



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences
Fakultät Life Sciences

Hochschule für angewandte Wissenschaften

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Bachelorthesis

Charakterisierung von B-Lymphozyten als antigen-präsentierende
Zellen für die *in vitro* Stimulation von T-Lymphozyten

B. Sc. Biotechnologie

Von

Wittke, Samantha



Durchgeführt am Institut für Immunologie
Institutsdirektor Prof. Dr. Marcus Altfeld

Gutachter 1: Frau Prof. Dr. Cornelissen, Gesine (Life Sciences, HAW Hamburg)
Gutachter 2: Herr Prof. Dr. med. Haag, Friedrich (Institut für Immunologie, UKE)

Inhaltsverzeichnis

Abstract	IV
Zusammenfassung	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem und seine Funktionen	1
1.2. B-Lymphozyten als Antigenpräsentierende Zellen	2
1.3. Die T-Zell-Aktivierung als Immunantwort	3
1.4. <i>In vivo</i> Reifung von B-Lymphozyten – Vielseitigkeit der B-Zelle	4
1.5. Humanes Cytomegalievirus	7
1.6. Kultivierung und Charakterisierung von B-Lymphozyten.....	7
1.7. Detektion und Charakterisierung von T-Lymphozyten	9
1.8. Zielsetzung.....	10
2. Materialien	11
2.1. Geräte.....	11
2.2. Pipetten	11
2.3. Verbrauchsmaterial.....	12
2.4. Zellen, Zelllinien	12
2.5. Chemikalien und Reagenzien.....	13
2.6. Medien und Puffer	14
2.7. Antigene.....	15
2.8. Antikörper und Fluoreszenzen	15
2.9. Kit-Systeme.....	16
2.10. Software	16
3. Methoden	17
3.1. Methodenaufbau.....	17
3.2. Methoden Zelltechnik	17
3.2.1. Probennahme	17
3.2.2. Isolierung von mononukleären Zellen aus Leukozytenkonzentraten.....	17

3.2.3.	Kryokonservierung	17
3.2.4.	Zellzahlbestimmung.....	18
3.2.5.	Probenvorbereitung PBMCs.....	18
3.2.6.	Zellaufreinigung naiver B-Zellen	18
3.2.7.	Zellaufreinigung mit PluriSelect.....	19
3.3.	Methoden Zellkulturtechnik.....	20
3.3.1.	Zellkultur auftauen.....	20
3.3.2.	Zellkultivierung- und Erhaltung	21
3.3.3.	Zellbestrahlung	21
3.4.	Methoden der Zellstimulation	21
3.4.1.	Beladung von Spherotech-Beads mit Antikörpern und Antigenen.....	22
3.4.2.	<i>In vitro</i> Reifung von B-Lymphozyten mit rhCD154.....	22
3.4.3.	<i>In vitro</i> Reifung von B-Lymphozyten mit HEK-CD154.....	22
3.4.4.	Antigenspezifische T-Lymphozyten Stimulation	22
3.5.	Methoden zur Zell-Charakterisierung.....	23
3.5.1.	Zellmarkierung Oberflächenfärbung.....	23
3.5.2.	Zellmarkierung intrazelluläre Färbung.....	23
3.5.3.	<i>In vitro</i> Charakterisierung der B-Zell-Reifung	23
3.5.4.	<i>In vitro</i> Charakterisierung von Kurzzeit T-Lymphozyten Stimulation	25
3.5.5.	<i>In vitro</i> Charakterisierung von Langzeit T-Lymphozyten Stimulation.....	26
3.6.	Magnetische Zellsortierung aktivierter T-Lymphozyten	28
3.7.	Methoden zur Detektion und Auswertung	28
3.7.1.	Durchflusszytometrie	28
4.	Ergebnisse	30
4.1.	<i>In vitro</i> B-Lymphozyten-Reifung.....	30
4.1.1.	Kultivierung von HEK CD154	30
4.1.2.	Expression von CD154 auf der Zelloberfläche.....	31
4.1.3.	<i>In vitro</i> Reifung naiver B-Zellen über 8 Tage	32
4.1.4.	<i>In vitro</i> Reifung von B-Zellen mit Hilfe von IL-4 und rhCD40L.....	34
4.2.	Antigenpräsentation: <i>In vitro</i> Stimulation von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten.....	36

4.2.1.	Aktivierung von T-Zellen durch aufgereinigte B-Zellen	36
4.2.2.	Kurzzeit-Protokoll mit Nachweis der T-Zell-Aktivierung durch Expression von CD154 und CD137.....	38
4.3.	Targeting von B-Lymphozyten: gezieltes Einschleusen von Antigenen in den Prozessierungs- und Präsentationsweg von B-Lymphozyten	41
4.3.1.	Aufnahmefähigkeit von Beads durch B-Zellen	41
4.3.2.	Antigenpräsentation durch IgM tragende B-Lymphozyten.....	42
4.3.3.	Antigenpräsentation durch IgG tragende B-Lymphozyten	43
4.3.4.	Langzeit <i>in vitro</i> Stimulation IgG positiver B- Lymphozyten.....	44
4.3.5.	Gezielte Reifung und Antigenaufnahme von B-Lymphozyten und anschließende <i>in vitro</i> T-Zell-Stimulation	45
4.4.	Anreicherung und Analyse spezifisch aktivierter T-Lymphozyten.....	48
4.4.1.	Stimulation und Aufreinigung von antigenspezifischen T-Lymphozyten aus PBMCs .	48
4.4.2.	Aufreinigung mittels EasySep von antigenspezifischen T-Lymphozyten	49
5.	Diskussion.....	52
5.1.	<i>In vitro</i> B-Lymphozyten-Reifung.....	52
5.2.	Antigenpräsentation: <i>In vitro</i> Stimulation von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten.....	53
5.3.	Targeting von B-Lymphozyten: gezieltes Einschleusen von Antigenen in den Prozessierungs- und Präsentationsweg von B-Lymphozyten	55
6.	Fazit und Ausblick	57
7.	Danksagung	58
8.	Literaturverzeichnis.....	59
9.	Anhang	64
9.1.	CD-Nomenklatur	64
9.2.	Gefahrenstoffhinweise	66
	H- und P-Sätze	66
9.3.	Eidesstattliche Erklärung	67

Abstract

B cells play a central part in the immune response. Besides their role as producers of antibodies, they are also important antigen-presenting cells (APCs). Unlike other APCs, B cells can specifically take up antigens from the environment via their B cells receptors (BCRs), process them, and present them to T helper cells. This causes the activation of antigen specific T cells that can be detected on the basis of their expression of surface activation markers by flow cytometry. The goal of this study was to evaluate the potential of using human B cells as APCs to elicit antigen-specific T-cell responses *in vitro*. We therefore studied the antigen-presenting capacity of B lymphocytes. The first aim of these studies was to improve diagnostic methods for detecting antigen-specific T cell responses *in vitro*. A further aim was to develop a method to evaluate the B cell function of antigen presentation in a diagnostic setting.

In this study human B lymphocytes were loaded with model antigens, and their capacity to activate T lymphocytes from the same donor was tested. To this end, B and T lymphocytes were isolated from whole blood samples or leucocyte concentrates. The immunodominant pp65 protein of the human cytomegaly virus (CMV), as well as the influenza vaccine Vaxigrip were used as model antigens. These antigens were coupled to small (2 μ m) fluorescent latex microbeads that could be internalized by B cells, and that could be detected by flow cytometry even following their internalization. in order to facilitate the uptake of the microbeads by B cells, the beads were also coated with antibodies specific for the BCR. The results show that the coating of beads with anti-BCR antibodies is necessary and sufficient to promote uptake by B lymphocytes. Furthermore, it could be shown that the uptake of antigen-coated beads by B lymphocytes constitutes a good method for eliciting antigen-specific T cell responses *in vitro*.

Zusammenfassung

B-Lymphozyten nehmen in der Immunantwort eine zentrale Stellung ein. Neben ihrer Rolle als Produzenten von Antikörpern sind sie auch wichtige Antigen-präsentierende Zellen (APZ). Anders als andere APZ können B-Zellen über ihren B-Zell-Rezeptor (BZR) spezifisch Antigene aus der Umgebung aufnehmen, um sie innerhalb der Zelle zu prozessieren und anschließend auf der Zelloberfläche mit Hilfe von MHC-II-Molekülen T-Helfer-Zellen zu präsentieren. Dies führt zur Stimulation von Antigen-spezifischen T-Zellen, welche durch die Expression von Aktivierungsmarkern im Durchflusszytometer detektiert werden können. In dieser Arbeit sollten menschliche B-Zellen in Bezug auf ihre Nutzbarkeit für die Auslösung spezifischer T-Zell-Antworten *in vitro* untersucht werden. Dazu wurde vor allem ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation untersucht. Diese Untersuchungen dienten einerseits dem Ziel, Methoden zur Detektion Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten zu verbessern, andererseits sollten auch Methoden zur Beurteilung der B-Zell-Funktion entwickelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden B-Lymphozyten mit Modellantigenen beladen und ihre Fähigkeit getestet, T-Lymphozyten aus dem gleichen Spender zu aktivieren. Dazu wurden B- und T-Lymphozyten aus Vollblutproben oder Leukozytenkonzentraten isoliert. Als Modellantigene dienten das immundominante pp65-Antigen des humanen Cytomegalievirus (CMV) und der Grippeimpfstoff Vaxigrip. Um die B-Lymphozyten mit spezifischen Antigenen zu beladen, wurden diese an kleine (2µm) fluoreszierende Latex-Beads gekoppelt, die von B-Zellen internalisiert werden können und durch ihre Eigenfluoreszenz auch nach der Internalisierung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden können. Um die Aufnahme der Beads durch B-Zellen zu vermitteln wurden die Beads außerdem mit Antikörpern gegen den BZR beschichtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung mit anti-BZR-Antikörpern notwendig und ausreichend ist, um eine Aufnahme der Beads in die B-Zellen zu vermitteln. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Antigen-beschichtete Beads, die in B-Zellen eingebracht werden, eine gute Methode darstellen, Antigen-spezifische T-Zell-Antworten *in vitro* auszulösen.

Abkürzungsverzeichnis

+	positiv
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpresentig cells (Antigen-präsentierende-Zellen)
BAFF	B cell activating factor of the TNF family (B-Zell aktivierende Faktoren der TNF Familie)
Bcl-2	B-cell lymphoama 2
BSA	Bovine Serum Albumin
BZR	B-Zellrezeptor
Ca	circa
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	Cluster of Differentiation 40 ligand
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DZ	dendritische Zellen
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Forward Scatter
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
h	hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser

Abkürzungsverzeichnis

HEK	human Embryonic Kindney cells
HEK-CD154	human Embryonic Kindney cells mit CD154 transfiziert
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure- Puffer
ICS	intracellular Cytokin staining (Intrazellulärer Zytokin Färbung)
IL	Interleukin
l	Liter
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mM	millimolar
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCPCy5.5	Peridinchlorophyll-Cyanine 5.5
rhCD40L	rekombinater CD40 Ligand
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut -Zellkulturmedium
TCR	Tcell-receptor (T-Zellrezeptor)
T _H Z	T-Helfer-Zelle
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Antigenpräsentation an T-Helfer-Zelle mittels B-Zelle.....	2
Abbildung 2: Aktivierung von T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation	3
Abbildung 3: Stadien der B-Zell-Reifung.....	5
Abbildung 4: Fluoreszenz Beads mit Antigenen und Antikörpern.....	8
Abbildung 5: Auswertung der B-Zell-Reifung.....	24
Abbildung 6: Auswertung der Kurzzeitstimulation von T-Lymphozyten.	25
Abbildung 7: Auswertung der Langzeitstimulation von T-Lymphozyten.	27
Abbildung 8: Darstellung von HEK CD154 Zellen nach zweiwöchiger Kultivierung.....	31
Abbildung 9: Darstellung der Expression von CD154 auf der Zelloberfläche untransfizierter und transfizierte HEK-Zellen.	31
Abbildung 10: Reifung naiver B-Zellen in vitro nach achttägiger Inkubation.....	33
Abbildung 11: In vitro Reifung von B-Lymphozyten über 7 Tage in Gegenwart von rhCD154 und IL-4.	34
Abbildung 12: Aufreinigung von T-und B-Zellen aus Vollblut.....	36
Abbildung 13: T-Zell-Proliferation und Aktivierung über 7 Tage	37
Abbildung 14: Kurzzeit-Protokoll zur antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung.....	39
Abbildung 15: Antikörper vermittelte Aufnahme von Beads durch B-Lymphozyten.....	41
Abbildung 16: T-Zell-Aktivierung mittels gezielter Einschleusung von IgM Beads in B- Lymphozyten.	42
Abbildung 17: In vitro Antigenpräsentation durch IgG tragenden B-Lymphozyten.....	43
Abbildung 18: T-Lymphozyten Proliferation und Aktivierung für 7 Tage.....	44
Abbildung 19: Aktivierte T-Lymphozyten nach Stimulation durch Antigen-spezifische B-Zellen	46
Abbildung 20: Aufgereinigte antigenspezifische T-Zellen.	48
Abbildung 21: Aufgereinigte CD4 positive antigenspezifische T-Zellen.....	49
Abbildung 22: Aufgereinigte CD8 positive antigenspezifische T-Zellen.....	50

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem und seine Funktionen

Lebewesen sind ständig von Mikroorganismen, Toxinen und Viren umgeben, welche eine pathogene Wirkung auf den menschlichen Organismus ausüben können. Der Körper ist in der Lage sich vor infektiösen Agentien, ihren Giften und den dadurch verursachten Schaden zu schützen. Durch das Zusammenspiel von unzähligen Zellen und Molekülen, welche das Immunsystem bilden, ist die Abwehr von Krankheitserregern und die anschließende Ausheilung des Körpers möglich [1, 52].

Das angeborene Immunsystem bildet eine erste Verteidigungslinie gegen Infektionen und Pathogene welche bestimmte Molekülmuster aufweisen. Dies ermöglicht eine rasche Reaktion innerhalb von Minuten bis Stunden. Zusätzlichen Schutz bieten die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. Diese können eine Vielzahl von verschiedenen Antigenen aus Bakterien, Viren und anderen pathogenen Organismen spezifisch erkennen [2].

Die für ein Antigen spezifischen T-Zellen sind in der Regel nur in geringer Kopienzahl im Organismus vorhanden. Die relative Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen hängt von der vorherigen Erfahrung des Organismus mit dem Antigen ab. Handelt es sich um einen Krankheitserreger mit dem der Organismus wiederholt infiziert worden ist, so haben sich spezifische T-Gedächtniszellen gebildet und vermehrt. Antigene, die noch keine Infektion ausgelöst haben, werden von wenigen naiven T-Zellen erkannt [2].

Unter einem Antigen versteht man ein beliebiges Molekül, oder einen Teil davon, welches spezifisch von den Antigen-Rezeptoren (B-Zell-Rezeptor, BZR, und T-Zell-Rezeptor, TZR) der B- und T-Lymphozyten erkannt werden kann. Das Antikörpermolekül hat zwei getrennte Funktionen: zum einen die spezifische Bindung an den Erreger oder seine Produkte, welche die Immunantwort hervorgerufen haben; zum anderen die Rekrutierung anderer Zellen und Moleküle, um den Erreger zu neutralisieren, sobald der Antikörper gebunden ist.

Zu den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) zählen Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Die Variabilität von Antikörpermolekülen ermöglicht es jedem Antikörper, ein anderes spezifisches Antigen zu binden. Dabei ist das Gesamtrepertoire von Antikörpern, die von jedem Individuum hergestellt werden, groß genug, um sicherzustellen, dass jede Struktur erkannt werden kann [3, 52]

1.2. B-Lymphozyten als Antigenpräsentierende Zellen

Die B-Lymphozyten gehören neben dendritischen Zellen und Makrophagen zu den APZ [5, 6]. Im Verhältnis zu den anderen APZs kommt den B-Zellen eine besondere Rolle in der Entwicklung einer Immunantwort zu. Während dendritische Zellen aufgrund ihrer breiten Verteilung an den Außengrenzen des Organismus und ihrer Fähigkeit, durch Pinozytose und Phagozytose unspezifisch Substanzen aufzunehmen die Hauptrolle bei der Einleitung einer primären Immunantwort gegen einen noch unbekanntem Erreger spielen, sind B-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit, spezifische Antigene über ihren BZR gezielt aufzunehmen ein wichtiger Pfeiler der Sekundärantwort gegen bekannte Erreger [4, 5, 6].

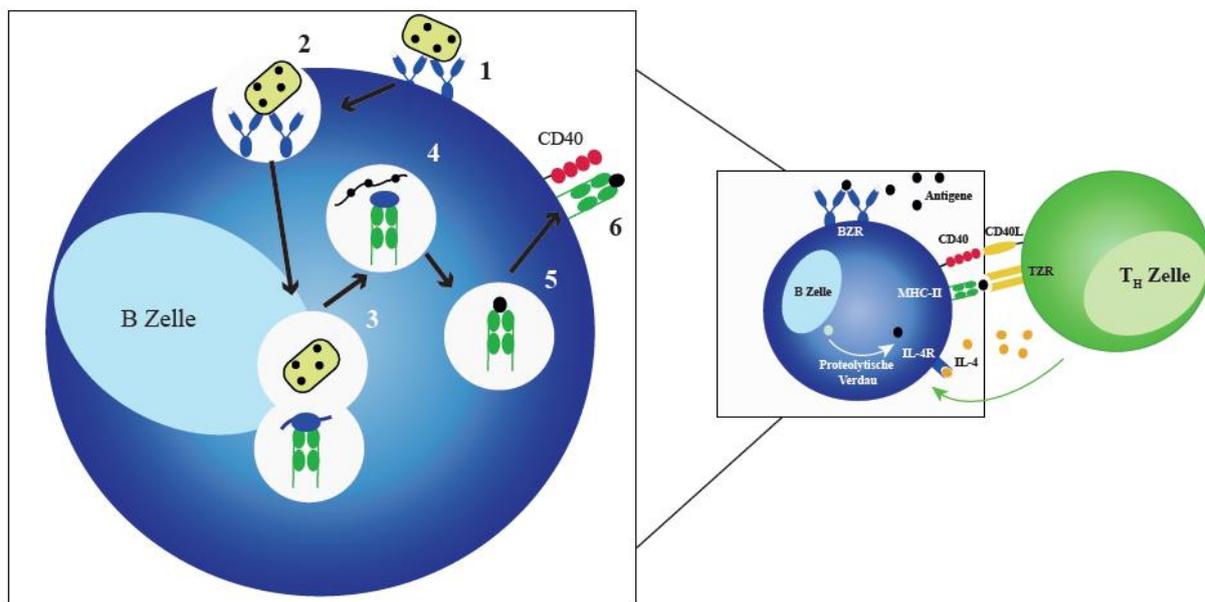


Abbildung 1: Antigenpräsentation an T-Helfer-Zelle mittels B-Zelle

1. Die B-Zelle erkennt ein Antigen durch auf der B-Zell-Oberfläche exprimierte Antikörpermoleküle, welche den B-Zell-Rezeptor (BZR) darstellen. **2.** Durch Endozytose wird das Antigen internalisiert. **3.** MHC-II/li Komplexe gelangen durch ein Vesikel in die Nähe des internalisierten Antigens **4.** Das Antigen wird in der Zelle prozessiert und in seine Peptidanteile zerlegt. **5.** Durch die Interaktion von Chaperonproteinen wird der Rest der li auf dem MHC II Rezeptor gegen das Peptid des Antigens ausgetauscht. **6.** Der MHC-II-Peptid-Komplex wird an der Zelloberfläche präsentiert und dient gemeinsam mit CD40 zur T-Zell Aktivierung.

Die Antigenaufnahme bei B-Zellen erfolgt über den BZR. Der BZR ist ein auf der B-Zell-Oberfläche exprimiertes Immunglobulin- (Antikörper-) Molekül. Dabei trägt jede B-Zelle den für sie eigenen BZR mit einer eigenen Spezifität. Zusammen genommen sind die B-Zellen eines Organismus im Stande, nahezu jede Art von Antigen, wie zum Beispiel Glykoproteine, Proteine oder Polysaccharide, zu erkennen und zu binden. Die molekulare Struktur des Antigens welche vom BZR erkannt wird, wird als Epitop bezeichnet. Vom BZR erkannte Antigene werden internalisiert und prozessiert (siehe Abbildung 1) [7, 8]. Die Internalisierung erfolgt mittels Endozytose, wobei sich die Plasmamembran mit Hilfe zellulärer Proteine wie Clathrin oder

Caveolin einstülpt. Anschließend wird das Antigen für die anschließende Beladung des MHC-II-Moleküls prozessiert, indem es durch zelluläre Proteasen wie Cathepsine in Peptidfragmente gespalten wird [9, 10].

Im Immunsystem unterscheidet man zwischen zwei Arten von MHC-Molekülen: MHC-I und MHC-II [10, 11]. Ersteres dient zur Präsentation von Antigenen aus dem Zellinneren (Zytoplasma) für $CD8^+$ T-Zellen. Dagegen präsentieren MHC-II-Moleküle Antigene aus dem extrazellulären Milieu für T-Helfer-Zellen ($CD4^+$ T-Zellen, T_HZ) [10, 12]. Die MHC-II-Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) der B-Zelle synthetisiert und anschließend mit einer invarianten li-Kette versetzt, welche die willkürliche Beladung mit Antigenpeptiden verhindert. Das li wird zum größten Teil durch Proteasen abgebaut (Abb. 1.3). Ein Rest, das Class-II-associated invariant-chain-peptide-Fragment (CLIP) bleibt an der Antigenpeptid-Bindungsstelle und wird von Chaperonproteinen, unter anderem HLA-DM und HLA-DO, durch das Antigenpeptid ausgetauscht (siehe Abbildung 1, 5). Das nun erfolgreich beladene MHC-II-Molekül kann T-Helfer-Zellen präsentiert werden [13, 14].

