Smith, S. G., Smits, K., Joosten, S. A., et al. 2015. Intracellular Cytokine Staining and Flow Cytometry: Considerations for Application in Clinical Trials of Novel Tuberculosis Vaccines. *PLoS One*, 10, e0138042.
- Soler, E. & Houdebine, L.-M. 2007. Preparation of recombinant vaccines.
- Sorvari, R. & Sorvari, T. E. 1977. Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ - Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological importance. *Immunology*, 32, 499-505.
- Statistisches_Bundesamt 2020. Gesundheitsbericht-erstellung des Bundes. Bonn: Statistisches Bundesamt.
- Strober, W. 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3 B 1-A3 B 3.
- Suwelack, B., Kribben, A. & Banas, B. 2018. Manual zur Vereinheitlichung der Evaluation vor Nierentransplantation und Nierenlebenspende, der Wartelistenführung vor Nierentransplantation und zur Nachsorge nach Nierentransplantation und Nierenlebenspende. In: NIERENTRANSPLANTATIONSZENTREN, A. D., (AACHEN/BOCHUM/BONN/DÜSSELDORF/ESSEN/HOMBURG-SAAR/, N.-W. & KIEL/KÖLN-LINDENTHAL/KÖLN-MERHEIM/LÜBECK/MAINZ/MANNHEIM/MARBURG/MÜNSTER) (eds.) *Arbeitsgemeinschaft der Nierentransplantationszentren Nordrhein-Westfalens*. Münster, Germany: Arbeitsgemeinschaft der Nierentransplantationszentren Nordrhein-Westfalens.
- Takeuchi, O. & Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-20.
- Talmage, D. W., Dart, G., Radovich, J., et al. 1976. Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science*, 191, 385-8.
- Tangye, S. G., Avery, D. T., Deenick, E. K., et al. 2003. Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol*, 170, 686-94.
- Tewari, K., Nakayama, Y. & Suresh, M. 2007. Role of direct effects of IFN-gamma on T cells in the regulation of CD8 T cell homeostasis. *J Immunol*, 179, 2115-25.
- Tian, C., Chen, Y., Liu, Y., et al. 2018. Use of ELISpot assay to study HBs-specific B cell responses in vaccinated and HBV infected humans. *Emerg Microbes Infect*, 7, 16.
- Valujskikh, A. N. 2015. B cells regulate antidonor T-cell reactivity in transplantation. *Kidney Int*, 88, 444-6.