1.3. Die T-Zell-Aktivierung als Immunantwort

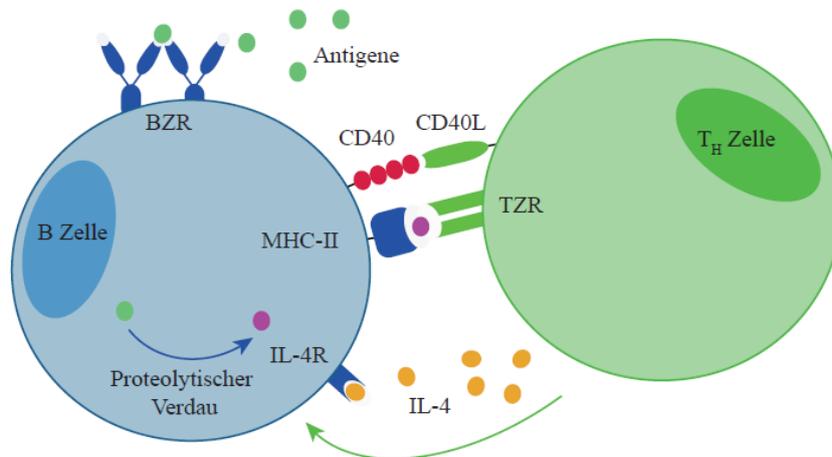


Abbildung 2: Aktivierung von T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation

Antigene werden mit Hilfe des BZR internalisiert, prozessiert, und als Peptidfragmente auf MHC-II-Molekülen für T Zellen präsentiert. Die antigenspezifische T Zelle bindet den MHC-II Antigen-Komplex und wird stimuliert. Durch die Stimulation setzt die T Zelle Zytokine wie Interleukin 4 frei, welches von dem IL-4- Rezeptor der B-Zelle erkannt wird.

Die Mechanismen der Antigenerkennung von T- und B-Lymphozyten unterscheiden sich grundsätzlich. Während B-Zellen ihr Antigen mit Hilfe ihres B-Zell-Rezeptors direkt erkennen und binden können, sind T-Zellen dazu nicht in der Lage. Um T-Zellen zu aktivieren sind APZs wie z.B. B-Zellen erforderlich. Der TZR erkennt ausschließlich den Komplex aus MHC und Antigen [15]. Dieser Mechanismus dient vor allem zum Schutz vor ungewollter Aktivierung von T-Zellen.

Naive T-Zellen benötigen zur Aktivierung noch eine Verstärkung des TZR-Signals durch Ko-Stimulation. Dabei wird CD28 als ko-stimulatorisches Molekül auf der Oberfläche von naiven T-Zellen durch CD80 und CD86 auf der Oberfläche von APZ gebunden [17,18,19,20]. THZ differenzieren zu verschiedenen T-Helfer-Subpopulationen, die nach ihrer Aktivierung unterschiedliche Zytokine produzieren. THZ können ihrerseits B-Zellen aktivieren und bewirken durch Zellkontakt und sezernierte Zytokine einen Wechsel des Immunglobulin-Isotyps von IgM zu IgG, IgA oder IgE auf der Zelloberfläche [21].

1.4. *In vivo* Reifung von B-Lymphozyten – Vielseitigkeit der B-Zelle

B-Zellen sind vor allem im Knochenmark und im lymphatischen Gewebe vorhanden. Wegen der Entwicklung und Bildung der B-Zelle im Knochenmark (*bone marrow*) erhielt die B-Zelle ihren Namen. Im Laufe ihrer Entwicklung erlangt die B-Zelle unterschiedliche Fähigkeiten. Beispielsweise die Eigenschaft Antigene aufzunehmen und durch MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu präsentieren sowie Antikörper zu produzieren. Dabei verweilen die Vorläufer der B-Zellen im Knochenmark und wandern durch die Blutbahnen in das lymphatische Gewebe ein. Die B-Zell-Entwicklung umfasst einen Antikörper-Abhängigen und unabhängigen Teil.

Die B-Zellen stammen von lymphatischen Vorläufern ab, welche im Knochenmark gebildet werden. Dort findet die frühe Entwicklung statt, die mit der Bildung des B-Zell-Rezeptors (BZR) abgeschlossen ist. Dieser besteht aus zwei jeweils identischen schweren und leichten Ketten [27]. Im pro-B-Zellstadium erfolgt zunächst die Umordnung der Gensegmente der schweren Kette. Danach folgt bei den entstandenen prä-B-Zelle die Umordnung der leichten Kette [22].

Nun erfolgt die negative Selektion. Der BZR wird auf seine Spezifität geprüft. Bindet er an Autoantigene besteht die Gefahr von Autoimmunreaktionen [26], und es wird die Apoptose eingeleitet. Unreife B-Zellen, die nicht an Autoantigene binden, wandern über die Blutbahn in die peripheren Lymphorgane wie Milz oder Lymphknoten, wo die weitere Differenzierung der unreifen B-Zellen erfolgt. Nach Stimulation des BZR beginnt die B-Zelle zu proliferieren, es erfolgt die positive Selektion und Differenzierung zur reifen B-Zelle. Für den Übergang von unreifen zu reifen B-Zellen ist der B-Zell-aktivierende Faktor (B cell activating factor of TNF family, BAFF) notwendig [23].

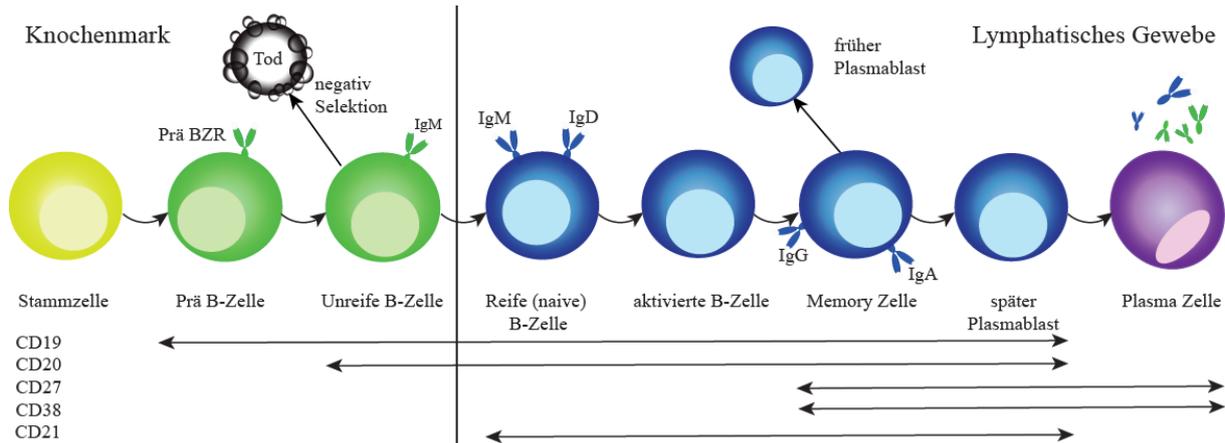


Abbildung 3: Stadien der B-Zell-Reifung

Im Knochenmark reifen Stammzellen zu Prä-B-Zellen heran, diese bilden einen Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BZR) aus. Auf der Oberfläche wird CD19 exprimiert. Unreife B-Zellen haben einen IgM BZR auf der Oberfläche und exprimieren CD20. Durch negative Selektion wird verhindert, dass unspezifische Rezeptoren gebildet werden. Reife B-Zellen wandern in das lymphatische Gewebe und in das Gehirn und tragen auf ihrer Oberfläche CD21, IgM und IgD Immunglobuline. Durch Aufnahme von Antigenen können diese Zellen zu aktivierten B-Zellen reifen. Memory-B-Zellen tragen Antikörperklassen wie IgG, IgA oder IgE und exprimieren CD27 und CD38 auf ihrer Oberfläche. Späte Plasmablasten tragen keine Antikörper auf ihrer Oberfläche. Letztlich reifen B-Zellen weiter zu antikörperbildenden Plasmazellen, welche ebenfalls CD27 und CD38 auf der Zelloberfläche exprimieren.

Naive B-Zellen können teilweise direkt, ohne T-Zellen, aktiviert werden. Dies führt zur Differenzierung der B-Zellen zu IgM produzierenden Plasmazellen (Abb. 3). Antigene, welche aus sich wiederholenden Epitopen aufgebaut sind und somit durch die Bindung mehrerer BZR eine Kreuzvernetzung der Rezeptoren verursachen, können eine solche direkte Aktivierung hervorrufen. Diese Art von Aktivierung wird als thymusunabhängige Aktivierung bezeichnet. In der thymusabhängigen Reifung benötigt die B-Zelle zur Aktivierung und Differenzierung zu einer Plasmazelle die Hilfe von T_HZ . Die Aktivierung führt zur Ausbildung von Gedächtniszellen und zum Klassenwechsel der Immunglobuline. Für die B-Zell-Reifung werden unter anderem Mitglieder der BAFF-Zytokin-Familie benötigt. Diese überlebenswichtigen Signale werden teilweise durch dendritische Zellen übermittelt und binden an den BAFF-Rezeptor, welcher nach Antigenkontakt stimuliert wird [22, 23, 24, 25].

Die Stimulation des BZR ist entscheidend für die Entwicklung, das Überleben und die Immunantwort von B-Lymphozyten. Die vom BZR erzeugten Signale arbeiten nicht isoliert. So wird auf reifen B-Zellen CD40 durch den entsprechenden Liganden CD40L (CD154) auf den T-Zellen stimuliert. T-Zell-abhängigen Signale fördern ebenfalls die Keimzentrumbildung und B-Zell-Differenzierung. In dieser Konstellation wird ein begrenzter Satz von B-Zellen zunächst durch Antigen-Bindung aktiviert und dann über CD40 durch antigenspezifische T-

Zellen weiter stimuliert, wodurch die Spezifität der resultierenden serologischen Immunantworten sichergestellt wird [41].

Die Bindung von CD40L (CD154) an CD40, das auf B-Zellen konstitutiv exprimiert wird, veranlasst die B-Zelle in den Zellzyklus einzutreten und verstärkt CD80 und CD86 zu exprimieren [33, 34]. Diese Moleküle fördern wiederum die Differenzierung der T_HZ , ein Prozess, der durch die Interaktion der ko-stimulierenden Moleküle 4-1BB (auf der T-Zelle) mit 4-1BBL (auf der B-Zelle) verstärkt wird. Von der T-Zelle sezernierte Zytokine unterstützen die Signale der ko-stimulierenden Moleküle und führen zum Klassenwechsel der aktivierten B-Zelle und zu deren Differenzierung zu Plasmazellen. Das erste Immunglobulin, das bei einer primären Immunantwort gebildet wird, ist immer IgM. Es ist auch das charakteristische Immunglobulin der primären Immunantwort. Erst später im Verlauf der Immunreaktion können IgG und andere Antikörperklassen hinzukommen. Mithilfe der T-Zellen reifen die selektierten B-Zellen entweder zu Gedächtniszellen oder zu Plasmazellen [29].

Im fortgeschrittenen Verlauf einer Primärantwort können B-Zellen einen sogenannten Klassenwechsel durchführen (Abb. 3). Der Klassenwechsel betrifft lediglich die konstante Region der schweren Kette des Antikörpers. Statt IgM wird nun IgG, IgA oder IgE auf der B-Zell-Oberfläche exprimiert [29, 30]. Der Klassenwechsel ist nur mit Unterstützung von T_HZ und der von ihnen sezernierten Zytokine und Interleukine möglich. Den Anstoß zum Klassenwechsel gibt die T-Helferzelle über die CD40L/CD40-Interaktion. Je nachdem, welche T_H -Subpopulation (TH1, TH2 und TFH) mit den B-Zellen assoziiert ist, werden unterschiedliche Zytokine und Interleukine ausgeschüttet. Sie entscheiden, zu welcher Immunglobulinklasse der Wechsel erfolgen soll. Interleukin 4 (IL-4) dient zur Aktivierung von B-Zellen und zum Klassenwechsel zu IgG B-Zellen [28, 31, 32].

Nach dem Isotypenwechsel differenzieren die B-Zellen zu Plasmazellen, die IgG, IgA oder IgE produzieren. Die verschiedenen Immunglobulinklassen haben die gleiche Antigen-spezifität, aber unterschiedliche Effektorfunktionen. Plasmazellen unterscheiden sich deutlich von B-Zellen. Sie teilen sich nicht mehr, tragen kaum noch membranständige Immunglobuline und exprimieren keine MHC-Klasse-II-Moleküle mehr. Sie können also nicht mehr mit T-Helferzellen interagieren. Ihre Hauptaufgabe ist die Ausschüttung großer Mengen löslicher spezifischer Immunglobuline. Diese sorgen für einen dauerhaften spezifischen Antikörpertiter im Blut gegen den Krankheitserreger beziehungsweise Impfstoff. Bei einer erneuten Infektion mit einem bekannten Erreger, wird dieser sofort von den vorhandenen Antikörpern neutralisiert [33].

1.5. Humanes Cytomegalievirus

In dem Abschnitt 1.1 und 1.2 wird dargestellt, dass Antigene sämtliche Arten von Peptiden, Glykoproteinen oder ähnliches sein können. Ebenfalls Teile von viraler DNA können als Antigen erkannt werden. Einer dieser Viren stellt das humane Cytomegalievirus (HCMV) dar, welches zur Familie der Herpesviridae gehört. Der HCMV gehört zu den DNA-Viren und enthält doppelsträngige DNA. Die Übertragung des Virus erfolgt über die Schleimhaut oder Blutkomponenten. Die Häufigkeit HCMV infizierter Menschen ist generell in Industriestaaten geringer als in Entwicklungsländern. Dort liegt die Rate an infizierten Erwachsenen teilweise bei 100 %. In Industriestaaten hingegen liegt das Vorkommen an infizierten Erwachsenen bei 40 bis 70 %. Da der Virus über die Schleimhaut oder Blutkomponenten übertragen wird, kann eine Infektion durch Transplantation auftreten [37]. Eine weitere Risikogruppe stellen werdende oder stillende Mütter dar. Durch vaginale Sekrete und Muttermilch kann der HCMV auf den Föten oder das Kind übertragen werden [38, 39].

Die Erstinfektion mit dem HCMV ist besonders bei immunschwachen Menschen gefährlich. Dabei kann sich die Infektion auf die Organe ausbreiten und Krankheiten, wie Enzephalitis, Pneumonie, Retinitis, Hepatitis, Nephritis, Colitis und Splenomegalie hervorrufen. Insgesamt führt eine HCMV-Infektion zu einer unspezifischen Inhibition der zellulären Abwehr, durch die Inhibition von CD4-positiven T-Lymphozyten. Die Infektion mit HCMV kann diagnostisch mit Hilfe von PCR, oder indirekt durch IgM- und IgG-Antikörpern festgestellt werden [36, 38].

Gesunde Menschen erleiden bei Erstinfektion oftmals grippeähnliche Symptome, unter anderem mit Fieber. Bei immunschwachen Personen, wie Frühgeborenen, HIV-Infizierten und Empfängern von allogenen Stammzelltransplantaten, kann die Erstinfektion zu schweren Krankheitsbildern bis hin zum Tod führen. Weitere Risikogruppen sind schwangere Frauen und stillende Mütter, die die Infektion auf das Kind übertragen können [35, 38].

1.6. Kultivierung und Charakterisierung von B-Lymphozyten

Außerhalb des Körpers sterben B-Zellen schnell ab, wenn sie keine Stimulation oder Überlebenssignale bekommen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden B-Zellen aufgereinigt, mit Antigenen beladen und stimuliert, um ihre Fähigkeiten zur Antigenpräsentation zu erhöhen. Dazu wurden sie aus peripherem Blut aufgereinigt, und über verschiedene Zeiten in Kultur gehalten. Um das Überleben der B-Zellen zu steigern und ihre Reifung zu APZ zu unterstützen wurden daher in der Kultur einige Überlebenssignale künstlich substituiert. Ein solches Überlebenssignal ist die Bindung von CD40 auf der B-Zell Oberfläche durch den CD40-Ligand (CD154) [43, 28]. Bei der Zugabe von löslichem CD154 muss berücksichtigt werden, dass

CD154 natürlicherweise als membranständiges Trimer vorkommt, und dass monomeres CD154 nur schlecht an CD40 bindet. Eine Alternativmöglichkeit ist dadurch gegeben, dass die B-Zellen auf CD154-exprimierenden Feeder-Zellen kultiviert werden. Zu diesem Zweck wurde im Verlauf der Arbeit eine CD154 exprimierende HEK-Zelllinie, welche durch stabile Transfektion hergestellt wurden, verwendet. Neben CD154 wurde in einigen Versuchen ebenfalls das Zytokin IL-4 dazugegeben.

Der Erfolg einer Aktivierung oder Aufreinigung von B-Zellen kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft werden. Dabei werden verschiedene Oberflächenmoleküle von B-Zellen zur Charakterisierung und Detektion verwendet. B-Zellen werden durch die Expression von CD19 oder CD20 identifiziert. Als Marker für die Reifung der B-Zellen zu APZ haben wir die Expression der Marker CD21, CD86 und HLA-DR (MHC II) überprüft. Bei der Reifung zu APZ nimmt die Expression von CD21 ab, während CD86 und HLA-DR hochreguliert werden [29, 24].

Als Modellantigene zur Beurteilung der APZ-Funktion wurden das pp65 Antigen des CMV sowie der Grippeimpfstoff Vaxigrip verwendet. Um diese in den Prozessierungsweg der B-Zellen einzuschleusen, wurden diese gemeinsam mit Antikörpern gegen den BZR an fluoreszierende Latexkügelchen absorbiert.

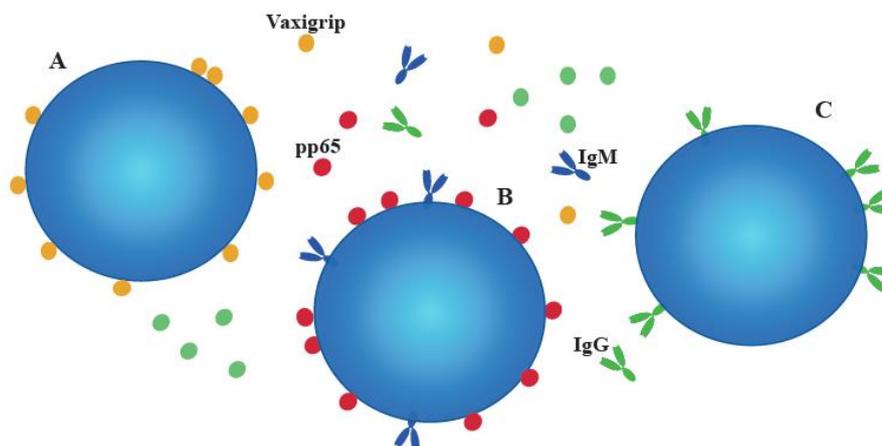


Abbildung 4: Fluoreszenz Beads mit Antigenen und Antikörpern.

A. Darstellung von Vaxigrip tragenden Fluoreszenz Beads. **B.** Darstellung von pp65 Protein und Antikörper gegen IgM tragenden Beads und **C.** Darstellung von Antikörper gegen IgG tragenden Beads.

Es wurden blau-fluoreszierende Beads verwendet. Dabei handelt es sich um Polystyrolpartikel („fluorescence particles in sky blue“, vom Hersteller Spherotech inc.). Die Fluoreszenzteilchen (Eigenfluoreszenz) der Beads sind wasserunlöslich und daher sehr stabil. Die 2µm große Latex-Beads sind in der Lage beliebige Proteine wie Antikörper und Antigene stabil an die Oberfläche zu binden. Die Beads sollten als Vehikel zur Einschleusung spezifischer Antigene in die B-

Zellen dienen. Die von B-Zellen phagozytierten Beads können durch ihre Eigenfluoreszenz im Durchflusszytometer leicht detektierbar sind. Um ihre Aufnahme durch B-Zellen zu erleichtern, wurden die Beads teilweise zusätzlich zu den Antigenen auch mit Antikörpern gegen den BZR beschichtet (Abb. 4). Nach ihrer Aufnahme sollten die Antigene in der Zelle prozessiert und auf der Zelloberfläche durch MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Die Kopplung der Beads mit Antikörpern gegen unterschiedliche Isotypen des BZR sowie Antigenen soll eine gezielte Beladung verschiedener Populationen von B-Lymphozyten mit definierten Antigenen ermöglichen.

1.7. Detektion und Charakterisierung von T-Lymphozyten

Zur Stimulation der T-Lymphozyten wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Peptide und Proteine sowie ein kommerzielles Reagenz (CytoStim von Miltenyi) eingesetzt. Letzteres stellt ein Antikörper-basiertes Reagenz dar, welches den T-Zell-Rezeptor mit dem MHC-Molekül der APZ unabhängig vom präsentierten Antigen verbindet und dadurch eine polyklonale Stimulation bewirkt. Die Anwesenheit von APZ ist somit essentiell für die Stimulation durch Cytostim. Neben der polyklonalen Stimulation durch Cytostim kann man die Zellen auch mit Peptiden oder intakten Proteinen Antigen-spezifisch stimulieren. Als Modellantigene für eine Antigen-spezifische Stimulation wurden zwei Impfstoffe (Vaxigrip und Repevax) sowie das pp65 Protein aus dem CMV-Virus eingesetzt. Bei Repevax handelt es sich um einen Kombinationsimpfstoff gegen Diphtherie, Pertussis, Poliomyelitis und Tetanus [53]. Vaxigrip ist eine Grippeimpfstoff und schützt vor der echten Grippe (Influenza).

Als Nachweismethode für die T-Zell-Aktivierung kann die Hochregulation der Marker CD154 (CD40L) und CD137 (4-1BB) [41, 42] oder die Zellproliferation in Kombination mit dem Aktivierungsmarker CD25 verwendet werden [46]. CD154 wird auf aktivierten $CD4^+$ transient hochreguliert und erscheint auf allen konventionellen $CD4^+$ T-Zellen. CD137 markiert auf $CD4^+$ T-Zellen aktivierte regulatorische T-Zellen, auf $CD8^+$ Zellen wird CD137 von etwa zweidrittel der Zellen hochreguliert, auch wenn noch keine Zuordnung zu einer bestimmten Effektorpopulation bekannt ist. [41, 42, 44, 45]

Der Nachweis von CD154 auf der T-Zell-Zelloberfläche nach Aktivierung ist nicht einfach, da CD154 nach Bindung an seinen Liganden CD40 entweder von der Zelle abgespalten oder wieder internalisiert wird. Dieser Prozess findet nicht statt, wenn die Bindung von CD154 an CD40 während der Stimulation blockiert wird, indem während der Stimulation anti-CD40-Antikörper (AK) dazugegeben werden [43]

1.8. Zielsetzung

Die Produktion von Antikörpern und die Entwicklung T-Zell-spezifischer Immunantworten sind die Grundpfeiler der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort gegen Krankheitserreger und Tumorzellen. Als Antikörper-produzierende und Antigen-präsentierende Zellen haben B-Lymphozyten eine zentrale Stellung in diesem Prozess. Die Rolle von B-Zellen in der Regulation von erwünschten und unerwünschten Immunantworten ist in den letzten Jahren unter anderem dadurch deutlich geworden, dass die therapeutische Depletion von B-Zellen durch monoklonale Antikörper wie Rituximab mehr Eingang in die Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis findet.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Optimierung von Verfahren, mit denen die Fähigkeit von B-Zellen, Antigen zu präsentieren, *in vitro* gemessen und für diagnostische und therapeutische Zwecke nutzbar gemacht werden kann.

Einige Stichpunkte zum diagnostischen Bereich:

- Viele primäre Immundefekte sind durch mangelnde Antikörperproduktion gekennzeichnet und dadurch auf Funktionsdefekte von B-Zellen zurück zu führen. Es gibt jedoch einen Mangel an Testverfahren, um die B-Zell-Funktion zu bestimmen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, ein diagnostisches Verfahren zu entwickeln, mit dem die antigen-präsentierende Funktion von B-Zellen gemessen werden kann.
- Ein weiteres diagnostisches Anwendungsgebiet dieser Arbeit liegt darin, B-Zellen als APZ für die Messung spezifischer T-Zell-Antworten zu verwenden. So stellt im Bereich der Transplantationsmedizin die Reaktivierung von CMV-Infektionen durch im Rahmen der notwendigen Immunsuppression ein großes Problem dar. Ein Routineverfahren, um die T-Zell-Antwort gegen dieses Virus zu messen könnte eine Hilfe bei der Entscheidung sein, wie lange eine anti-Virus-Prophylaxe für einen bestimmten Patienten notwendig ist.

Als Fernperspektive ergeben sich auch therapeutische Anwendungsmöglichkeiten. So wird z.B. die Immunantwort gegen Tumore dadurch aktiviert, dass APZ aus dem Patienten isoliert und mit Tumorantigenen beladen werden, ehe sie dem Patienten zurück transfundiert werden. Hierzu werden gebräuchlicher Weise dendritische Zellen (DZ) als APZ verwendet. Im Vergleich zu DZs zeichnen sich B-Zellen durch ihre leichte Zugänglichkeit und ihre leichte Kultivierung als Suspensionszellen aus.

2. Materialien

2.1. Geräte

Gerätebezeichnung	Seriennummer/ Typ	Hersteller
Sicherheitswerkbank Klasse 2	40864704/ KS 12	Hera safe
Bestrahlungsanlage	20704	Wällischmiller
Lichtmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	EVOS	Advanced Mircroscopy Group
Wasserbad	Type 1007	Gesellschaft für Laortechnik
CO ₂ Brutschrank	MCO-20AIC	Sanyo
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Rotana 460 R	Hettich Zentrifugen
Vortexer		Heidolph
Durchflusszytometer	Canto II	BD Biosciences
Rollmixer	Rollmixer SRT6	Stuart

2.2. Pipetten

Gerätebezeichnung	Seriennummer	Volumen in µl	Hersteller
Kolbenhubpipette	1257673	0,1- 2,5	Eppendorf
Kolbenhubpipette	1592568	0,5-10	Eppendorf
Kolbenhubpipette	1604228	2-20	Eppendorf
Kolbenhubpipette	1606878	10-100	Eppendorf
Kolbenhubpipette	1743648	20-200	Eppendorf
Kolbenhubpipette	4903412	10-100	Eppendorf
Motorpipette	1023544		Accu-jet Pro

2.3. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
96-Well-Platte	163320	Thermo Scientific
Facs-Tubes	352054	Falcon
Reaktionsgefäß 50 ml	227261	Cellstar Tubes
Reaktionsgefäß 15 ml	188271	Cellstar Tubes
24-Well-Platt (Mikrotiter-Platten)	142475	Thermo Scientific
Pipettenspitzen 10	0030077512	Eppendorf
Pipettenspitzen 200	0030077563	Eppendorf
Pipettenspitzen 1000	0030077571	Eppendorf
Serologische Pipetten 2 ml	86.1252.001	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml	86.1253.001	Sarstedt
Serologische Pipetten 10 ml	86.1254.001	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	72.706	Sarstedt
Kryoröhrchen 1,8 ml	368632	Thermo Scientific
Einmal Handschuhe	D1101-24	Dermagrip
Kulturflaschen T25	156367	Thermo Scientific
Kulturflaschen T75	156499	Thermo Scientific

2.4. Zellen, Zelllinien

Bezeichnungen	Informationen	Risikogruppe
PBMC	Blutspender, CMV positiv	1
HEK-CD154	Adhärente Zellen	1
Vollblut	Blutspende	1

2.5. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Brefeldin A Solution	420601	BioLegend
Monensin Solution	420701	BioLegend
Bovine Serum Albumin	A7906-100G	Sigma-Aldrich
DPBS (1X) – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-)CaCl ₂ (-)MgCl ₂	14190-094	Gibco by life technologies
Paraformaldehyd	P6148-500G	Sigma-Aldrich
PluriBeads CD19 S-pluriBead®	19-01900-10	PluriSelect
PluriBeads CD2 S-pluriBead®	19-00200-20	PluriSelect
PluriBeads CD14 S-pluriBead®	19-01400-10	PluriSelect
Fetal Bovine Serum (FCS)	10270-106	Gibco (Thermo Fisher)
Glutamin	25030-024	Gibco (Thermo Fisher)
Hepes Buffer Solution (1M)	15630-056	Gibco (Thermo Fisher)
Natrium Pyruvat	11360-039	Gibco (Thermo Fisher)
MEM non-essential amino acids (nicht essentielle Aminosäuren)	11140-035	Gibco (Thermo Fisher)
0,5% Trypsin-EDTA (10X)	15400-054	Gibco (Thermo Fisher)
DMSO	D2660-100ML	Sigma Life Science
EDTA	324503	Calbiochem
CytoStim™ human	130-092-173	Miltenyi Biotec
Rekombinantes humanes IL-2	02238131	Norvatis pharma
Rekombinantes humanes IL-4	766202	BioLegend
Rekombinantes humanes CD40L	P29965	Thermo Fisher
Fluorescent Beads sky blue	FP-2070-2	Spherotech Inc.
Bovine Serum Albumin (BSA)	A7906-100G	Sigma-Aldrich
Tween-20	119599	USB Corporation
DMEM (1X)	41965-039	Gibco (Thermo Fisher)
RPMI Medium 1640	21875-034	Gibco (Thermo Fisher)
Trypan blue	L 6323	Biochrom
Ficoll-Paque	17-1440-03	GE-Healthcare
Humanes AB-Serum	092930949	MP Biomedicals

2.6. Medien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI-Komplett	500 ml RPMI-1640 10%FCS 1% (v/v) L-glutamine (200 mM) 1% (v/v) sodium pyruvate (100 mM) 1% (v/v) HEPES (1 M) 1% (v/v) MEM non-essential amino acids
DMEM-Komplett	500 ml DMEM (1x) 10% (v/v) FCS 1% (v/v) L-glutamine (200 mM) 1% (v/v) HEPES (1 M) 1% (v/v) MEM non-essential amino acids
B-Zell-Medium	500 ml RPMI-1640 10%FCS 1% (v/v) L-glutamine (200 mM) 1% (v/v) sodium pyruvate (100 mM) 1% (v/v) HEPES (1 M)
Humanes Medium	500 ml RPMI-1640 5% (v/v) humanes AB-Serum 1% (v/v) L-glutamine (200 mM) 1% (v/v) sodium pyruvate (100 mM) 1% (v/v) HEPES (1 M) 1% (v/v) MEM non-essential amino acids
Einfriermedium	40% (v/v) RPMI 50% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO
Ficoll-Medium	90% (v/v) RPMI 10% (v/v) FCS

Materialien

Wasch-Puffer (PBMCs)	500 ml DPBS 2% (v/v) FCS
Wasch-Puffer	500 ml PBS 0,1% (v/v) BSA
Fixierpuffer	500 ml PBS 1% (v/v) PFA
Selektionspuffer	50 ml PBS 2% (v/v) FCS 1 mM EDTA

2.7. Antigene

Antigenbezeichnung	Bestell-/Referenznummer	Hersteller
Cytostim human	130-092-172	Miltenyi Biotec
CMV pp65- Recombinant Protein human Cytomegalovirus	130-091-824	Miltenyi Biotec
PepTivator CEF MHC Class 1 Plus- premium grade	130-098-426	Miltenyi Biotec
Vaxigrip Tetra	PNZ-12590047	Sanofi Pasteur

2.8. Antikörper und Fluoreszenzen

Spezifität	Fluoreszenz	Klone	Hersteller
CD40	unkonjugiert	HB14	BioLegend
CD28	unkonjugiert	CD28.2	BioLegend
CD27	BV421	M-T271	BD Biosciences
HLA-DR	BV421	L243	BioLegend
CD8	BV421	RPA-T8	BD Biosciences
CD4	BV421	RPA-T4	BioLegend
CD73	BV421	AD2	BD Biosciences
IgD	BV510	IA6-2	BioLegend
CD27	BV510	O323	BioLegend
CD8	BV510	SK1	BioLegend
CD38	FITC	HIT2	BioLegend
CD25	FITC	M-A251	BD Biosciences

Materialien

CD73	PE	AD2	BioLegend
CD21	PE	Bu32	BioLegend
IgM	PE	MHM-88	BioLegend
Bcl-2	PE	100	BioLegend
CD154	PE	REA238	Miltenyi Biotec
IgD	PerCP-Cy5.5	IA6-2	BioLegend
IgM	PerCP-Cy5.5	MHM-88	BioLegend
CD137	PerCP-Cy5.5	4B4-1	BioLegend
CD3	PerCP-Cy5.5	SK7	BioLegend
CD4	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	BioLegend
CD19	PE-Cy7	SJ25C1	BioLegend
CD3	PE-Cy7	SK7	BioLegend
CD21	PE-Cy7	Bu32	BioLegend
CD4	PE-Cy7	SK3	BioLegend
CD137	PE-Cy7	4B4-1	BioLegend
CD14	APC	HCD14	BioLegend
CD4	APC	SK3	BioLegend
CD19	APC	HIB19	BD Biosciences
CD20	APC-Cy7	2H7	BioLegend
CD19	APC-Cy7	HIB19	BioLegend
EFluor			Thermo Fisher
PacO	Pacific Orange	P30253	invitrogen

2.9. Kit-Systeme

KitName	Bestellnummer	Hersteller
EasySep PE Positive Selection Kit		EasySep
S-pluriBead Maxi Reagent Kit	70-50010-12	pluriSelect
EasySep naive Bcell Isolation Kit	17254	Stemcell Technologies

2.10. Software

FlowJo Version 10.

Adobe Illustrator CC.

3. Methoden

3.1. Methodenaufbau

Für diese Arbeit wurden menschliche Blutproben verwendet. Alle Versuche wurden *in vitro* direkt nach der Blutentnahme oder innerhalb einiger Monate (PBMC) durchgeführt. Die PBMC-Proben stammen alle von einem gesunden Blutspender, welcher das CMV (Cytomegalievirus) trägt. Die Vollblut-Proben stammen von Probanden mit unbekanntem Immunstatus. Hierbei ist lediglich bekannt, dass diese für die Blutspende freigegeben sind

3.2. Methoden Zelltechnik

3.2.1. Probennahme

Blutproben in Form von Leukozytenkonzentraten („buffy coats“) wurden von der Blutbank am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bezogen. Dabei handelt es sich um Beiprodukte der Blutspende nach Isolierung der für Transfusionen benötigten Erythrozyten. Hierbei wurden Proben von CMV-positiven und CMV-negativen Blutspendern verwendet.

3.2.2. Isolierung von mononukleären Zellen aus Leukozytenkonzentraten

Die Aufreinigung von mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus Leukozytenkonzentraten wird mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dazu werden SepMate 50 ml Röhrchen verwendet, welche vorher mit 15 ml Dichtegradienten-Medium (Ficoll) befüllt wurden. Die Blutprobe wird 1:2 mit PBS+2% FCS verdünnt und ebenfalls in das SepMate Röhrchen gegeben. Die Isolation mononuklearer Zellen erfolgt mittels Zentrifugation bei 1200 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Erythrozyten befinden sich gemeinsam mit dem Dichtegradienten-Medium in der unteren Schicht. Die mononukleären Zellen werden durch Abgießen von der oberen Schicht isoliert. Die gewonnenen Zellen werden mehrmals mit Wasch-Puffer (PBS) gewaschen und durch ein Sieb gegeben. Nach dem letzten Waschschrift wird das Zellpellet in 1 ml Wasser gelöst und nach 30 Sekunden wird 1 ml Ficoll-Medium hinzugegeben. Die Zellzahl wird mit einer Neubauerkammer bestimmt.

3.2.3. Kryokonservierung

Zum Einfrieren der gewonnenen mononukleären Zellen werden Kryoröhrchen benötigt. Alle Arbeitsschritte erfolgen nun auf Kühl Akkus. In die Kryoröhrchen werden 500 µl Zellsuspension vorgelegt. Anschließend wird alle 30 Sekunden 50 µl Einfriermedium zugegeben bis insgesamt in jedem Kryoröhrchen 1 ml enthalten ist. Die Zellen werden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.4. Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen wird die Neubauer Zählkammer verwendet. In einem Eppendorf Rörchen werden 10 µl Zellsuspension + 90 µl Trypanblau gemischt. Anschließend wird 10 µl des Ansatzes zwischen Neubauer-Zählkammer und Deckglas pipettiert. Die Zellzahl wird unter dem Lichtmikroskop in einem der vier großen Außenquadrate (16 Einzelquadrate) der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Berechnung der Zellzahl:

Gezählte Zellen $\times 10^4$ (Kammerfaktor) $\times 10$ (Verdünnung der Zellsuspension) \times
Verdünnungsfaktor = Zellen/ml

3.2.5. Probenvorbereitung PBMCs

Ein Aliquot PBMCs wird aus dem -80°C Gefrierschrankschrank entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend werden die PBMCs in RPMI-Komplett-Medium oder RPMI-Human-Medium aufgenommen und bei 390 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in dem verbliebenden RPMI-Komplett-Medium resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl mittels Neubauerkammer bestimmt. Die Proben werden auf FACS-Rörchen oder Wells aufgeteilt oder mittels Pluri-Select (siehe 3.14.) aufgereinigt.

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank Klasse 2 vorgenommen.

3.2.6. Zellaufreinigung naiver B-Zellen

Die PBMS werden in 1 ml RPMI-Komplett-Medium aufgenommen und die Zellenzahl wird bestimmt. Anschließend wird mit RPMI-Komplett-Medium die Zellzahl auf $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt, wobei ein Volumen von 2 ml nicht überschritten wird. Die Probe wird in ein FACS-Rörchen überführt. Der Cocktail Enhancer wurde mit 50 µl/ml Probe zugegeben und die Probe wurde für 10 Sekunden gevortext.

Zur Aufreinigung naiver B-Zellen aus PBMCs wird das „EasySep naive B cell enrichment kit“ der Firma Stemcell Technologies verwendet. 10 ml RPMI-Komplett-Medium werden in ein 15 ml Falcon-Rörchen gegeben und im Wasserbad auf Raumtemperatur erwärmt. PBMCs werden aufgetaut (3.2.5), gewaschen und in 1 ml suspendiert. Die Zellen werden gezählt und mit RPMI-Komplett-Medium auf $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml verdünnt, wobei ein Volumen von 2 ml nicht überschritten wird. Die Probe wird in ein FACS-Rörchen überführt. Pro 1 ml Probe wird 50 µl Cocktail Enhancer dazugegeben und die Probe wird für 10 Sekunden gevortext.

Anschließend wird der Isolation Cocktail mit 50 µl/ml Probe hinzugegeben. Die Probe wird gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die RapidSpheres™ werden 30 Sekunden gevortext und mit 50 µl/ml Probe hinzugegeben. Die Probe wird direkt mit RPMI-Komplett-Medium auf 2,5 ml aufgefüllt und mit einer Pipette vorsichtig auf und ab pipettiert. Das FACS-Röhrchen wird in einen Magneten gestellt. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird der Überstand, während sich das Röhrchen im Magneten befindet, in einer gleichmäßigen Bewegung in ein neues Röhrchen verworfen. Das alte Röhrchen wird aus dem Magneten entfernt und durch das neue Röhrchen, welche den Abwurf enthält, ersetzt. Es folgt eine Inkubation von einer Minute. In einer gleichmäßigen Bewegung wird das Medium aus dem Röhrchen, während das Röhrchen sich noch im Magneten befindet, in ein neues Röhrchen überführt.

Die Zellsuspension wird bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 390 x g abzentrifugiert und anschließend dekantiert. Das Pellet wird in Lösung gebracht und mit 100 µl Selektionspuffer aufgefüllt. Die Probe wird mit PE-IgA und PE-IgG eingefärbt (3.5.1.). In jedes Röhrchen werden 10 µl PE-Selection Cocktail gegeben. Nach Durchmischen der Proben werden diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach den 15 Minuten werden 5 µl Magnetpartikel hinzugefügt. Die Probe wird durchmischt und für weitere 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. 2 ml Selektionspuffer wird zu den Proben gegeben und durchmischt. Die FACS-Probenröhrchen werden in den EasySep Magneten gestellt. Nach 5 Minuten Inkubation im Magneten wird der Überstand in ein neues FACS-Röhrchen dekantiert, während sich das Probenröhrchen im Magneten befindet (Kontrolle der Selektion im Überstand). Es wird erneut 2 ml Selektionspuffer auf die Probe gegeben. Dieser Schritt wird 3x wiederholt. Anschließend werden die Proben mit 1 ml Selektionspuffer aufgefüllt und 10 µl werden zum Zählen entnommen. Die Proben werden nun für 5 Minuten bei 390 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und dekantiert. Das Pellet wird resuspendiert und mit 500 µl 0,8% PFA aufgefüllt.

3.2.7. Zellaufreinigung mit PluriSelect

Die Zellaufreinigung von antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen aus PBMC's erfolgt mit Hilfe von PluriBead Kits der Firma PluriSelect. Die PBMCs werden aufgetaut und gezählt. Anschließend wird die Probe in Buffer B aus dem PluriSelect Kit und mit Wash-Buffer gewaschen. Die Probe wird auf maximal $5 \cdot 10^6$ Zellen /ml Puffer verdünnt. Anschließend werden die Beads dazugegeben. Dabei ist zu beachten, dass maximal 40 µl der S-pluriBead® pro 1 ml Suspension und 100 µl der M-pluriBead® pro 1 ml Suspension hinzugegeben werden.

Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf einem Rollmixer. Nun wird ein S- (oder M-) pluriStrainer® auf ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen gesteckt. Der S-pluriStrainer® wird mit 1 ml Wash-Buffer, welcher zuvor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, equilibriert. Die Beads-Zell-Suspension kann nun auf dem S-pluriStrainer® gegeben werden. In 2 ml Schritten wird der S-pluriStrainer® mit 1x Wash-Buffer gewaschen. Dieser Schritt wird mindestens 10-mal wiederholt, um alle ungebundenen Zellen zu entfernen. Auf ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen wird ein Connector-Ring befestigt. Wenn das Ventil geschlossen ist, gelangt keine Flüssigkeit durch das Sieb in das Röhrchen. Der S-pluriStrainer® wird auf den Connector-Ring befestigt. Das Ventil vom Connector-Ring wird geschlossen. 1 ml Wash-Buffer wird in den S-pluriStrainer® gegeben und 1 ml aktivierter Buffer D (200 µl Buffer C in Buffer D) wird hinzugegeben. Es erfolgt eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Alle 2 Minuten wird die gesamte Suspension in dem S-pluriStrainer® vorsichtig geschwenkt. Nach der Inkubation wird erneut 1 ml Wash-Buffer hinzugegeben. Nun wird mit einer 1 ml Pipette mindestens 10-mal auf und ab pipettiert. Blasenbildung und Kontakt zum Sieb sollte vermieden werden. Das Ventil wird geöffnet und das Sieb wird mindestens 10-mal mit Wash-Buffer oder RPMI-Komplett-Medium gewaschen. Zur Kontrolle werden die Beads, welche sich im Sieb befinden, unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Zellzahl. Die Zellsuspension wird bei 390 x g für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und in RPMI-Komplett-Medium aufgenommen.

3.3. Methoden Zellkulturtechnik

Die Zellkulturen werden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank Stufe 2 durchgeführt. Die Herkunft der verwendeten Zelllinien ist geprüft. Die verwendeten Utensilien werden mit 70 % Ethanol desinfiziert.

3.3.1. Zellkultur auftauen

Vor dem Auftauen von Zellen wird 5 ml Zellkulturmedium in eine T25 Kulturflasche gefüllt und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank vorgewärmt. Das Kryoröhrchen mit den gewünschten Zellen wird aus dem Stickstofftank genommen und für den Transport auf Trockeneis gelagert. Die Zellen werden im Wasserbad bei 37 °C für 90 s aufgetaut und im Anschluss unter der Sicherheitswerkbank in die vorgewärmte Zellkulturflasche überführt. Das Wachstum der Zellen wird alle zwei Tage geprüft und dokumentiert.

3.3.2. Zellkultivierung- und Erhaltung

Die adhärenen HEK-CD154-Zellen werden in DMEM-Komplett-Medium in T25- und T75-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. kultiviert. Die Kulturflasche wird alle zwei bis drei Tage unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls geteilt und in neue Flaschen überführt.

Dazu wird das Medium mit einer serologischen Pipette verworfen. Vorsichtig wird auf die Zellkultur 4-5 ml PBS gegeben und in der Kulturflasche geschwenkt. Das PBS wird mit einer 10 ml serologischen Pipette aus der Kulturflasche entnommen. Nun wird 2 ml 1x Trypsin (in DPBS) hinzugeben und die Kultur wird unter dem Mikroskop beobachtet. Haben sich die HEK-CD154 Zellen von dem Flaschenboden gelöst wird der Verdau mit 8 ml Kulturmedium gestoppt. Die Suspension wird mit einer serologischen Pipette mehrmals auf und ab pipettiert und schließlich in ein Rotkappen-Röhrchen gegeben. Es erfolgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C bei 390 x g. Der Überstand wird vorsichtig abgossen und das Zellpellet wird im Restmedium resuspendiert. Nun wird das benötigte Volumen an Kulturmedium (DMEM-Komplett) hinzugegeben. Das Volumen wird gemäß der geplanten Verdünnung in die T75 Kulturflasche geben und das notwendige Volumen von Zellsuspension wird hinzugeben. Das Gesamtvolumen darf hierbei 10 ml nicht überschreiten. Die Zellkultur wird nach 24h unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

3.3.3. Zellbestrahlung

Die adhärenen HEK-CD154-Zellen werden wie im vorigen Abschnitt beschrieben geerntet. Die Zellen werden als Zellpellet im geschlossenen Röhrchen bei 10-90 Gy γ - Strahlung bestrahlt und anschließend in Kultur gegeben. Die gewünschte Bestrahlungsstärke wird nach Formel (1) bestimmt.

$$t_B = \frac{D_B}{G_{K*}} \quad [1]$$

t_B : Bestrahlungszeit [min]

D_B : Gewünschte Bestrahlungsdosis [Gy]

D_{Kz} : Gerätekonzentration für Zellen und Gewebe [2,6 Gy/min]

3.4. Methoden der Zellstimulation

Die verwendeten Zellen werden in einem 5% CO₂-Brutschrank bei 37 °C für mindestens 16 Stunden inkubiert. Hierbei werden unterschiedliche Stimulationsmedien, sowie Antigene für die Stimulation eingesetzt. Teilweise werden Zellen und Interleukine (IL-2 und IL-4) verwendet, um die Zellstimulation sowie Proliferation anzuregen.