- Vanwolleghem, T., Groothuisink, Z. M. A., Kreefft, K., et al. 2020. Hepatitis B core-specific memory B cell responses associate with clinical parameters in patients with chronic HBV. *J Hepatol*, 73, 52-61.
- Vazquez, M. I., Catalan-Dibene, J. & Zlotnik, A. 2015. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*, 74, 318-26.
- Waltari, E., Mcgeever, A., Friedland, N., et al. 2019. Functional Enrichment and Analysis of Antigen-Specific Memory B Cell Antibody Repertoires in PBMCs. *Front Immunol*, 10, 1452.
- Wehmeier, C., Karahan, G. E. & Heidt, S. 2020. HLA-specific memory B-cell detection in kidney transplantation: Insights and future challenges. *Int J Immunogenet*, 47, 227-234.
- Whitmire, J. K., Tan, J. T. & Whitton, J. L. 2005. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med*, 201, 1053-9.
- Wojciechowski, D. & Vincenti, F. 2012. Belatacept in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 17, 640-7.
- Wrammert, J., Smith, K., Miller, J., et al. 2008. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*, 453, 667-71.
- Wu, Y. C., Kipling, D. & Dunn-Walters, D. K. 2011. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol*, 2, 81.
- Yang, K. D., Bathras, J. M., Shigeoka, A. O., et al. 1989. Mechanisms of bacterial opsonization by immune globulin intravenous: correlation of complement consumption with opsonic activity and protective efficacy. *J Infect Dis*, 159, 701-7.
- Zhang, Q. & Reed, E. F. 2016. The importance of non-HLA antibodies in transplantation. *Nat Rev Nephrol*, 12, 484-95.
- Zhang, R. 2018. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 13, 182-192.
- Zou, Y. & Stastny, P. 2010. Role of MICA in the immune response to transplants. *Tissue Antigens*, 76, 171-6.
- Zygmunt, B. & Veldhoen, M. 2011. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv Immunol*, 109, 159-96.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organtransplantationen in Deutschland	12
Abbildung 2: Postmortale Organspenden in Deutschland.....	13
Abbildung 3: Konzentration und Affinität der Immunglobuline nach Impfung	23
Abbildung 4: Die DSA vermittelte Transplantatabstoßung.....	27
Abbildung 5: Funktionsweise des Luminex Assays.....	29
Abbildung 6: Schematische Illustration der Funktionsweise des total-IgG ELISpots	44
Abbildung 7: Belegscheema der 24-Well Platte zur Vorstimulation.....	45
Abbildung 8: Darstellung der Verteilung der PBMC und des zeitlichen Vorgehens im ELISpot	46
Abbildung 9: Belegscheema der 96-Well ELISpot Platte	47
Abbildung 10: Verteilung der PBMC auf die Stimulationen.....	50
Abbildung 11: PBMC im FACS-Dotplot SSC/FSC mit Markierung von Debris und PBMC.....	51
Abbildung 12: Aufteilung der Laser auf die Detektierkanäle	51
Abbildung 13: B- und T-Zell Panel mit funktionellem Assay	53
Abbildung 14: Belegung der 96 Well Platte für den IgG ELISA.....	56
Abbildung 15: Arbeitsschritte und Verteilung der PBMC im Zuge der MACS-Separation	57
Abbildung 16: Δ Ergebnisse der ELISpots Messungen der 8 Patienten vor und nach Transplantation	64
Abbildung 17: Trends der Anzahl detektierter Spots im Spender-spezifischen ELISpot in Zusammenhang mit einer Abstoßungsreaktion	65
Abbildung 18: Gatingstrategie des B- und T-Zell Panels ohne IFN- γ Gating der B-Zellen mit beispielhaften FACS-Bildern	69
Abbildung 19: Gatingstrategie des IFN- γ Gatings der B-Zellen im B- und T-Zell Panel mit beispielhaften FACS-Bildern	70
Abbildung 20: IFN- γ Produktion der T- und B-Zell Subpopulationen vor und nach 4h Stimulation mit BD LAC	71
Abbildung 21: Vitalität der PBMC über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848	73
Abbildung 22: Veränderung der CD45 ⁺ /CD3 ⁺ /CD19 ⁻ T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	75
Abbildung 23: Veränderung der CD4 ⁺ /CD8 ⁻ und CD4 ⁻ /CD8 ⁺ T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	76
Abbildung 24: Veränderung der CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD19 ⁺ B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	77

Abbildung 25: Veränderung Plasmablasten und Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848	79
Abbildung 26: Veränderung der class switched B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848	80
Abbildung 27: Veränderung der non class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	81
Abbildung 28: Veränderung der class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	82
Abbildung 29: IFN-γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ Helfer T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	84
Abbildung 30: IFN-γ Produktion in CD4⁻/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	85
Abbildung 31: IFN-γ Produktion in CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	86
Abbildung 32: IFN-γ Produktion in Plasmablasten über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848	87
Abbildung 33: IFN-γ Produktion in Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848	88
Abbildung 34: IFN-γ Produktion in class switched B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848	89
Abbildung 35: IFN-γ Produktion in non class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	90
Abbildung 36: IFN-γ Produktion in class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit IL-2 und R848.....	91
Abbildung 37: Vitalität der PBMC nach 4 Tagen Inkubation mit Engerix-B in verschiedenen Konzentrationen	92
Abbildung 38: Vitalität der PBMC nach 4 Tagen Inkubation und Stimulation mit HBs-Antigen	93
Abbildung 39: Population der CD3⁺/CD19⁻ T-Zellen nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	94
Abbildung 40: Veränderung der CD4⁺/CD8⁻ T-Helfer Lymphozyten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	95
Abbildung 41: Veränderung der CD4⁻/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	96
Abbildung 42: Veränderung der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	97
Abbildung 43: Veränderung der Plasmablasten nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	98
Abbildung 44: Veränderung der Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen	99