3.4.1. Beladung von Spherotech-Beads mit Antikörpern und Antigenen

Es werden blau fluoreszierende Mikro-Beads (Fluorescent Particles in Sky blue) der Firma Spherotech verwendet. Die Beads-Lösung wird 10 Sekunden gevortext. Je 5 µl Beads werden in Mikroreaktionsgefäße gefüllt und mit 80 µl PBS versetzt. Dieses Gemisch wird bei 10000 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer 100 µl Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Dabei sollte das Pellet nicht berührt werden. Anschließend werden die Reagenzien (Antikörper und Antigene) in die Suspension gegeben. Daraufhin erfolgt die Zugabe von 30 µl PBS und die Beads-Suspension wird circa 30 Sekunden gevortext. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht (etwa 16-18 Stunden) im Dunkeln auf einem Rollmixer. Am Folgetag werden die Beads mit 50 µl PBS versetzt und zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer 100 µl Pipette abgenommen. Die Lösung wird zum Gebrauch 1:5 verdünnt.

3.4.2. *In vitro* Reifung von B-Lymphozyten mit rhCD154

Die B-Zellen werden aus den PBMCs isoliert oder die PBMCs werden direkt verwendet. Als Gesamtvolumen werden 100 µl verwendet. Die aufgereinigten B-Zellen oder PBMC's werden in FACS-Tubes überführt. Anschließend werden zur Stimulation 2,5 nM rhCD154 und 50 U/ml IL-4 oder 2,5 U/ml IL-2 gemeinsam in RPMI-Komplett gegeben. Die Kultivierung der Probe erfolgt bei 37°C im 5% CO₂ Inkubator. Die Proben werden an Tag 4 bei Raumtemperatur und 390 xg für 5 Minuten runterzentrifugiert. Anschließend wird mittels einer Pipette das Halbe Medium (50 µl) entfernt. Das Medium wird auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und erneut mit 2,5 nM rhCD154 und 50 U/ml IL-4 oder 2,5 U/ml IL-2 versetzt. An Tag 0, 1, 7 und 14 werden die Proben gemessen

3.4.3. *In vitro* Reifung von B-Lymphozyten mit HEK-CD154

HEK-CD154-Zellen werden wie beschrieben geerntet und auf 24-Well-Platten verteilt. Dabei liegt das Gesamtvolumen pro Well bei 1,5 ml. B-Zellen werden wie beschrieben aus PBMC's aufgereinigt, gezählt und in die Wells gegeben. An Tag 0, 1, 4, 6 und 8 werden die Proben gemessen.

3.4.4. Antigen-spezifische T-Lymphozyten Stimulation

PBMCs werden aufgetaut, gewaschen, und entsprechend der Anzahl der Ansätze in FACS-Röhrchen (100 µl) aufgeteilt und mit verschiedenen Stimulantien (siehe Materialien, Antigene) behandelt. Die Inkubation der Proben erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ zwischen 7 bis 24 Stunden. Nach der Inkubation werden die Zellen auf Eis gestellt.

3.5. Methoden zur Zell-Charakterisierung

3.5.1. Zellmarkierung Oberflächenfärbung

Es erfolgt eine direkte Markierung der Zellen mit Antikörpern. Vor der Färbung mit den fluoreszenztragenden Antikörpern wird die Probe mit 2 ml Wasch-Puffer versetzt und bei 390 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird mit Hilfe von einem Vortexer in Lösung gebracht. Nun werden die Antikörper zugegeben und für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird 2 ml Wasch-Puffer zu den Proben gegeben, diese werden bei 390 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand wird verworfen. Die Probe wird mit 1% PFA fixiert.

3.5.2. Zellmarkierung intrazelluläre Färbung

Zur Anfärbung intrazellulärer Proteine müssen die Zellen permeabilisiert und fixiert werden. Die intrazelluläre Färbung teilt sich in drei Schritte. Zunächst werden die Proben mit 2 ml Wasch-Puffer versetzt, bei 390 x g bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Dann werden die Proben mit 500 µl FACS-Perm-Lösung permeabilisiert (1:10 verdünnt mit Aqua dest.). Die Zellen werden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 2 ml Wasch-Puffer zu den Proben gegeben und für 5 Minuten bei 4°C und 390 x g zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen mit den Antikörpern für 30 Minuten auf Eis inkubiert, gewaschen, und mit 200 µl 1% PFA fixiert.

3.5.3. *In vitro* Charakterisierung der B-Zell-Reifung

Das Oberflächenmarker-Profil von B-Zellen wird mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper und Durchflusszytometrie am Tag 0, 1, 4 und erfasst. Die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung können im peripheren Blut anhand von Oberflächenmolekülen (wie z.B. Immunglobuline) charakterisiert werden. Für die Markierung der Oberflächenmoleküle werden fluorochromgekoppelte Antikörper (z.B. CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgM, IgG, IgA und HLA-DR) zu den *in vitro* kultivierten B-Zellen (nach Methode 3.4.2 und 3.4.3) gegeben (3.5.1).

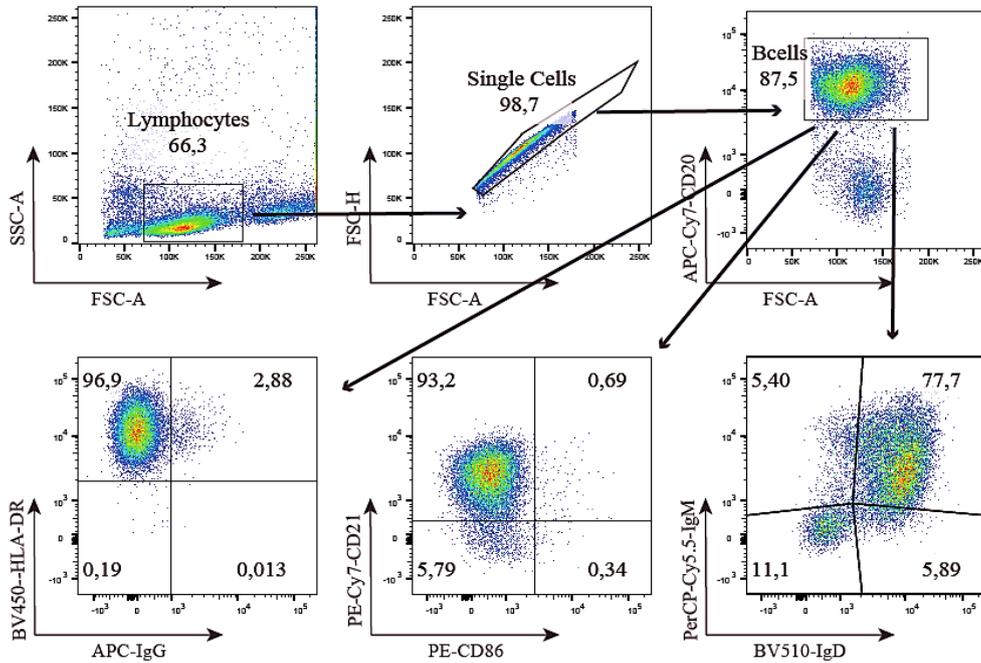


Abbildung 5: Auswertung der B-Zell-Reifung.

B-Zellen werden für 7 Tage kultiviert, gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der FlowJo 10 Software. Es werden Dot-Plot-Diagramme dargestellt. In den oberen drei Diagrammen werden die Lymphozyten, die Einzelzellen (Single Cells) und die B-Zellen dargestellt. Dafür werden SSC-A gegen FSC-A, FSC-H gegen FSC-A und CD20 gegen FSC-A aufgetragen. Die Populationen werden durch Gates gekennzeichnet. Der Klassenwechsel der B-Zellen wird mit Hilfe von Rastern (Quadranten) ermittelt. Es werden HLA-DR gegen IgG, CD21 gegen CD86 und IgM gegen IgD aufgetragen.

In der Abbildung 5 wird Charakterisierung und der Klassenwechsel von B-Zellen dargestellt. Die Auswertung erfolgt in sechs Dot-Plot-Diagrammen. Als erstes werden die Lymphozyten in einem Dot-Plot-Diagramm ermittelt. Hierbei werden SSC-A gegen FSC-A aufgetragen. In dem nächsten Dot-Plot-Diagramm werden die Einzelzellen (Single Cells) der Lymphozyten eingerahmt, wobei FSC-H gegen FSC-A aufgetragen wird. Anschließend werden die B-Zellen durch das Auftragen von CD20 gegen FSC-A ermittelt. Die B-Zellen sind CD20 positiv und werden eingerahmt. Die B-Zellen werden nun in drei Diagrammen dargestellt. Diese Darstellung ermöglicht die Einteilung der B-Zell-Populationen und dessen Charakterisierung. In diesem Versuch werden HLA-DR gegen IgG, CD21 gegen CD86 und IgM gegen IgD verwendet. Das Achsenkreuz erlaubt die Ermittlung der Expression der Aktivierungsmarker der jeweiligen Population.

In anderen Versuchen wird statt HLA-DR und CD86 auch CD38 und CD27 verwendet. Das Gating der Population erfolgt auf die gleiche Weise wie in Abbildung 5.

3.5.4. *In vitro* Charakterisierung von Kurzzeit T-Lymphozyten Stimulation

B-Zellen und T-Zellen werden aus PBMC's isoliert (siehe Methode 3.2.7) oder PBMCs werden direkt verwendet. Die aufgereinigten B-Zellen werden mit löslichen Antigenen und Beads (siehe Methode 3.4.1) inkubiert. Außerdem werden pro Röhrchen 2 µl anti-CD40 Antikörper hinzugegeben. Die B-Zellen inkubieren für 16-18 h bei 37°C im 5% CO₂-Inkubator. Nach der *in vitro* Inkubation werden die B-Zellen mit den T-Zellen vermischt und für weitere 7 h bei 37°C im 5% CO₂-Inkubator inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die T-Zell-Aktivierung mittels Markierung (siehe 3.5.1.) von CD154 und CD137 auf der T-Zell-Oberfläche gemessen.

Bei der Auswertung mit dem Programm FlowJo kann man vor allem zwei unterschiedliche Darstellungen wählen. Dabei handelt es sich um das Histogramm-Plot und um die Dot-Plot Darstellung. Das Histogramm stellt hierbei eine Häufigkeitsverteilung dar. Hierbei wird die Stärke des Signals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Bei dem Dot-Plot Diagramm werden einzelne Zellen in einem Koordinatensystem Bezug auf zwei unterschiedliche Parameter dargestellt. Diese können bei einem Histogramm oftmals überlappen. In einem Dot-Plot Diagramm können die einzelnen Populationen besser unterschieden werden. Dabei werden die Signalintensitäten in zwei Fluoreszenzkanälen als Achsen aufgetragen und die Lage einzelner Zellen in Bezug auf diese Kanäle in einem zweidimensionalen Plot dargestellt.

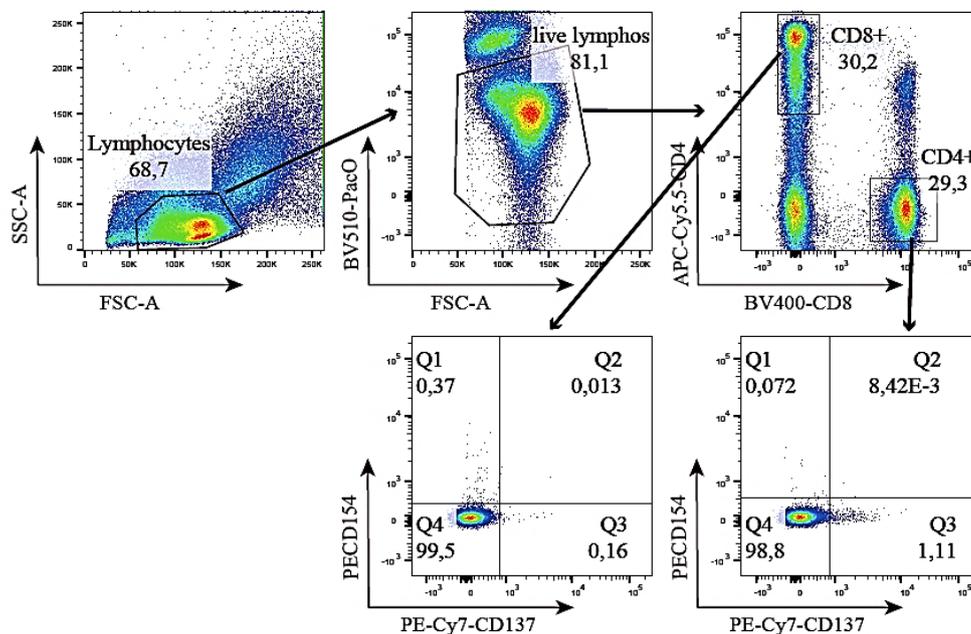


Abbildung 6: Auswertung der Kurzzeitstimulation von T-Lymphozyten.

T-Zellen wurden mit aufgereinigten B-Zellen, die mit Antigenen vorinkubiert wurden, für 7 Stunden gemeinsam inkubiert, gefärbt, und im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgt mit FlowJo 10. Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme. In den oberen drei Diagrammen werden die Lymphozyten, die lebenden Zellen und die CD4 und CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Dafür werden SSC-A gegen FSC-A, Pacific Orange gegen FSC-A und CD4 gegen CD8 aufgetragen. Die Populationen werden durch Gates gekennzeichnet. Die Aktivierung der CD4 und CD8 positiven Populationen werden durch CD154 gegen CD137 ermittelt.

In der Abbildung 6 wird die Auswertung der T-Lymphozyten der Kurzzeitversuche gezeigt. Die Auswertung erfolgt in fünf Dot-Plot-Diagrammen. Als erstes werden die Lymphozyten in einem Dot-Plot-Diagramm ermittelt. Hierbei werden SSC-A gegen FSC-A aufgetragen. In dem nächsten Dot-Plot-Diagramm werden die lebenden Zellen (live Lymphos) bestimmt und durch einen Rahmen gekennzeichnet, wobei Pacific Orange (Totmarker) gegen FSC-A aufgetragen wird. Die lebenden Zellen werden in CD4 und CD8 positive Populationen aufgeteilt. Die nächsten beiden Dot-Plot-Diagramme zeigen jeweils CD4 oder CD8 positive T-Zellen. Es wird CD154 gegen CD137 aufgetragen. Das Achsenkreuz erlaubt die Ermittlung der Expression der Aktivierungsmarker der jeweiligen Population.

3.5.5. *In vitro* Charakterisierung von Langzeit T-Lymphozyten Stimulation

B-Zellen werden aus PBMC's isoliert (siehe Methode 3.2.7) und für 16-18 h bei 37°C im 5% CO₂-Inkubator mit löslichen Antigenen und Beads (siehe Methode 3.4.1) versetzt. Der Durchlauf der Aufreinigung, der die T-Zellen enthält, wird mit EFluor670 eingefärbt. Hierfür werden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen gezählt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Das EFluor670 wird mit PBS vorverdünnt und in einer Endkonzentration von 2 µM zu der Zellsuspension gegeben. Die Probe wird gevortext und 10 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei die Probe nach 5 Minuten erneut gevortext wird. Danach werden 5 ml RPMI-Komplett-Medium hinzugegeben und die Probe wird für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen 2-mal mit RPMI-Komplett-Medium gewaschen (zentrifugiert und dekantiert). Die Zellen werden erneut gezählt und mittels FACS wird die EFluor670-Fluoreszenz im APC-Kanal überprüft.

Nach der *in vitro* Inkubation werden die B-Zellen mit den T-Zellen vermischt und bei 37°C im 5% CO₂-Inkubator inkubiert. An Tag 0, 1, 4, 7 und 14 wird die Proliferation und die T-Zell Aktivierung mittels CD3, CD2, CD4, CD8, CD25 und EFluor670 auf der T-Zell-Oberfläche gemessen.

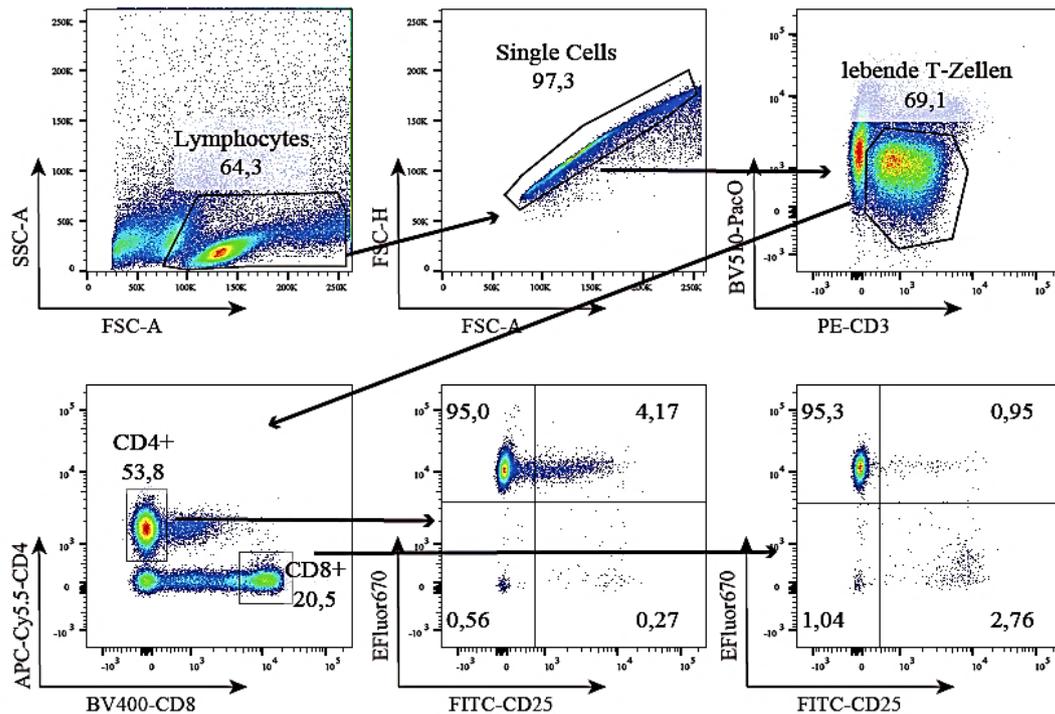


Abbildung 7: Auswertung der Langzeitstimulation von T-Lymphozyten.

Mit EFluor670 markierte T-Zellen wurden zusammen mit Antigen-beladenen B-Zellen für 7 Tage inkubiert, gefärbt, und im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgt mit FlowJo 10. Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme. In den oberen drei Diagrammen werden die Lymphozyten, die Einzelzellen und die lebenden T-Zellen ermittelt. Dafür werden SSC-A gegen FSC-A, FSC-H gegen FSC-A und Pacific Orange (als Totmarker) gegen CD3 (T-Zell-Marker) aufgetragen. Anschließend wurde CD4 gegen CD8 aufgetragen und die Populationen werden durch Gates gekennzeichnet. Die Proliferation und Aktivierung wird durch EFluor670 gegen CD25 ermittelt.

In der Abbildung 7 wird die Auswertung der T-Lymphozyten der Langzeitversuche gezeigt. Die Auswertung erfolgt in sechs Dot-Plot-Diagrammen. Als erstes werden die Lymphozyten in einem Dot-Plot-Diagramm ermittelt. Hierbei werden SSC-A gegen FSC-A aufgetragen. In dem nächsten Dot-Plot-Diagramm werden die Einzelzellen (Single Cells) der Lymphozyten eingerahmt, wobei FSC-H gegen FSC-A aufgetragen wird. Das Auftragen von Pacific Orange (Totmarker) gegen CD3 (T-Zell-Marker) ermöglicht das einrahmen der lebenden T-Zellen. Die lebenden T-Zellen werden in CD4 und CD8 positive Populationen aufgeteilt. Die nächsten beiden Dot-Plot-Diagramme zeigen jeweils CD4 oder CD8 positive T-Zellen. Es wird EFluor670 gegen CD25 aufgetragen. Das Achsenkreuz erlaubt die Ermittlung der Proliferation und Aktivierung der T-Zellen der jeweiligen Population.

3.6. Magnetische Zellsortierung aktivierter T-Lymphozyten

T-Zellen werden wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben in Gegenwart von anti-CD40-Antikörpern für 7-18 h aktiviert. Die Zellsuspension wird bei Raumtemperatur abzentrifugiert (5 Minuten bei 390 x g) und anschließend dekantiert. Das Pellet wird in Lösung gebracht und mit 100 µl Selektionspuffer aufgefüllt. Die Probe wird mit PE-CD154 eingefärbt (3.5.1.). Danach wird 10 µl PE-Selection Cocktail in jedes Röhrchen gegeben. Nach Durchmischen der Proben werden diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden 5 µl Magnetpartikel zugefügt. Die Probe wird durchmischt und für weitere 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wird 2 ml Selektionspuffer zu den Proben gegeben und durchmischt. Die FACS-Probenröhrchen werden in den EasySep Magneten gestellt. Nach 5 Minuten wird der Überstand in ein neues FACS-Röhrchen dekantiert, während sich das Probenröhrchen im Magneten befindet (Kontrolle der Selektion im Überstand). Es werden erneut 2 ml Selektionspuffer auf die Probe gegeben (dieser Schritt wird 3x wiederholt). Anschließend werden die Proben mit 1 ml Selektionspuffer aufgefüllt und 10 µl werden zum Zählen entnommen. Die Proben werden für 5 Minuten bei 390 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und abdekantiert. Das Pellet wird resuspendiert und mit 250 µl 0,8% PFA aufgefüllt.

3.7. Methoden zur Detektion und Auswertung

3.7.1. Durchflusszytometrie

Alle Messungen erfolgten an einem Durchflusszytometer (FACS Canto2 der Firma BD Biosciences). Das Gerät misst die Fluoreszenz von Partikeln in acht unterschiedlichen Fluoreszenz-Kanälen. Anhand dieser Messmethode kann man z.B. Antigen-Antikörper-Reaktionen mit Hilfe von Fluoreszenz detektieren. Es handelt sich um eine quantitative Nachweismethode, welche es erlaubt, sowohl Oberflächenproteine als auch intrazelluläre Proteine anzufärben und zu detektieren. Als Voraussetzung für diese Methode müssen Zellen vorhanden sein. Diese Methode erlaubt es alle gefärbten Zellen einzeln zu messen, wobei diese einen Laserstrahl passieren. Der Laser stellt das Herzstück des FACS-Gerätes dar. Durch den Laser werden die Elektronen um den Atomkern in ein höheres Energieniveau gebracht. Fallen die Elektronen in den Grundzustand zurück senden sie dabei Licht einer spezifischen Wellenlänge aus [47].

Parallel wird das Streu- und Fluoreszenzlicht detektiert. Mit Hilfe des Vorwärtstreulichtes (Forwardscatter FSC) kann man die relative Größe der Partikel und Zellen bestimmen. Zudem kann anhand des im 90° Winkel gemessenen Seitwärtstreulichtes (Sidescatter SSC) die Zellgranularität bestimmt werden. Dadurch können Zellgemische aufgrund der

morphologischen Eigenschaften von Zellen (Größe und Granularität) in einzelne Populationen aufgetrennt werden (Granulozyten verursachen mit ihrer rauen Oberfläche und gelappten Kernen mehr Seitwärts-Lichtstreuung als Lymphozyten). Der FACS Canto2 verfügt über 3 Laser und ist in der Lage zwischen 8 verschiedenen Farben (zu unterscheiden. In dieser Arbeit werden die Einzelfarbstoffe Brilliant Violet 421 (BV421), BV510, Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und und Allophycocyanin (APC), sowie die Konjugatfarbstoffe PE-Cy7, APC-Cy7, und Peridinin Chlorophyll Protein-Cy5.5 (PerCP-Cy5.5), verwendet.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit werden in vier Kategorien unterteilt. Im ersten Abschnitt werden Versuche zur *in vitro* Reifung von B-Zellen dargestellt. Dabei wurden Feeder-Zellen oder rekombinantes CD154 verwendet, um die B-Zellen zu stimulieren. Im zweiten Ergebnisteil wurde die Aktivierung von T-Lymphozyten durch spezifische Antigene wie pp65 und dem Grippeimpfstoff Vaxigrip anhand der Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137 auf der Zelloberfläche oder der Proliferation bestimmt. Im dritten Versuchsabschnitt wurden Möglichkeiten getestet, Antigene durch Kopplung an Beads (Spherotech) gezielt in B-Zellen einzuschleusen. Durch die Kopplung der Beads mit unterschiedlichen Antikörpern, welche gegen den BZR gerichtet sind, sollte die gezielte Internalisierung der Beads gewährleistet werden. Im letzten Abschnitt werden Versuche dargestellt welche es ermöglichen, aktivierte T-Zellen mit Hilfe der Aktivierungsmarker CD154 und CD137 aus Vollblut aufzureinigen und zu analysieren.

4.1. *In vitro* B-Lymphozyten-Reifung

Ziel der Versuche in diesem Abschnitt war es, Methoden zur *in vitro* Kultivierung von B-Zellen über mehrere Tage zu etablieren, dabei ihre Reifung zu verfolgen und zu dokumentieren (3.3.1. und 3.3.2.). Dafür wurde der Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen untersucht. Unter anderem wurden transfizierte HEK-CD154-Zellen (Feeder-Zellen), sowie rhCD154 und IL-4 zur Kultivierung verglichen. Die Reifung wurde durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD21, CD20, CD27, CD38, CD86 und HLA-DR sowie diverser Immunglobuline im Durchflusszytometer über mehrere Tage verfolgt.

4.1.1. Kultivierung von HEK CD154

In der Einleitung (1.4.) wurde deutlich, dass B-Zellen für ihr Überleben *in vitro* die Stimulation des CD40-Moleküls (auf APZ) durch seinen Liganden CD154 (auf T-Zellen) benötigen. Die CD154 (CD40L) exprimierende Zelllinie ermöglicht eine solche Stimulation. Die Zelllinie wurde durch stabile Transfektion von HEK293 Zellen hergestellt. Dieser Versuch diente dem Nachweis und der Dokumentation der Zellvitalität der transfizierten HEK-CD154 Zellen. Dazu wurde die Morphologie der Zellen nach zwei wöchiger Kultivierung unter dem Mikroskop untersucht (3.3.1. und 3.3.2.). Hierbei wurde besonders auf die Proliferation und Ausläuferbildung der HEK-Zellen geachtet. Sind die Zellen nicht in der Lage Ausläufer zu bilden und entwickeln eine kugelige Form, ist dies ein Zeichen des erfolgten oder nahen, Zelltods.

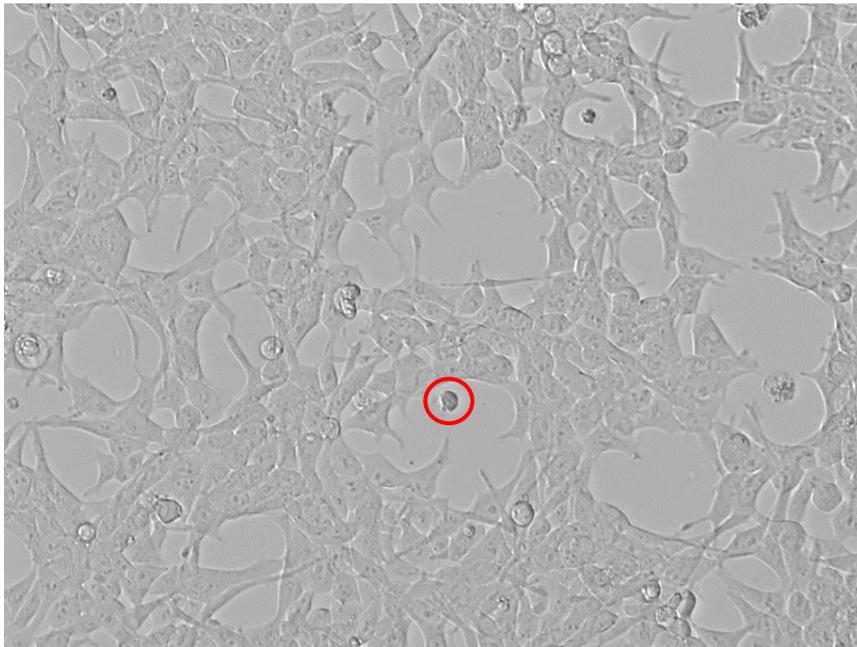


Abbildung 8: Darstellung von HEK CD154 Zellen nach zweiwöchiger Kultivierung. HEK-CD154-Zellkultur wurde nach der stabilen Transfektion bei -80°C eingefroren und nach 5 Monaten in Kultur genommen. Die Zellkultur wurde bei 37°C in T75 Kulturflaschen im 5 % CO_2 Brutschrank kultiviert. Als Medium wurde DMEM-Komplett verwendet. Die Aufnahme erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 4x Vergrößerung. Rotumkreis wird eine sterbende HEK-CD154 Zellen dargestellt.

In Abbildung 8 sind transfizierte HEK-CD154 Zellen dargestellt. Die HEK Zellen und ihre Ausläufer sind zu erkennen. Durch regelmäßige Prüfung der Zelllinie unter dem Mikroskop konnte die Vitalität und Zellproliferation festgestellt werden. In Abbildung 8 sind vereinzelt abgerundete Zellen zu erkennen (ein Beispiel ist rot eingekreist).

4.1.2. Expression von CD154 auf der Zelloberfläche

Im vorherigen Versuch (4.1.1.) konnte die Vitalität der transfizierten Zellen (HEK-CD154) morphologisch bestimmt werden. Ziel dieses Versuchs war es die Expression von CD154 auf der Oberfläche der HEK-CD154 Zellen zu testen. Hierfür wurde ein Teil der Zellkultur nach vierwöchiger Kultivierung entnommen (3.3.2.). Durch anschließende Oberflächenfärbung (3.5.1.) mit PE-CD154 (3.7.1.) sollte die Expression des Moleküls CD154 auf der Zelloberfläche der HEK-CD154 Zellen nachgewiesen werden.

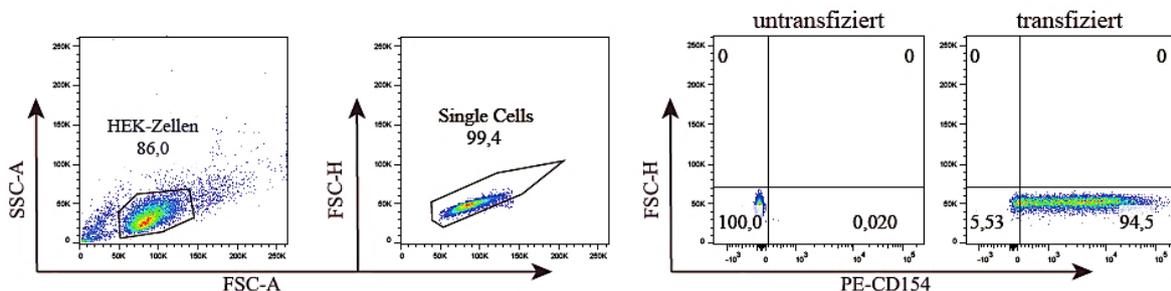


Abbildung 9: Darstellung der Expression von CD154 auf der Zelloberfläche untransfizierter und transfizierte HEK-Zellen.

Nach vierwöchiger Kultivierung bei 37°C im 5% CO_2 Inkubator, Oberflächenfärbung mit PE-CD154 und Messung am Durchflusszytometer wurde ein Dot-Plot-Diagramm erstellt. Das Gating erfolgte nach HEK-Zellen, Einzelzellen und PE-CD154. Dabei wurden HEK-CD154 Zellen als transfiziert dargestellt und untransfiziert stellt HEK293 Zellen dar.

In Abbildung 9 sind untransfizierte HEK293 und transfizierte HEK-CD154 dargestellt. Der Vergleich beider HEK-Zellen zeigt eine unterschiedliche CD154 Expression auf der Zelloberfläche. Bei den untransfizierten HEK Zellen sind 0,02% CD154 positiv. Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 9, dass die 94,5% der transfizierten Zelllinie CD154 auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die transfizierte HEK-CD15s Zelllinie ist mit 94,5% der Zellen in der Lage CD154 auf der Oberfläche zu produzieren. Für nachfolgende Versuche wurde die Zelllinie HEK-CD154 als Feeder-Zellen verwendet.

4.1.3. *In vitro* Reifung naiver B-Zellen über 8 Tage

Im folgenden Versuch wurde die *in vitro* Reifung naiver B-Zellen in Anwesenheit von HEK-CD154 Zellen (Feeder-Zellen) über 8 Tage verfolgt. Dazu wurden naive B-Zellen aus heparinisierem Vollblut mit Hilfe des EasySep Anreicherungs-Kits für naive B-Zellen (3.2.6.) aufgereinigt. Anschließend wurden IgG und IgA positive B-Zellen mit Hilfe des EasySep-Kits (3.6.) aus der aufgereinigten Vollblutprobe entfernt. Die aufgereinigten B-Zellen wurden gezählt und ein Teil der HEK-CD154 Zellkultur wurde mit 10-30 Gy bestrahlt (3.3.3.). Nach der Bestrahlung wurden die HEK-CD154 Zellen auf eine 24 Well Platte in 1,5 ml B-Zell-Medium ausplattiert. Die naiven B-Zellen wurden zu den HEK-CD154 Zellen gegeben und 8 Tage inkubiert (3.4.3.). Als Kontrolle wurden unbestrahlte HEK-CD154 Zellen verwendet. Für die Auswertung werden CD21, CD38, IgG, IgD, IgM und IgA verwendet. Die Markierung der B-Zellen erfolgte durch eine Oberflächenfärbung (3.5.1.). Die anschließende Messung erfolgt im Durchflusszytometer (3.7.2.).

Ergebnisse

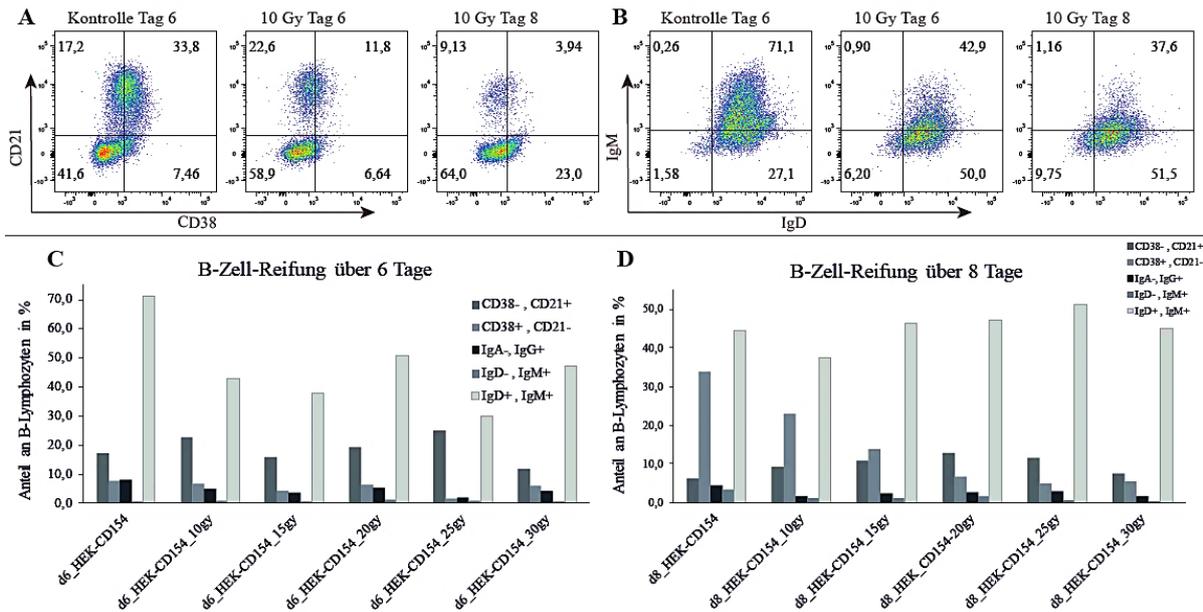


Abbildung 10: Reifung naiver B-Zellen *in vitro* nach achttägiger Inkubation.

Naive B-Zellen werden aus Vollblut aufgereinigt und mit HEK-CD154-Zellen, die mit 10-30 Gy bestrahlt worden, ausplattiert. Die Zellen wurden für die Marker CD21, CD38, IgG, IgD, IgM und IgA gefärbt und am Canto II gemessen. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo. **A.** Dot-Plot-Diagramme von CD21 gegen CD38. Dargestellt sind unbestrahlte (Kontrolle) und mit 10 Gy bestrahlte HEK-CD154-Zellen, nach sechstägiger Inkubation, sowie mit 10 Gy bestrahlte HEK-CD154 Zellen nach achttägiger Inkubation. **B.** Dot-Plot-Diagramm von IgM gegen IgD. Dargestellt sind Kontrolle, 10 Gy Tag 6 und 10 Gy Tag 8. **C.** Balkendiagramm als Zusammenfassung der Dot-Plot-Diagramme. Prozentsätze der Quadranten aus A. werden dargestellt. Zu sehen sind die Prozentsätze an B-Lymphozyten nach sechstägiger Inkubation. **D.** Balkendiagramm als Zusammenfassung der Dot-Plot-Diagramme. Prozentsätze der Quadranten werden dargestellt. Zu sehen sind die Prozentsätze an B-Lymphozyten nach achttägiger Inkubation. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo 10.

Die Reifung der B-Zellen wurde acht Tage lang verfolgt, wobei nach 6 Tagen ein Teil der Kultur entnommen und gefärbt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 in Dot-Plot- und Balken-Diagrammen dargestellt. Abbildung 10.A. zeigt die Entwicklung der Expression der Marker CD21 und CD38. Vergleicht man die Kultivierung der B-Zellen auf bestrahlten im Gegensatz zu unbestrahlten HEK-CD154 ist eine Abnahme von CD21 (insgesamt 65,5% im Vergleich zu 49,1% CD21-negative Zellen) zu erkennen. Bei Kultur der B-Zellen auf den bestrahlten Zellen sind nach achttägiger Kultivierung 87% der B-Zellen CD21-negativ. Die Kultivierung der B-Zellen auf bestrahlten Feeder-Zellen führt des Weiteren zu einer verminderten Expression von CD38 im Vergleich zu den unbestrahlten HEK-CD154 Zellen (81,5% CD38-negative Zellen im Vergleich zu 58,8% bei Kultur auf der unbestrahlten Kontrolle). Die Kultur auf bestrahlten Feeder-Zellen führt ebenfalls zu einer stärkeren Abnahme der Expression von Oberflächen-IgM und -IgD (Abb. 10B.). Zellen die weder IgM noch IgD auf ihrer Oberfläche exprimieren, haben vermutlich einen Klassenwechsel vollzogen und könnten stattdessen entweder IgG oder IgA exprimieren. Der Anteil der IgM-/IgD-doppelnegativen Zellen liegt bei Kultivierung von B-Zellen auf bestrahlten Feeder-Zellen

nach sechs Tagen bei 6,2% im Vergleich zu 1,6% im Kontrollansatz. Bei Weiterkultivieren der B-Zellen mit den bestrahlten Feeder-Zellen steigt der Anteil IgM-/IgD- doppeltnegativen Zellen 9,75% an Tag 8. In Abbildung 10D. sind die Auswirkungen verschiedener Bestrahlungsbedingungen der Feeder-Zellen auf die Expression von Oberflächenmarkern durch B-Zellen in Form von Balkendiagrammen zusammengefasst.

4.1.4. *In vitro* Reifung von B-Zellen mit Hilfe von IL-4 und rhCD40L

In diesem Versuch wurden B-Zellen aus PBMCs mittels Positivselektion von CD19-Pluribeads (3.2.7.) aufgereinigt und anschließend mit rhCD40L und IL-4 (3.4.2.) behandelt. Die B-Zellen wurden mit Spherotech-Beads inkubiert, welche auf ihrer Oberfläche Antikörpern gegen den BZR (anti-IgG-Antikörper) tragen. Die Stimulation erfolgte für 7 Tage. An Tag 0, 1, 4 und 7 wurden die Proben gefärbt (3.5.1.) und am Durchflusszytometer gemessen (3.7.2.). Zum Auswerten des Versuches werden IgD, IgG, CD86, CD21, IgM und HLA-DR verwendet.

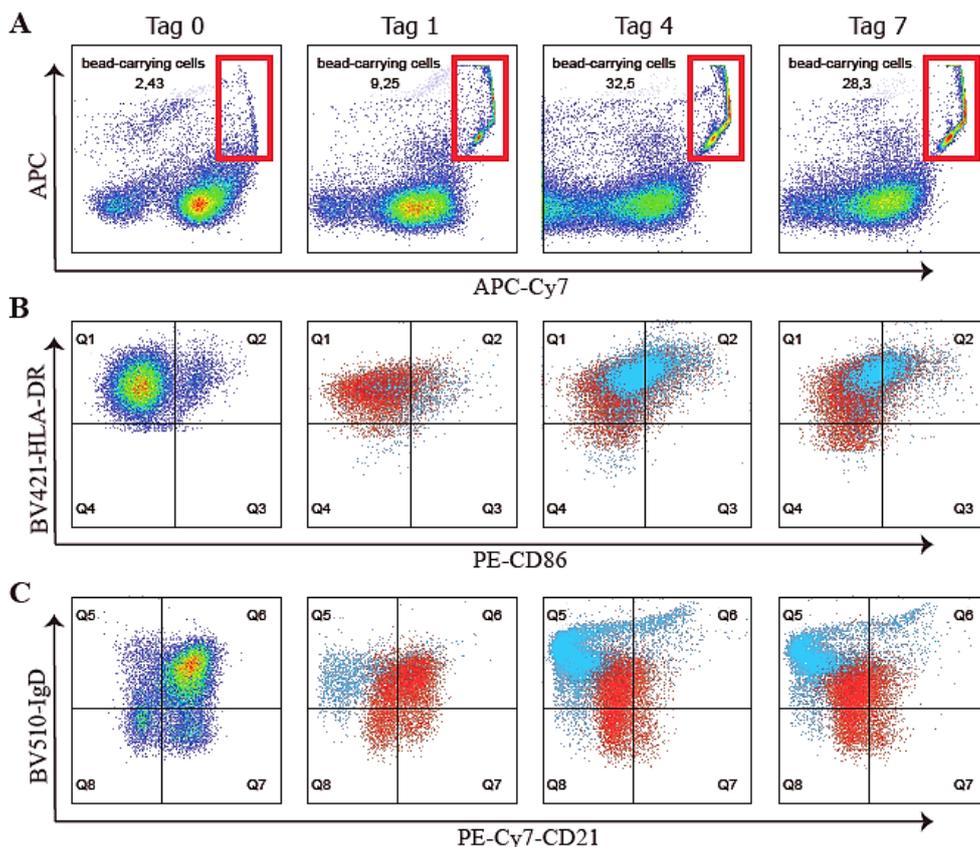


Abbildung 11: In vitro Reifung von B-Lymphozyten über 7 Tage in Gegenwart von rhCD154 und IL-4.

B-Zellen wurden mit CD19-PluriBeads aus PBMCs aufgereinigt und 7 Tage mit anti-IgG-beschichteten Spherotech Beads, rhCD154 und IL-4 bei 37°C in einem 5% CO₂ Brutschrank inkubiert. An den Tagen 0, 1, 4 und 7 erfolgte eine Oberflächenfärbung und Messung am Canto II. Die Ergebnisse sind als Dot-Plot Diagramme dargestellt. Zellen, die Beads aufgenommen haben, sind durch ihre hohe Fluoreszenz in den Kanälen APC und APC-Cy7 zu identifizieren (rotes Kästchen in **A.**). Die Expression der für die Antigenpräsentation wichtigen Oberflächenmarker HLA-DR und CD86 durch Zellen, die Beads aufgenommen haben (blau) im Vergleich zu Zellen, die keine Beads aufgenommen haben (rot) sind in **B.** dargestellt. **C.** Expression von Oberflächen-IgD und CD21 auf Beads-tragenden (blau) und –nicht tragenden (rot) Zellen. Zur Auswertung wurde FlowJo 10 verwendet.