Abbildung 45: Veränderung der class switched B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen	100
Abbildung 46: Veränderung der non class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	101
Abbildung 47: Veränderung der class switched memory B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	102
Abbildung 48: Funktionelle IFN-γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ Helfer T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	103
Abbildung 49: Funktionelle IFN-γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ zytotoxischen T-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	104
Abbildung 50: Funktionelle IFN-γ Produktion in CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	105
Abbildung 51: Funktionelle IFN-γ Produktion in Plasmablasten über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen	106
Abbildung 52: Funktionelle IFN-γ Produktion in Plasmazellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen	107
Abbildung 53: Funktionelle IFN-γ Produktion in class switched B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	108
Abbildung 54: Funktionelle IFN-γ Produktion in non class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	108
Abbildung 55: Funktionelle IFN-γ Produktion in class switched memory B-Zellen über 4 Tage unter Stimulation mit HBs-Antigen.....	109
Abbildung 56: Interpolierte Standardkurve des IgG-ELISA	110
Abbildung 57: IgG-Konzentration im Medium bei Negativ- und Positiv-Stimulation über 4 Tage..	111
Abbildung 58: Populationen der class switched und non class switched memory B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach MACS-Separation.....	112
Abbildung 59: Population der CD3⁺/CD19⁻ T-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	113
Abbildung 60: Population der der CD4⁺/CD8⁻ T-Helfer Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	114
Abbildung 61: Population der CD4⁻/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	115
Abbildung 62: Population der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	116

Abbildung 63: Population der Plasmablasten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	118
Abbildung 64: Population der Plasmazellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	119
Abbildung 65: Population der class switched B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	120
Abbildung 66: Population der non class switched memory B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	121
Abbildung 67: Population der class switched memory B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	122
Abbildung 68: Funktionelle IFN-γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ Helfer T-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	124
Abbildung 69: Funktionelle IFN-γ Produktion in CD4⁻/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	125
Abbildung 70: Funktionelle IFN-γ Produktion in CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	126
Abbildung 71: Funktionelle IFN-γ Produktion in Plasmablasten aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	127
Abbildung 72: Funktionelle IFN-γ Produktion in class switched B-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen.....	128
Abbildung 73: Funktionelle IFN-γ Produktion in non class switched memory B-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	129
Abbildung 74: Funktionelle IFN-γ Produktion in class switched memory B-Zellen aus der angereicherten und depletierten PBMC-Fraktion nach 4 Tagen Stimulation mit HBs-Antigen	130
Abbildung 75: Ratios der CD3⁺/CD19⁻ T-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	131
Abbildung 76: Ratios der CD4⁺/CD8⁻ T-Helfer Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	132
Abbildung 77: Ratios der CD4⁻/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	133
Abbildung 78: Ratios der CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺ B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	134

Abbildung 79: Ratios der Plasmablasten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle	135
Abbildung 80: Ratios der Plasmazellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle	136
Abbildung 81: Ratios der class switched B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	137
Abbildung 82: Ratios der non class switched memory B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	138
Abbildung 83: Ratios der class switched memory B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen nach 4 Tagen Stimulation im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	139
Abbildung 84: Ratio der funktionellen IFN-γ Produktion in CD4⁺/CD8⁻ Helfer T-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen	140
Abbildung 85: Ratio der funktionellen IFN-γ Produktion in CD4⁻/CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen	140
Abbildung 86: Ratio der funktionellen IFN-γ Produktion in CD45⁺/CD3⁻/CD19⁺B-Lymphozyten in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen	141
Abbildung 87: Ratio der funktionellen IFN-γ Produktion in class switched B-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen	142
Abbildung 88: Ratio der funktionellen IFN-γ Produktion in non class switched memory B-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen	143
Abbildung 89: Ratio der funktionellen IFN-γ Produktion in class switched memory B-Zellen in den Gesamt-PBMC, sowie den angereicherten und depletierten PBMC-Fraktionen	143