Dieser Versuch verfolgt die Reifung von B-Zellen über 7 Tage in Kultur in Gegenwart von rekombinantem humanen CD154 und IL-4 als Überlebenssignale und Wachstumsfaktoren. Zusätzlich wurden die B-Zellen mit fluoreszierenden Beads inkubiert, die mit Antikörpern gegen den BZR (anti-IgG-Antikörper) beschichtet waren. Die Beschichtung mit anti-IgG-Antikörpern sollte bewirken, dass die Beads an den BZR von IgG-tragenden B-Zellen binden und von diesen aufgenommen werden (s. Abschnitt 4.3). Die Abbildung 11.A. zeigt, dass Zellen die Beads aufgenommen haben, durch ihre hohe Fluoreszenz in den Kanälen APC und APC-Cy7 leicht zu identifizieren sind (roter Kasten in Abb. 11.A.). Während zu Beginn der Kultur in diesem Bereich nur wenige, vermutlich unspezifische, Signale zu sehen sind, steigt die Zahl der Zellen, welche Beads aufgenommen haben mit fortschreitender Kulturdauer an, wobei am Tag 4 mit 32,5% das Maximum erreicht wird. In Abbildung 11.B. und C. wird die Expression von Oberflächenmarkern von Zellen, die Beads aufgenommen haben (blau) und Zellen die keine Beads aufgenommen haben (rot), verglichen. Abbildung 11.B. zeigt, dass die Aufnahme von Beads über den BZR zu einer deutlichen Zunahme der für die Antigenpräsentation wichtigen Moleküle HLA-DR und CD86 führt. Als MHC-II-Molekül ist HLA-DR notwendig für die Präsentation des Antigen-Peptids. CD86 ist der Ligand für CD28 auf T-Zellen und ist für die Übertragung ko-stimulatorischer Signale notwendig. Abbildung 11.C. zeigt, dass es bei Zellen, die Beads über den BZR aufgenommen haben zu einer schnellen und deutlichen Abnahme von CD21 im Zusammenhang mit einer Zunahme der Expression von Oberflächen-IgD kommt.

Zusammenfassend wurde im Versuchsteil 4.1. gezeigt, dass bestrahlte HEK-CD154-Zellen in der Lage sind B-Zellen über mehrere Tage in Kultur am Leben zu erhalten und dabei teilweise einen Klassenwechsel der Immunglobuline auf der Zelloberfläche hervorzurufen (4.1.4.). Dabei zeigte sich auch, dass die Proliferation der HEK-Zellen nur teilweise reduziert werden kann ohne ihren Zelltod zu verursachen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass rhCD154 in Kombination mit IL-4 sich als Feeder-Zell-Ersatz (4.1.4.) eignet und die Kultivierung von B-Zellen über mehrere Tage unter definierten Bedingungen ermöglicht.

4.2. Antigenpräsentation: *In vitro* Stimulation von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten

T-Zellen werden durch APZ aktiviert. Dies führt unter anderem zur Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche oder Zellproliferation. In diesem Versuchsteil wurde die Antigenpräsentation durch APZ für T-Zellen untersucht. Dabei wurden zwei Methoden angewendet, darunter die Langzeit- und Kurzzeitstimulation. Als Antigene wurden das pp65-Protein und der Grippeimpfstoff Vaxigrip verwendet. Zum Nachweis der Antigen-spezifischen *in vitro* Stimulation von T-Zellen (3.4.4.) wurden Aktivierungsmarker und die Proliferation der Zellen bestimmt. Nach der Inkubation erfolgte die Oberflächenfärbung (3.5.1.) und Detektion der angefärbten T-Zellen im Durchflusszytometer (3.7.1.).

4.2.1. Aktivierung von T-Zellen durch aufgereinigte B-Zellen

In diesem Versuch wurde die *in vitro* T-Lymphozyten Zellaktivierung und Proliferation über 7 Tage ermittelt. T- und B-Zellen wurden aus heparinisiertem peripheren Blut mit Hilfe von CD19- und CD2-tragenden Beads (PluriSelect) aufgereinigt (3.2.7.). Nach der Zellaufreinigung, wurden die B- und T-Zellen gezählt (3.2.4.) und in einer 24-Well Platte ausplattiert. Die T-Zellen wurden mit EFluor670 angefärbt und alleine oder in Anwesenheit von B-Zellen als APZ mit pp65 (Antigen) und Cytostim (Positivkontrolle) stimuliert (3.5.5.). Ferner wurde eine unstimulierte Probe als Negativkontrolle mitgeführt. Zur Auswertung der Zellproliferation wurde die Expression der Aktivierungsmarkern CD25 zusammen mit dem Verlust von EFluor670 bestimmt. Die Proben wurden an Tag 4 und Tag 7 mittels Oberflächenfärbung (3.5.1.) markiert und im Durchflusszytometer gemessen.

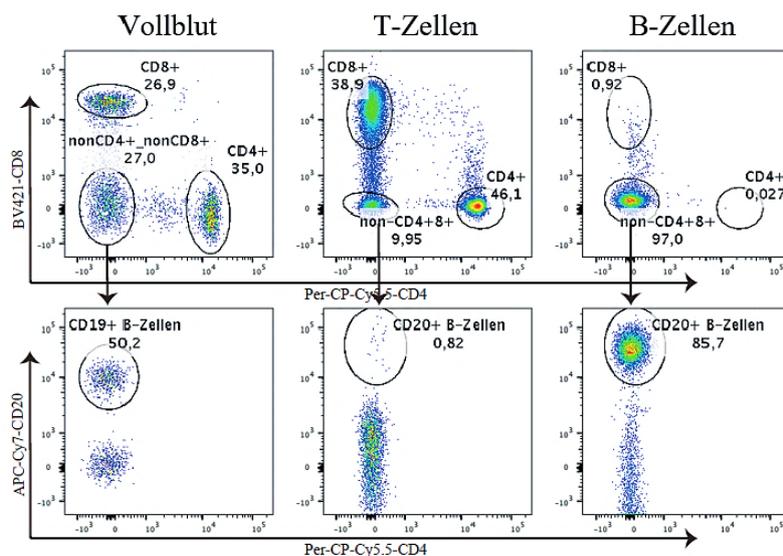


Abbildung 12: Aufreinigung von T- und B-Zellen aus Vollblut.

Die B- und T-Zellen wurden mit CD2 und CD19 PluriBeads aus Vollblut aufgereinigt. Anschließend wurden die Proben mit T-Zell-Oberflächenmarkern (CD4, CD8) und B-Zell-spezifischen Markern (CD20) gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo. Die oberen drei Dot-Plot-Diagramme zeigen CD8 gegen CD4. Die unteren drei Dot-Plot-Diagramme zeigen CD20 gegen CD4.

Die Abbildung 12 zeigt, dass die Vollblutprobe insgesamt 62% CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen enthielt. Von den übrigen Zellen (nonCD4⁺ und nonCD8⁺ Zellen) sind 50% B-Zellen (CD20⁺). Die aufgereinigte T-Zell-Fraktion enthielt 85% CD4 und CD8 positive Zellen, dies entspricht einer Zunahme der Expression von 20% im Vergleich zu der Vollblutprobe. Außerdem zeigt die Abbildung 12, dass in den nicht CD4⁺ und CD8⁺ Zellen mit 0,82% kaum noch CD20⁺ Zellen nachweisbar waren. Die aufgereinigte B-Zell-Fraktion enthielt 1% CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Die nonCD4⁺ und nonCD8⁺ Zellen enthielten 85,7% CD20⁺ Zellen (Abb. 12).

Die Positivselektion der B- und T-Zellen war erfolgreich. Die aufgereinigten Proben zeigten bei den B-Zellen eine Reinheit von 83,1% und bei den T-Zellen von 85%. Bei den T-Zellen könnte es sich bei den CD4/CD8 doppelnegativen Zellen auch um natürliche Killer (NK-) Zellen handeln die, ebenso wie T-Zellen, den zur Aufreinigung verwendeten Marker CD2 tragen.

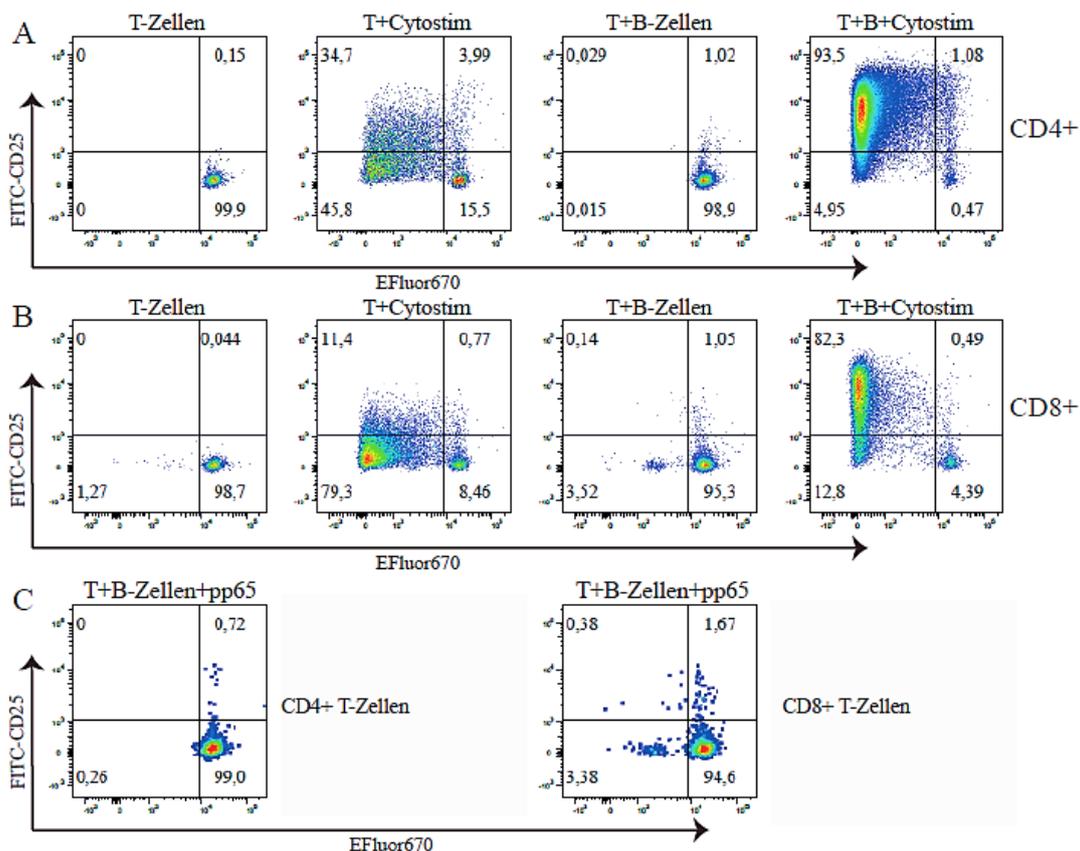


Abbildung 13: T-Zell-Proliferation und Aktivierung über 7 Tage

T- und B-Zellen wurden aus Vollblut aufgereinigt und in den angegebenen Kombinationen für 7 Tage bei 37°C im 5% CO₂ Brutschrank mit dem polyklonalen Aktivator Cytostim (**A** und **B**) oder dem spezifischen Antigen pp65 (**C**) stimuliert. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung und Messung im Durchflusszytometer. Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme für CD25 gegen EFluor670 für CD4⁺ (**A**) und CD8⁺ T-Zellen (**B**). In **C** sind die Ergebnisse der Stimulation von T- und B-Zellen mit dem pp65-Protein für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dargestellt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Im Dot-Plot-Diagramm sind Zellen die proliferiert haben in den linken beiden Quadranten zu finden. Zellen im linken oberen Quadranten tragen zusätzlich CD25 als Ausdruck einer starken Aktivierung. Die polyklonale Stimulation der T-Zellen alleine oder in Anwesenheit von B-Zellen als APZ zeigt Unterschiede von ca. 40% in der Expression von CD25⁺/Efluor670⁻. Die CD4⁺ Zellen, die in Anwesenheit von B-Zellen durch Cytostim stimuliert wurden, haben 93% CD25⁺/Efluor670⁻ Zellen (Abb. 13.A). Im Gegensatz dazu sind es nur 34,7%, wenn die T-Zellen alleine stimuliert wurden. Auf den CD8⁺ Zellen ist eine ähnliche Tendenz zu erkennen (Abb. 13.B.). Hier sind 82,3% der Zellen, welche in Anwesenheit von B-Zellen mit Cytostim behandelt wurden CD25⁺/Efluor670⁻ im Vergleich zu 11,4%, wenn die T-Zellen alleine stimuliert wurden. Bei den unstimulierten Proben sind ebenfalls Unterschiede zu erkennen. Die T-Zellen alleine haben auf CD4⁺ sowie auf CD8⁺ T-Zellen keine nachweisbare CD25 Expression, welche mit Antikörpern detektiert werden kann. Die Kombination aus B- und T-Zellen führt auf 0,029% der CD4⁺ und 0,14% der CD8⁺ T-Zellen zu einer CD25⁺/Efluor670⁻ Expression. Die Stimulation der B- und T-Zellen durch das pp65 Protein führte auf 0,72% der CD4⁺ und 1,67% der CD8⁺ T-Zellen zu einer CD25⁺/Efluor670⁺ Expression (Abb. 13.C.).

Die entscheidende Rolle von APZ bei der Stimulation der T-Zellen konnte in diesem Versuch nachgewiesen werden. Die polyklonale Stimulation mit Cytostim führt auch bei aufgereinigten T-Zellen (mit einem geringen Anteil an APZ) zu einer Stimulation, die geringer ist, als die Proben die B-Zellen als APZ enthalten. Das Fehlen der B-Zellen erlaubte zwar eine Proliferation, jedoch nicht die langdauernde Expression von CD25 (IL-2-Rezeptor).

4.2.2. Kurzzeit-Protokoll mit Nachweis der T-Zell-Aktivierung durch Expression von CD154 und CD137

Ziel dieses Versuches war es, die Aktivierung von T-Zellen durch spezifische Antigene in einem Kurzzeit-Protokoll (Beladung von APZ über Nacht und Stimulation für 7 Stunden) darzustellen. Dazu wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137 zur Auswertung für die T-Zell-Aktivierung verwendet. Die T-Zellen wurden aus eingefrorenen PBMCs, wie im vorigen Versuch, durch Positivselektion mit Hilfe von CD2-Pluribeads aufgereinigt. Der Durchfluss dieser Aufreinigung, der alle APZ enthalten sollte, wurde getrennt aufgefangen und mit spezifischen Antigenen (pp65 Protein und Vaxigrip-Impfstoff) über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die APZs und T-Zellen gemeinsam aufplattiert und zur Stimulation für weitere 7 Stunden bei 37°C inkubiert. In dieser Phase wurde ein Ansatz mit Cytostim als Positivkontrolle für die Aktivierung mitgeführt. Anschließend erfolgte eine

Oberflächenfärbung für die Marker CD4, CD8, CD137, CD154 und dem Farbstoff Pacific Orange zum Ausschluss toter Zellen (3.5.1.).

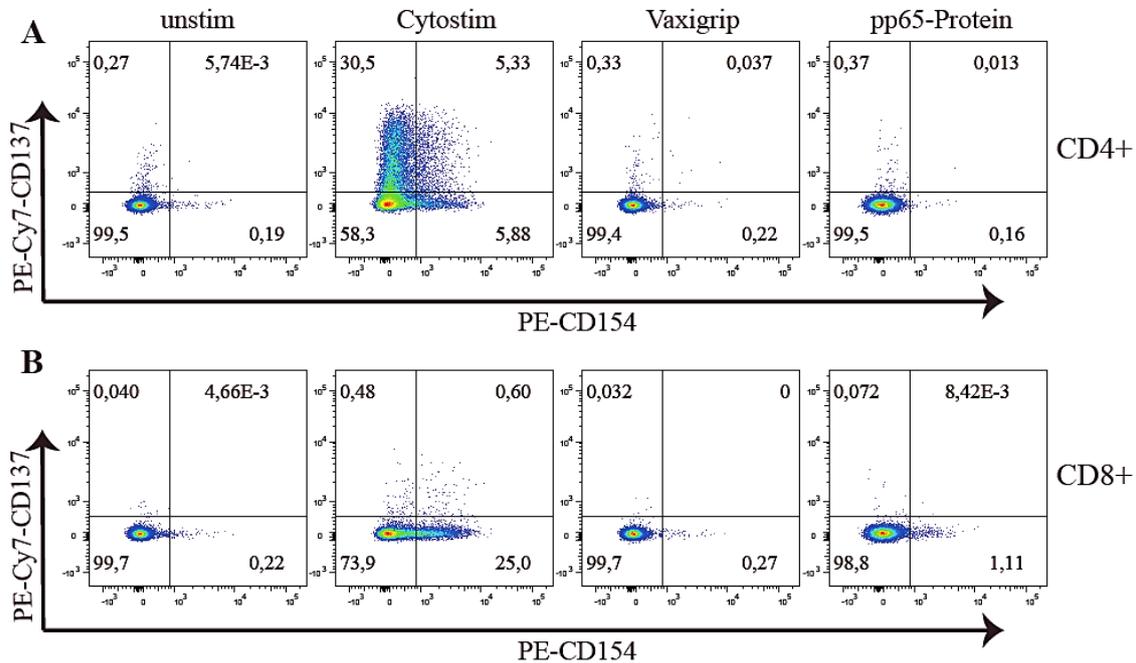


Abbildung 14: Kurzzeit-Protokoll zur antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung.

T-Zellen wurden durch Positivselektion an CD2-Pluribeads aus PBMCs aufgereinigt. Die nicht-gebundene Zellfraktion mit B-Zellen und Monozyten als APZ wurde für 24h mit CMV pp65 Protein und dem Grippeimpfstoff Vaxigrip bei 37°C inkubiert. Danach wurden diese Zellen mit den aufgereinigten T-Zellen zur Stimulation für 7h bei 37°C inkubiert, ehe eine Oberflächenfärbung für die Aktivierungsmarker CD154 und CD137 erfolgte. In dieser Stimulationsphase wurden auch Ansätze mit Cytostim (Positivkontrolle) und ohne Antigen (Negativkontrolle) mitgeführt. Die Dot-Plots zeigen die Expression von CD154 und CD137 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Die Abbildung 14 zeigt die Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137 auf der Oberfläche von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Dabei wurden die Proben mit dem pp65 Protein, dem Grippeimpfstoff Vaxigrip und Cytostim stimuliert. Eine unstimulierte Probe wurde als Negativkontrolle mitgeführt. In Abbildung 14.A sind die CD4⁺ T-Zellen der jeweiligen Proben dargestellt. Dabei zeigten 0,27% der unstimulierten Zellen eine CD154 Expression und 0,19% CD137 auf der Zelloberfläche. 0,33% der mit dem Grippeimpfstoff Vaxigrip behandelten CD4⁺ Zellen waren CD154 positiv. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass 0,22% der gleichen Probe CD137 exprimieren. Die polyklonale Stimulation mit Cytostim als Positivkontrolle führte dazu, dass 30,5% CD154 und 5,88% CD137 auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Zellen, welche mit dem pp65 Protein behandelt wurden, zeigten eine Expression von 0,37% CD154 und 0,16% von CD137, wobei dieser Wert um 0,03% geringer war als der Wert der Negativkontrolle (unstimuliert). Die CD8⁺ T-Zellen (Abb. 14.B) exprimierten nur wenig CD154 auf ihrer Zelloberfläche. Auch die mit Cytostim als Positivkontrolle stimulierte Probe zeigte nur 0,48% CD8⁺ T-Zellen, welche CD154 trugen. Dagegen war die Expression von

CD137 bei den CD8⁺ mit bis zu 25% bei der Positivkontrolle Cytostim deutlich höher (Abb.14.B). 0,22% der unstimulierten CD8⁺ T-Zellen zeigten eine CD137 Expression, sowie 0,27% der CD8⁺ mit Vaxigrip stimulierten und 1,11% der CD8⁺ mit pp65 Protein stimulierten T-Zellen.

In den Ergebnissen (4.2.2.) konnte dargestellt werden, dass der Hintergrund (Abb.14.) der unstimulierten T-Zellen mit 0,27% CD154 und 0,19% CD137 oftmals von der Antigen-spezifischen Immunantwort nicht zu unterscheiden ist. Die Positivkontrolle mit Cytostim zeigt, dass bei CD4⁺ T-Zellen vor allem CD154 als Aktivierungsmarker hochgefahren wird. In dieser Zellpopulation gilt CD137 als Aktivierungsmarker speziell für regulatorische T-Zellen [Literatur: Bacher]. Dagegen ist CD137 der Haupt-Aktivierungsmarker für CD8⁺ T-Zellen. In dieser Zellpopulation ist nur eine kleine Population von CD154⁺ Zellen nachzuweisen. Bei dem vergleichsweise hohen Hintergrund bei den unstimulierten Zellen ist eine antigenspezifische Aktivierung durch den Vaxigrip Impfstoff nicht sicher nachzuweisen. Auch für das CMV pp65 Protein ist bei den CD4⁺ T-Zellen keine sichere Reaktion nachzuweisen. Dagegen ist bei den CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit pp65 eine Vermehrung der CD137⁺ Zellen im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle deutlich zu beobachten.

In diesem Versuchsabschnitt (4.2.) wird die in vitro T-Zell-Stimulation dargestellt. Es werden zwei Verfahren, Kurzzeit- und Langzeit-Stimulation der T-Zellen, angewendet. Bei dem Langzeitverfahren werden B- und T-Zellen aus Vollblut aufgereinigt, die T-Zellen gefärbt und gemeinsam mit B-Zellen für 7 Tage inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen konnte in diesem Versuch (4.2.1.) nachgewiesen werden. Die Kombination aus B- und T-zellen führte zu einer verstärkten und vermehrten B-Zell-Aktivierung; Sodass auf den CD4⁺ T-Zellen (Abb. 13.A T+B+Cytostim) 93,5% CD25⁺/Efluor670⁻ sind. Die CD8⁺ T-Zellen zeigen mit 82,3% der T-Zellen ebenfalls eine Aktivierung und Proliferation der Zellen durch die APZ. Wie in der Aufreinigung (4.2.1.) gezeigt wird konnten die T-Zellen nicht von allen APZ getrennt werden. Der Anteil an B-Zellen ist nach der T-Zellaufreinigung mit 0,82%, im Vergleich zu der Vollblutprobe mit 50%, geringer. Die T-Zellen werden somit durch die verbliebenen APZs (Monozyten und dendritische Zellen) stimuliert. Das Antigen Vaxigrip zeigte bei der Kurzzeitsimulation (4.2.2) geringe Unterschied zur unstimulierten Probe. Sowohl bei den CD4⁺ als auch bei den CD8⁺ T-Zellen sind Unterschiede in der Expression der Aktivierungsmarker CD137 und CD154 von 0,06% zu detektieren. Das pp65 Protein hingegen zeigte bei 1,11% der CD8⁺ T-Zellen eine gesteigerte Expression des Aktivierungsmarkers CD137 im Gegensatz zu der unstimulierten Probe mit 0,22%.

4.3. Targeting von B-Lymphozyten: gezieltes Einschleusen von Antigenen in den Prozessierungs- und Präsentationsweg von B-Lymphozyten

B-Zellen sind in der Lage Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und mit Hilfe von MHC-II-Molekülen T-Zellen zu präsentieren (1.2.). Durch gezieltes Einschleusen von Antikörpertragenden Beads wurde die Antigenpräsentation der B-Zellen untersucht. Als Antigene wurden der Grippeimpfstoff Vaxigrip und das Protein pp65 verwendet. Die erfolgreiche Antigenpräsentation wurde durch die Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung nachgewiesen. Hierzu wurden wie im vorigen Abschnitt die Expression von CD154 und CD137 bei Kurzzeitstimulationen sowie die Verdünnung von EFluor670 in Verbindung mit der Expression von CD25 bei Langzeitversuchen (3.5.4 und 3.5.5) untersucht.