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über in der Praxis verwendete Immunsuppressiva	31
Tabelle 2: Laborausstattung für FACS und ELISA	34
Tabelle 3: Laborausstattung ELISpot	35
Tabelle 4: Lösungen und Flüssigkeiten.....	36
Tabelle 5: Reaktionsgefäße und Verbrauchsmaterial	36
Tabelle 6: Materialien des ELISpot.....	37
Tabelle 7: FACS-Antikörper und Farbstoffe	37
Tabelle 8: Stimulationsreagenzien und FACS-Beads	38
Tabelle 9: Materialien des MACS	39
Tabelle 10: Software	39
Tabelle 11: Antikörperkonstellation zur Identifizierung der Populationen.....	52
Tabelle 12: Ausbeute der PBMC Isolation	60
Tabelle 13: Klinische Daten der Patienten.....	62
Tabelle 14: Tabellarische Ergebnisse der ELISpots Messungen der 8 Patienten vor und nach Transplantation.....	63
Tabelle 15: Ergebnisse der Titration mit Berechnung des Stain Index	67

12 Danksagung

Da eine wissenschaftliche Arbeit im Verlauf von über vier Jahren natürlich nie das Werk einer einzelnen Person sein kann, möchte ich an dieser Stelle einigen prägenden und besonderen Menschen danken.

Herrn Prof. Dr. Bazhin, der mir durch sein großartiges Fachwissen ein stets hilfreicher Betreuer war, der in den richtigen Momenten antreibt und den Rücken stärkt. Vielen Dank für das Vertrauen und die unglaublich schnellen Korrekturen. Jetzt bin ich nicht mehr zu jung und auch ohne Brille ein wenig intelligent.

Dem unterstützenden Team im Labor: Micha, die mir nicht nur den nötigen Respekt vor Laborarbeit aufgezeigt hat, sondern auch eine gute Freundin geworden ist, die notfalls auch noch weitere drei Stunden auf mich wartet. Auf dass wir bei jedem meiner Besuche das Niveau anpassen und bunte Fische wieder eine Bedeutung haben. Niki, die mir immer wieder gezeigt hat, dass Geschichten nicht immer von einer weitreichenden Erklärung profitieren. Ohne eure Unterstützung würde ich noch weiterhin vor einem leeren Blatt sitzen. Beatrice, die mir unermüdlich die Hilfe angeboten und gegeben hat, wenn ich gerade zu viel vorhatte. Nadine, Sev, Eva, Tommi, Elli und Tom für die angenehme Zusammenarbeit und die vielen Gespräche in der Küche, durch die ihr mir so manchen schwierigen Tag voll Laborarbeit aufgelockert habt.

Christian, mit Dir habe ich mein Studium bestritten und jeden Frust teilen können. So unterschiedlich unsere favorisierten Fachdisziplinen auch sind, so sehr brennen wir dafür.

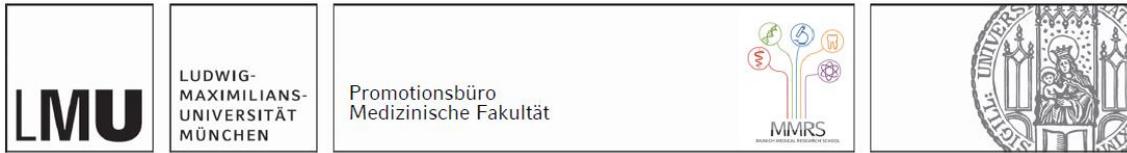
Meinen Eltern und meiner Schwester, die mein Vorhaben immer unterstützt haben und unermüdlich dabei waren mir zu zeigen wie es weiter gehen sollte.

Meinen Großeltern, die mir mit ihrem Stolz auf mich gezeigt haben, dass mein Weg nicht einfach, aber richtig ist. Danke auch für die vielen Kerzen, die wahrscheinlich massiv zur Erderwärmung beigetragen haben.

Sabrina, die mich in einer Phase des Aufbruchs kennengelernt hat, aber unermüdlich darin ist, an meiner Seite zu sein.

Die BW-Gruppe: Jonas, Patrick, Alex, Ilja, Corinna, Meghan, Daniel, Daniel, Daniel, Ronnie und alle die jetzt nicht namentlich genannt wurden. Durch euch habe ich wieder gelernt, dass man noch so viel erreichen kann, aber mit wunden Fingern und Chalk in der Nase das Weißbier immer noch am besten schmeckt.

13 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Theiner, Simon Johannes

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Antigen-spezifische memory B-Lymphozyten in der Transplantation - Immunophänotypisierung im Impfmmodell und die Rolle von memory B-Lymphozyten in der Immunantwort

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 24.07.2022

Ort, Datum

Simon Theiner

Unterschrift Doktorand