4.3.1. Aufnahmefähigkeit von Beads durch B-Zellen

Ziel dieses Versuchs war es die spezifische Aufnahmefähigkeit von unterschiedlich behandelten Spherotech Beads durch B-Zellen zu bestimmen. Diese Beads besitzen eine Eigenfluoreszenz, welche im Durchflusszytometer in den Kanälen für APC und APC-Cy7 nachgewiesen werden kann (1.6.). Um die Aufnahme durch B-Zellen zu vermitteln, wurden die Beads mit Antikörpern gegen CD21, IgM als B-Zell Oberflächenantigene, gegen CD4 oder Bcl-2 als Negativkontrollen gekoppelt (3.4.1.). Die B-Zellen wurden mit CD19-tragenden PluriBeads aus PBMCs aufgereinigt (3.2.7.). Die Antikörpertragenden Beads wurden zusammen mit den B-Zellen über 18 Stunden bei 37°C im 5% CO₂ Brutschrank inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen (3.5.1.)

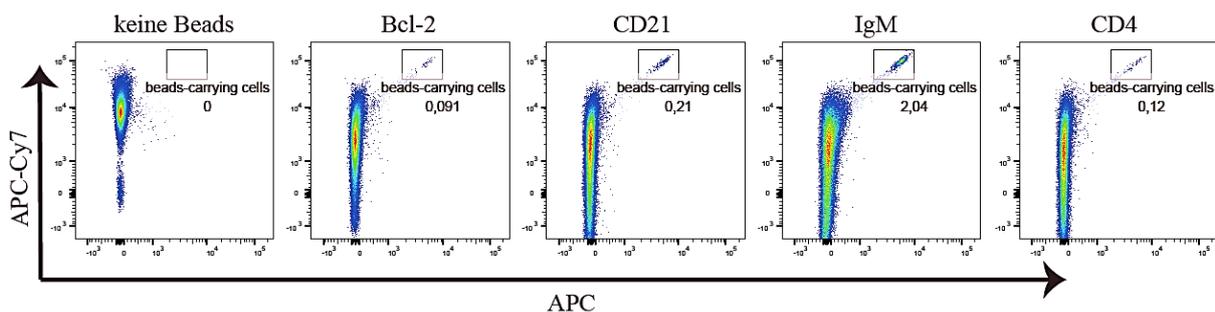


Abbildung 15: Antikörper vermittelte Aufnahme von Beads durch B-Lymphozyten.

B-Zellen wurden aus PBMCs aufgereinigt und mit Spherotech Beads, die vorher mit den angegebenen Antikörpern beladen worden waren, für 18h bei 37°C inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind Dot-Plot Diagrammen für APC-Cy7 gegen APC. Zellen, die Beads aufgenommen haben, erscheinen in dem Kasten. Zur Auswertung wurde FlowJo verwendet.

In Abbildung 15 wird der Anteil der B-Zellen, die die jeweiligen Antikörper-beschichteten Beads aufgenommen haben, dargestellt. Für die Inkubation der B-Zellen wurden unbehandelte Beads, Beads mit AK gegen CD21, CD4, IgM und Bcl-2 eingesetzt. Die Beads sind durch ihre hohe Eigenfluoreszenz in Dot-Plot-Diagrammen für APC gegen APC-Cy7 eindeutig zu identifizieren. Vorversuche hatten gezeigt, dass unter den verwendeten Einstellungen freie Beads wegen ihrer geringen Größe (2µm) nicht vom FACS-Gerät registriert werden (Ergebnis nicht dargestellt). Die unbehandelten Beads können nicht intrazellulär detektiert werden (Abb.15). Die Zellen die mit Beads mit anti- Bcl-2-AK behandelt wurden, konnten von 0,091% der B-Zellen aufgenommen werden. Des Weiteren ist der Abbildung 15 zu entnehmen, dass 0,12% der B-Zellen die Beads mit anti-CD4-AK aufgenommen haben. Nach der Behandlung mit Beads, welche anti-CD21-Antikörper tragen waren 0,21% der gemessenen Zellen innerhalb der B-Zellen zu detektieren. Die Inkubation der B-Zellen mit den Beads die anti-IgM-Antikörper tragen führte zu 2,04% APC-Cy7/APC positiven B-Zellen.

4.3.2. Antigenpräsentation durch IgM tragende B-Lymphozyten

Die im vorherigen Versuch getesteten Beads wurden verwendet, um die Fähigkeit von IgM-tragenden B-Zellen zur Antigenpräsentation zu untersuchen. Die Antigenpräsentation der B-Zellen wurde anhand der T-Zell-Aktivierung sowie Proliferation untersucht. PBMCs wurden mit EFluor670 gefärbt. Die fluoreszierenden Beads wurden mit Antikörpern und Antigenen, hier IgM und Vaxigrip, gekoppelt (3.4.1.). Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 7 Tage. Zur Auswertung dienten die Expression von CD25 (3.5.1.) und die EFluor670-Markierung.

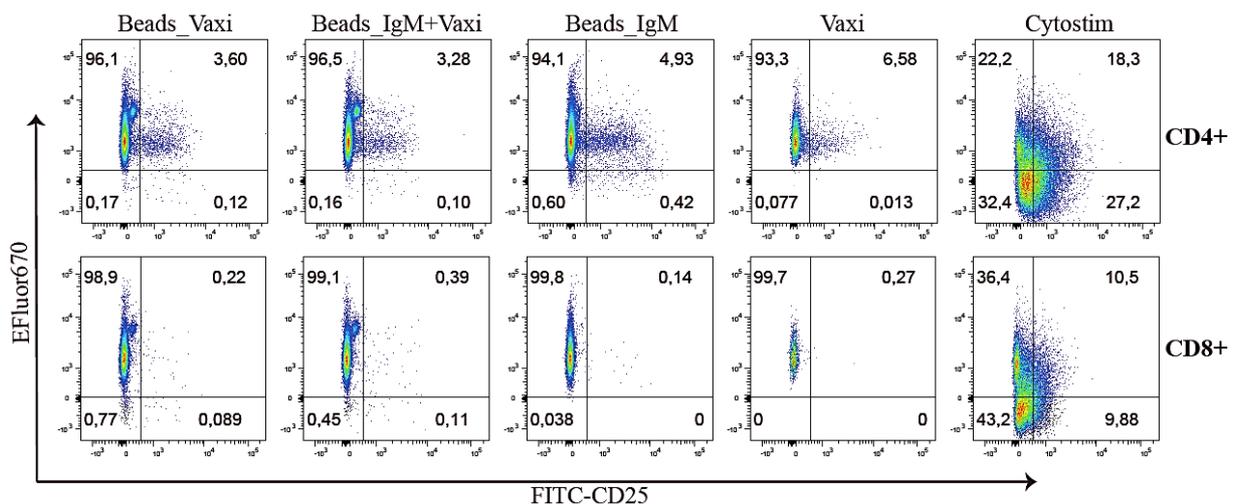


Abbildung 16: T-Zell-Aktivierung mittels gezielter Einschleusung von IgM Beads in B-Lymphozyten.

EFluor670-markierte PBMCs wurden für 7 Tage mit Beads inkubiert, die mit den angegebenen Kombinationen von Antigen und Antikörper beladen waren. Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme der CD4 und CD8 positiven Zellen. Aufgetragen ist EFluor670 gegen FITC-CD25. Als Positivkontrolle wird Cytostim verwendet. Das lösliche Vaxigrip wird ebenfalls zu einer Probe gegeben. Nach der Inkubation erfolgt die Oberflächenfärbung und Messung im Durchflusszytometer.

Die Abbildung 16 zeigt die Aufnahme und Präsentation von Antigenen durch B-Zellen. Die Zellen, welche mit Cytostim behandelt wurden, zeigen eine starke Stimulation, welche durch eine starke Proliferation, gemessen als Verlust der EFluor670-Fluoreszenz (59,6% der CD4⁺ und 53,1% der CD8⁺ T-Zellen), dargestellt wird. Bei den CD4⁺ T-Zellen konnte unter diesen Bedingungen mit 0,3% (Beads mit Vaxigrip), 0,25% (Beads mit anti-IgM und Vaxigrip), sowie 0,1% (lösliches Vaxigrip) kaum eine Reaktion auf Vaxigrip festgestellt werden. Der einzige Ansatz ohne Antigen (Inkubation mit Beads, die nur mit anti-IgM beschichtet waren) zeigte mit ca. 1% den höchsten Anteil EFluor670-negativer und CD25-positiver Zellen. Bei den CD8⁺ T-Zellen war hingegen in allen Ansätzen mit Vaxigrip eine Erhöhung der EFluor670-negativen und CD25-positiven Zellen gegenüber der Kontrolle sichtbar. Des Weiteren zeigte sich, dass die gleichzeitige Beladung der Beads mit anti-IgM und Vaxigrip keinen Vorteil gegenüber der Beladung mit Vaxigrip alleine brachte. Die Darbietung von löslichem Vaxigrip führte nicht zur T-Zell-Aktivierung.

4.3.3. Antigenpräsentation durch IgG tragende B-Lymphozyten

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob Antigene in IgG-tragende B-Zellen (Memory-B-Zellen) eingeschleust werden können, um T-Zellen zu stimulieren. Es werden PBMCs verwendet. Anders als im vorherigen Versuch werden ein Kurzzeitprotokoll, sowie anti-IgG-Antikörper verwendet. Die Beads (Spherotech) wurden mit anti-IgG-AK sowie pp65 Protein und Vaxigrip gekoppelt. Zur Auswertung wird die Expression von CD137 und CD154 auf der T-Zell-Oberfläche gemessen (3.5.1.).

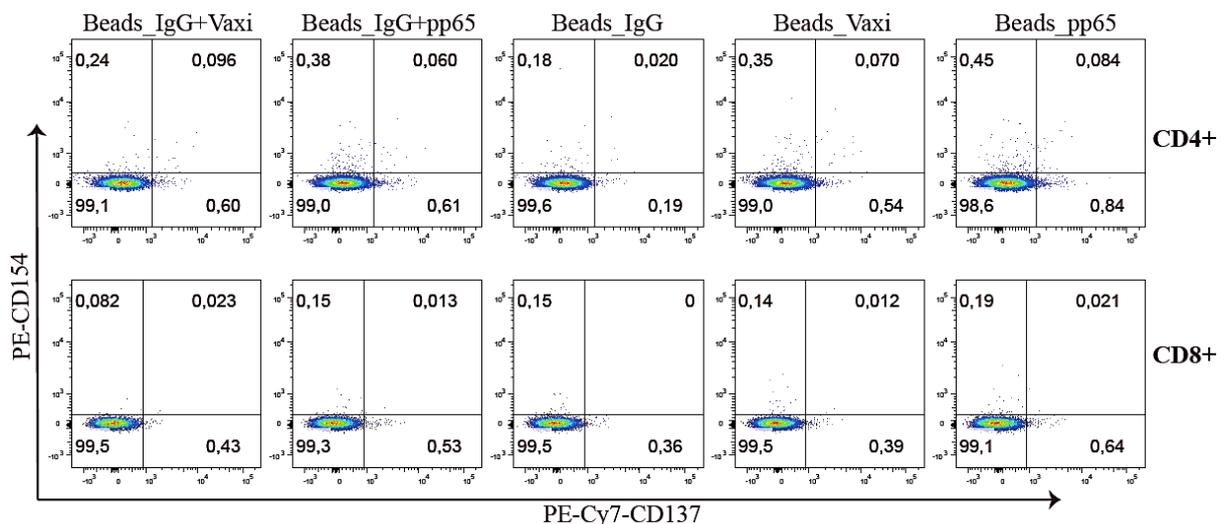


Abbildung 17: In vitro Antigenpräsentation durch IgG tragenden B-Lymphozyten.

PBMCs wurden mit Beads, die mit den angegebenen Kombinationen von Antigenen und Antikörper beladen waren, für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, angefärbt, und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt werden Dot-Plot-Diagramme von CD4 und CD8 positiven T-Zellen für PE-CD154 gegen PE-Cy7-CD137. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo.

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass Beads, die mit anti-IgG zusammen mit pp65 oder Vaxigrip gekoppelt waren, eine Reaktion gegen diese Antigene sowohl bei CD4⁺ (gemessen als % CD154⁺ Zellen) als auch bei CD8⁺ T-Zellen (gemessen als % CD137⁺ Zellen) auslösen. Beads, die mit anti-IgG und Vaxigrip bzw. pp65 beschichtet waren, führten zu 0,24% bzw. 0,38% aktivierten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu 0,18% im Kontrollansatz ohne Antigen (gemessen als CD154 Expression in %). In den gleichen Ansätzen fanden sich 0,43% bzw. 0,53% aktivierte CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu 0,36% im Kontrollansatz ohne Antigen (CD137 Expression in %). In diesem Versuch konnte, wie in Versuch 4.3.2 ebenfalls dargestellt werden, dass die zusätzliche Beschichtung der Beads mit anti-IgG keinen Vorteil gegenüber der Kopplung des Antigens alleine an die Beads brachte.

4.3.4. Langzeit *in vitro* Stimulation IgG positiver B- Lymphozyten

Wie im vorherigen Versuch sollte in diesem nachfolgenden Versuch die Antigenpräsentation von IgG-tragenden B-Zellen anhand der T-Zell-Stimulation nachgewiesen werden. Anders als im vorherigen Versuch wurde ein Langzeitversuch durchgeführt. Des Weiteren wurden aufgetaute PBMCs (3.2.5.) mit Efluor670 markiert. Die Inkubation erfolgte für 7 Tage (3.5.5.). Anhand von CD25 und EFluor670 wurde die Zellaktivität sowie die Zellproliferation gemessen.

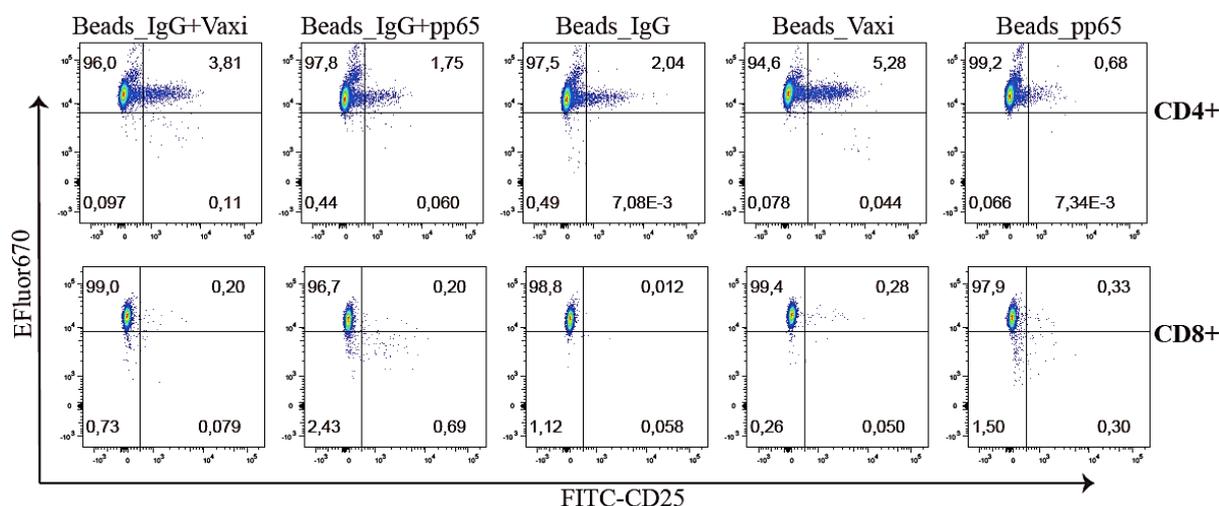


Abbildung 18: T-Lymphozyten Proliferation und Aktivierung für 7 Tage.

PBMCs wurden mit Antigen (Vaxigrip, pp65 und IgG) und Antikörper (IgG) beladenen Beads für 7 Tage bei 37°C im 5% CO₂-Inubator inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt die Oberflächenfärbung. Dargestellt werden Dot-Plot-Diagramme von CD4 und CD8 positiven T-Zellen. Die Achsen zeigen PE-CD154 gegen PE-Cy7-CD137. Die Auswertung mittels FlowJo.

In der Abbildung 18 wird deutlich, dass Beads, die mit anti-IgG zusammen mit Vaxigrip oder pp65 beschichtet sind, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktivieren (beides gemessen als % EFluor670-negativer/CD25⁺ Zellen). Beads, die mit anti-IgG und Vaxigrip bzw. pp65 beschichtet waren, führten zu 0,11% bzw. 0,06% aktivierten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu 0,007% im Kontrollansatz ohne Antigen. In den gleichen Ansätzen fanden sich 0,08% bzw. 0,69% aktivierte CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu 0,06% im Kontrollansatz ohne Antigen. In diesem Versuch zeigte sich ein leichter Vorteil der zusätzlichen Beschichtung der Beads mit anti-IgG gegenüber der Kopplung des Antigens alleine. Beads mit anti-IgG/Vaxigrip stimulierten 0,11% der CD4⁺ und 0,08% der CD8⁺ Zellen im Vergleich zu 0,04% der CD4⁺ und 0,05% der CD8⁺ Zellen bei Beads mit Vaxigrip alleine. Ähnlich stimulierten Beads mit anti-IgG/pp65 0,06% der CD4⁺ und 0,69% der CD8⁺ Zellen im Vergleich zu 0,007% der CD4⁺ und 0,30% der CD8⁺ Zellen bei Beads mit pp65 alleine.

4.3.5. Gezielte Reifung und Antigenaufnahme von B-Lymphozyten und anschließende *in vitro* T-Zell-Stimulation

Die vorherigen Versuche hatten gezeigt, dass die zusätzliche Beladung von Beads mit einem Antikörper gegen den BZR keinen deutlichen Vorteil gegenüber der Beladung der Beads mit dem Antigen alleine brachte. Vermutlich wurden die Beads nicht präferentiell von B-Zellen aufgenommen. Um gezielt zu untersuchen, ob anti-IgG-beschichtete Beads in der Lage sind Antigene in die B-Zellen einzuschleusen, wurden die B-Zellen über CD19-PluriBeads aus PBMCs aufgereinigt (3.2.7.) und über Nacht mit den beschichteten Beads inkubiert. Während dieser Phase wurden die B-Zellen einem zusätzlichen Reifungsschritt mit rhCD154 und IL-4 unterzogen (3.4.2.). Anschließend wurden sie für 7 Tage mit EFluor670 markierten T-Zellen aus der Durchlauf-Fraktion der B-Zell-Aufreinigung ko-kultiviert.

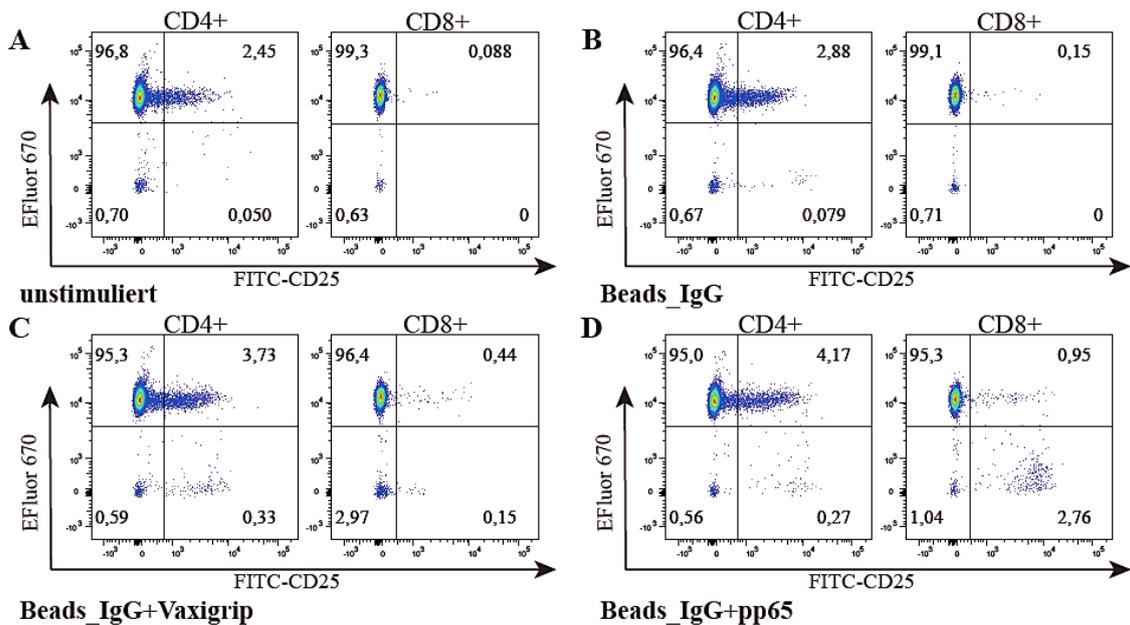


Abbildung 19: Aktivierter T-Lymphozyten nach Stimulation durch Antigen-spezifische B-Zellen

Dargestellt sind Dot-Plot-Diagrammen von CD4 und CD8 positiven T-Zellen. Aufgetragen sind EFluor670 gegen FITC-CD25. B-Zellen wurden über CD19 Pluribeads aus PBMCs aufgereinigt. Die Durchfluss-Fraktion mit den T-Zellen wurde mit EFluor670 markiert. Die aufgereinigten B-Zellen wurden 18 h in Gegenwart von rhCD154 und IL-4 mit Beads inkubiert, die mit den angegebenen Kombinationen von anti-IgG und Antigen beschichtet waren, und anschließend für weitere 7 Tage in Gegenwart von rhCD154 und IL-4 mit den T-Zellen ko-kultiviert, bevor sie angefärbt und am Durchflusszytometer analysiert wurden. Gezeigt werden Proben die unstimuliert waren (A) oder mit Beads stimuliert wurden, die mit anti-IgG alleine (B), anti-IgG und Vaxigrip (C), oder anti-IgG und pp65 (D) beschichtet waren.

Stimulierte Zellen zeichnen sich durch Expression von CD25 und Verlust von EFluor670 aus, und sind in Dot-Plots jeweils im rechten unteren Quadranten der Abbildung 19 zu sehen. In der unstimulierten Probe waren 0,05% der CD4⁺ T-Zellen und 0% der CD8⁺ T-Zellen proliferiert (Abb. 19.A.). In der Probe, welche nur mit anti-IgG beladenen Beads behandelt wurde, waren 0,08% der CD4⁺ T-Zellen und 0% der CD8⁺ T-Zellen proliferiert (Abb. 19.B.). Dagegen waren in den Proben, bei denen die Beads zusätzlich zu anti-IgG auch mit spezifischen Antigenen gekoppelt worden waren, mehr Zellen proliferiert. Bei der Probe mit Vaxigrip waren es 0,33% der CD4⁺ T-Zellen und 0,15% der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 19.C.) bei der Probe mit pp65-Protein 0,27% der CD4⁺ T-Zellen und 2,76% der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 20.D.)

In den Versuchen des Ergebnisteils 4.3. konnte gezeigt werden, dass die gezielte Internalisierung von Antigenen in B-Zellen möglich ist. Wie in dem Versuch 4.3.1 dargestellt, werden die verwendeten Beads abhängig von der Kopplung in die Zellen aufgenommen. Die aufgereinigten B-Zellen haben vor allem Beads aufgenommen, welche Antikörper gegen IgM und CD21 auf der Oberfläche tragen. IgM-beschichtete Bead waren in 2,04% der B-Zellen enthalten. Beads, welche zum Beispiel CD4 auf der Oberfläche hatten, wurden von 0,12% von den B-Zellen aufgenommen. Weitere Versuche zeigten, dass Antigen-beschichtete Beads zwar

grundsätzlich als Vehikel zur Einführung von Antigenen in einen Stimulationsansatz geeignet sind, dass aber die zusätzliche Beschichtung mit anti-BZR-Antikörpern keinen Vorteil bringt, wenn die Beads direkt in den Stimulationsansatz eingebracht werden. Im Versuch 4.3.5 wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Antigen-beschichteten Beads in vorher aufgereinigte B-Zellen einen potenten Mechanismus darstellt, um Antigene in naive (IgM) oder Memory (IgG) B-Zellen einzuführen.

4.4. Anreicherung und Analyse spezifisch aktivierter T-Lymphozyten

In diesem Versuchsabschnitt wurden die aktivierten T-Lymphozyten anhand ihrer Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137 mit Hilfe von magnetischen Beads aus Vollblut oder PBMCs aufgereinigt. Die Proben wurden hierfür mit zwei Modell-Antigenen, dem Impfstoff Repevax und dem CMV Protein pp65, stimuliert. Dies führte zur erhöhten Expression von CD154 und CD137 auf der Zelloberfläche von T-Zellen. Nach der Inkubation wurden die Zellen gefärbt und anschließend aufgereinigt. Nach der Zellseparation wurden die Proben erneut gefärbt, um die Charakterisierung der aktivierten Zellen zu ermöglichen.

4.4.1. Stimulation und Aufreinigung von antigenspezifischen T-Lymphozyten aus PBMCs

In diesem Versuch wurden PBMCs mit pp65 Protein und Cytostim für 16 Stunden inkubiert (3.4.4.). Danach erfolgten die Oberflächenfärbung mit dem PE-markierten Antikörper gegen CD154 und die Aufreinigung der aktivierten T-Zellen mit Hilfe PE-spezifischer magnetischer Beads (3.6.). Zur Auswertung wurde der Aktivierungsmarker CD154, welcher auch zur Aufreinigung diente, verwendet (3.5.1.).

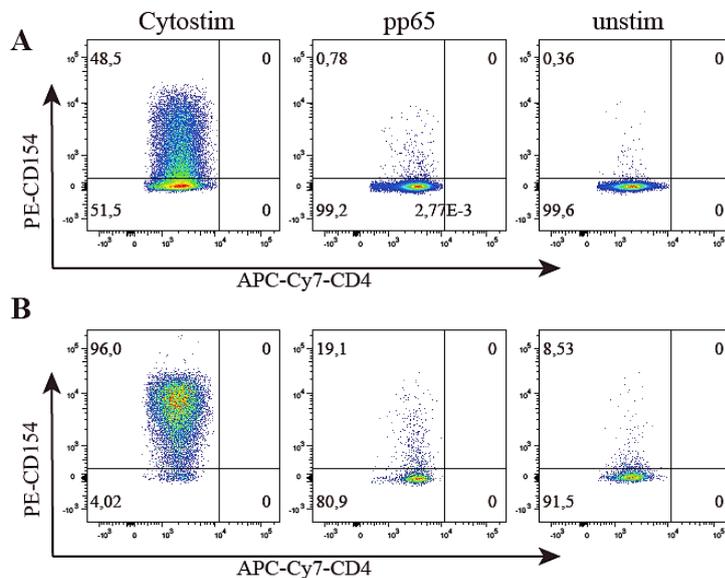


Abbildung 20: Aufgereinigte antigenspezifische T-Zellen.

PBMCs wurden mit dem Antigen pp65 oder Cytostim versetzt und für 16 Stunden bei 37°C im 5% CO₂ Brutschrank inkubiert, angefärbt, aufgereinigt und am FACS analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo. Aufgetragen sind CD154 gegen CD4 in Dot-Plot-Diagrammen. Gezeigt werden CD4⁺ T-Zellen vor (A) und nach (B) der Aufreinigung.

Die Proben wurden vor und nach der Anreicherung im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 21). In dem mit Cytostim stimulierten Ansatz stieg der Anteil CD154-exprimierender CD4⁺ T-Zellen von 48,5% vor der Aufreinigung auf 96% nach der Aufreinigung. In dem mit pp65 stimulierten Ansatz stieg der Anteil CD154-exprimierender CD4⁺ T-Zellen durch die Aufreinigung von 0,78% auf 19,1%. Bei der unstimulierten Probe sind vor der Aufreinigung 0,36% der CD4 T-Zellen CD154⁺. Nach der Aufreinigung sind es 8,53% der CD4 T-Zellen.

4.4.2. Aufreinigung mittels EasySep von antigenspezifischen T-Lymphozyten

Wie der vorherige Versuch (4.4.1.) diente dieser Versuch zum Nachweis der Antigen-spezifischen T-Lymphozyten Stimulation sowie der anschließenden Aufreinigung der aktivierten Zellen. Im Unterschied zum vorigen Versuch wurde diesmal heparinisieretes Vollblut als Quelle der T-Zellen verwendet. Ebenfalls im Unterschied zum vorigen Versuch wurden die Zellen, die nach der Stimulation CD137-positiv wurden, mit aufgereinigt. CD137 wurde durch einen mit dem Farbstoff PE-Cy7 markierten Antikörper angefärbt, welcher von den PE-spezifischen magnetischen Beads erkannt wird. Das Vollblut wurde mit CMV-Peptid, Repevax und Cytostim für 16 Stunden inkubiert (3.4.4.). Nach der Inkubation erfolgte die Oberflächenfärbung und die Aufreinigung der aktivierten T-Zellen mit Hilfe magnetischer Beads (3.6.). Zur Auswertung wurden die Aktivierungsmarker CD154 und CD137, welche auch zur Aufreinigung dienten, verwendet (3.5.1.).

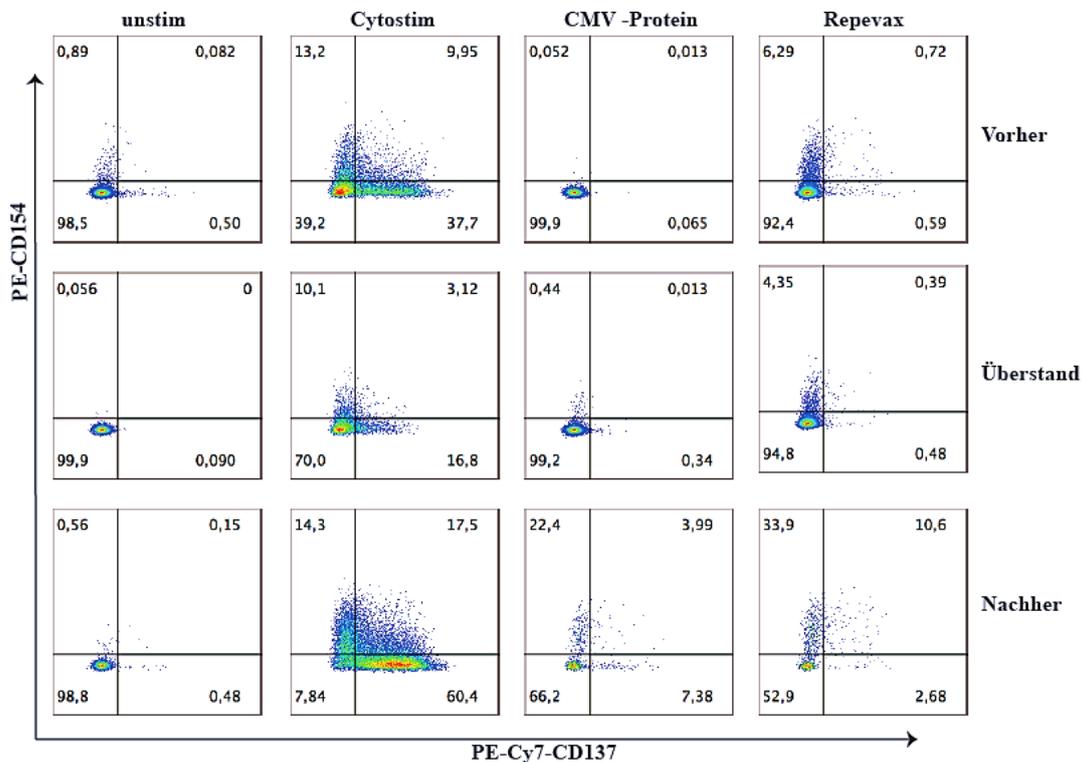


Abbildung 21: Aufgereinigte CD4 positive antigenspezifische T-Zellen.

Vollblut wurde mit CMV-Protein und dem Impfstoff Repevax 16 Stunden bei 37°C im 5% CO2 Brutschrank inkubiert. Mitgeführt wurde Cytostim als Positivkontrolle und eine unstimulierte Probe. Nach der Inkubation erfolgt die Oberflächenfärbung, Zellseparation mit magnetischen Beads und Auswertung mittels FlowJo. Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme von CD4 positiven T-Zellen.

Die Abbildung 21 stellt die Ergebnisse für die CD4 positiven Zellen dar. Hierbei wurden die Zellen vor und nach der Aufreinigung gemessen. Zur Kontrolle wurden die Zellen im Überstand, die nicht an die magnetischen Beads gebunden hatten, analysiert. In der Probe mit den polyklonal stimulierten Zellen stieg der Anteil an CD154, sowie CD137 positiven Zellen

von 13,2% und 37,7% vor der Aufreinigung auf 14,3% und 60,4% nach der Aufreinigung an. In dem Überstand sind 10,1% CD154 und 16,8% CD137 positive Zellen zu finden. In den Proben mit CMV-Protein erhöhte sich der Anteil CD154 positiver CD4⁺ Zellen von 0,052% vor der Zellseparation auf 22,4% nach der Separation. Des Weiteren stieg der Anteil an CD137⁺ Zellen von 0,065% auf 7,38%. Im Überstand sind mit 0,44% CD154 und 0,34% CD137 kaum aktivierte Zellen enthalten. Die Aufreinigung der mit dem Impfstoff Repevax stimulierten Probe erzielte eine vergleichbare Aufreinigung wie die Zellen mit CMV-Protein Probe. Hierbei wurden aus 6,29% CD154⁺ und 0,59% CD137⁺ vor der Aufreinigung und 33,9% CD154⁺ und 2,68% CD137 nach der Aufreinigung detektiert. In dem Überstand sind 4,35% der CD4 Zellen CD154 positiv.

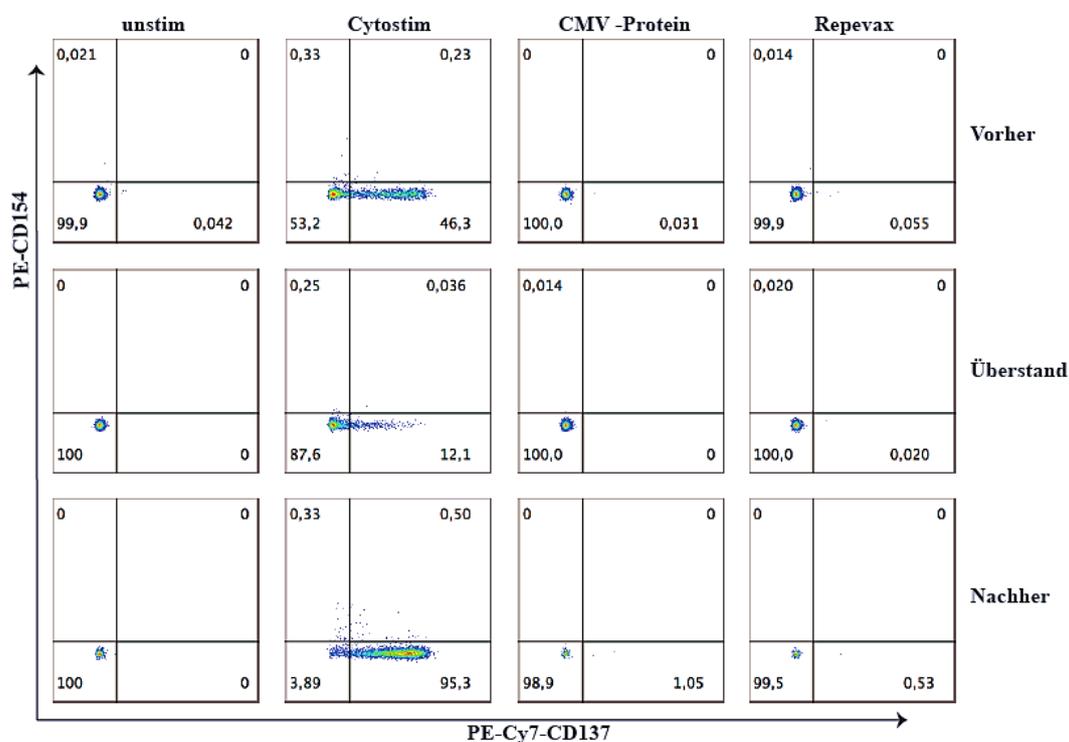


Abbildung 22: Aufgereinigte CD8 positive antigenspezifische T-Zellen.

Vollblut wurde mit CMV-Protein und dem Impfstoff Repevax 16 Stunden bei 37°C im 5% CO₂ Brutschrank inkubiert. Mitgeführt wurde Cytostim als Positivkontrolle und eine unstimulierte Probe. Nach der Inkubation erfolgte die Oberflächenfärbung, Zellseparation und Auswertung mittels FlowJo. Dargestellt sind Dot-Plot-Diagramme von CD8 positiven T-Zellen.

In der Abbildung 22 werden die CD8 positiven Zellen dargestellt. Unstimulierte Zellen zeigten mit unter 1% kaum eine Expression der Aktivierungsmarker. Dementsprechend konnten diese nach der Aufreinigung nicht detektiert werden. Die mit Cytostim stimulierte Probe hatte vor der Aufreinigung 46,3% CD154⁺ Zellen. Nach der Aufreinigung waren es 95,3%. Die Proben mit CMV-Protein sowie mit Repevax hatten vor der Aufreinigung unter 1% aktivierter CD8⁺ T-Zellen. Dies führte dazu, dass diese Proben nur geringfügig aufgereinigt werden konnte.

In dem Versuchsabschnitt 4.4. konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten aus Vollblut Proben aktiviert werden können, und dass die aktivierten T-Zellen mit Hilfe von CD154- und CD137-spezifischen Antikörpern aufgereinigt werden können. Diese Anreicherung der aktivierten Zellen bietet die Möglichkeit, die aktivierten Zellen auch für andere Oberflächenmarker anzufärben und so ein besseres Bild der Eigenschaften der durch das jeweilige Antigen aktivierten Zellpopulation zu gewinnen.

5. Diskussion

Durch die MHC-II-Moleküle sind B-Zellen in der Lage T-Helfer-Zellen zu aktivieren. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt um B-Zellen unter Verwendung von fluoreszierenden Beads, die mit spezifischen Antigenen beladen sind, unabhängig von ihrer Antigen-spezifität zur Präsentation dieser Antigene zu bringen. Diese Methode liefert die Grundlagen für die Untersuchung der Funktionalität menschlicher B-Zellen als APZ sowie zu ihrer Nutzung zur Untersuchung Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert. Anschließend werden die Erkenntnisse im Fazit zusammengefasst.

5.1. *In vitro* B-Lymphozyten-Reifung

Die Reifung der B-Zellen wurde über mehrere Tage verfolgt, um die Stadien und Expression der Oberflächenmoleküle in ihrer Komplexität zu erschließen. Damit B-Zellen in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren müssen diese über bestimmte Merkmale verfügen. Neben der bloßen Präsentation von Antigen auf MHC-Molekülen müssen APZ auch ko-stimulatorische Signale vermitteln. Dazu müssen die Liganden CD80 und CD86 exprimiert werden, die auf ruhenden B-Zellen nicht vorhanden sind und welche an CD28 auf der T-Zell-Oberfläche binden. Die Antigene gelangen über den BZR in die Zelle, werden dort prozessiert und über das MHC-II Molekül auf der Oberfläche präsentiert. Beim Menschen werden diese MHC Moleküle als HLA-System bezeichnet, ein Vertreter der MHC II Moleküle ist HLA-DR. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Reifung von B-Zellen zu APZ durch *in vitro* Kultur über mehrere Tage untersucht. Dafür wurde das für das Überleben von B-Zellen notwendige CD154 auf zwei verschiedene Weisen zur Verfügung gestellt. Zum einen wurden B-Zellen auf HEK-Zellen, die stabil mit CD154 transfiziert waren, kultiviert, zum anderen wurde den Kulturen rekombinantes humanes CD154 (rhCD154) hinzugefügt. Dieses Verfahren keine Nachteile gegenüber der Kultur auf HEK-CD154 Um die HEK-CD154 Zellen an der Proliferation während der mehrtägigen Kulturphase zu hindern, wurden sie bestrahlt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Intensität der Bestrahlung einen deutlichen Einfluss auf die Reifung der B-Zellen ausübte. Da die Versuche mit

In Abbildung 11 ist die Reifung der B-Zellen dargestellt. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Beads, die mit einem Antikörper gegen IgG beschichtet waren, mit der Reifung der B-Zellen gekoppelt ist. Am vierten Tag hatten 32,6% der B-Zellen Beads aufgenommen. Die Zellen die Beads aufgenommen hatten, exprimierten auf ihrer Oberfläche mehr HLA-DR Moleküle und CD86 im Vergleich zu B-Zellen, welche keine Beads aufgenommen haben. Die Beads waren in diesem Versuch gezielt gegen den BZR des IgG-

Typs gerichtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen die Beads aufgenommen haben vermehrt IgD exprimieren und die CD21 Expression ist zurückgegangen. Naive B-Zellen tragen IgD BZR. Durch die Beschichtung der Beads mit anti-IgG sollten diese vor allem durch Memory-B-Zellen aufgenommen werden. In Abbildung 11 wird jedoch deutlich, dass die Beads vermehrt von IgD positiven B-Zellen aufgenommen wurden. In diesem Versuch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die IgG Beschichtung der Beads nach einigen Tagen Inkubation verworfen wurde und die Beads somit unabhängig von der Beschichtung von den B-Zellen internalisiert wurden. Jedoch ist nach 24 stündiger Inkubation mit den Spherotech Beads zu erkennen, dass IgD positive Zellen B-Zellen Beads aufgenommen haben. Mit fortschreitender Inkubation, vor allem an Tag 4, sind im Gesamtverhältnis zur Anfangspopulation mehr naive B-Zellen vorhanden. Weitere Untersuchungen, vor allem mit vorher aufgereinigten naiven oder Memory B-Zellen sind notwendig, um diese Frage zu klären.

5.2. Antigenpräsentation: *In vitro* Stimulation von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten

Das Ziel des Versuchsabschnittes 4.2 war es, das Potential von B-Zellen als Vehikel zur Antigen-spezifischen Stimulation von T-Zellen zu untersuchen. Zur Beurteilung ihrer Funktion werden T-Zellen meist polyklonal stimuliert durch Reagenzien, die direkt den TZR vernetzen oder TZR-abhängige Signalwege in der Zelle anschalten. Dies ist technisch einfacher und kostengünstiger, erlaubt aber keine Aussagen über die Interaktion von T-Zellen und APZ. Die Darstellung antigen-spezifischer T-Zell-Antworten ist wegen der geringen Häufigkeit antigen-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut schwierig und kostenintensiv, und wird daher eher von spezialisierten Laboratorien durchgeführt [46]

In den Versuchen in Abschnitt 4.2. wird deutlich, dass sich Antigen-spezifische Antworten nur dann darstellen lassen, wenn der Hintergrund an unspezifischer T-Zell-Aktivierung gering ist. Dabei wurde deutlich, dass die unspezifisch Aktivierung von T-Zellen in den unstimulierten Ansätzen oftmals von den Antigen-spezifischen Immunantworten nicht zu unterscheiden ist. Dies ist in Abbildung 14 dargestellt. Hierbei liegt die antigenspezifische Aktivierung von CD154 mit Vaxigrip bei 0,33% und mit pp65 Protein bei 0,37% auf den CD4 positiven Zellen. Die unstimulierte Probe liegt mit 0,27% nur geringfügig darunter. Eine erhöhte unspezifische Aktivierung ist auch bei CD137 zu erkennen (Abb.14). Hier liegt der mit pp65 stimulierte Ansatz mit 0,16% CD137 Expression auf CD4 T-Zellen unter dem Wert für den unstimulierten Ansatz (0,19%). Bei dem vergleichsweisen hohen Hintergrund bei den unstimulierten Zellen ließ sich also eine antigenspezifische Aktivierung weder durch den Vaxigrip Impfstoff noch

durch das CMV pp65 Protein sicher nachweisen. Dagegen ist bei den CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit pp65 eine Vermehrung der CD137⁺ Zellen im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (1,11% gegenüber 0,22%) zu beobachten.

Die verwendeten PBMCs wurden in diesem Versuch eingefroren und wieder aufgetaut. Dieses Verfahren kann zur Voraktivierung der Zellen führen. Zudem wurden die T-Zellen durch Positivselektion aufgereinigt. Hierbei werden Antikörper gegen CD2 eingesetzt, die alleine nicht zu einer vollen T-Zell-Aktivierung führen, aber zu einer Voraktivierung beitragen können. Ein weiterer Grund mag darin liegen, dass für das Kulturmedium bei diesen Versuchen tierisches Serum (fötale Kälberserum) als Quelle von Wachstumsfaktoren verwendet wurde. Es ist möglich, dass die in diesem Serum enthaltenen Fremdproteine auch mit zur unspezifischen Stimulation beitragen. Ein wichtiges Ziel zukünftiger Versuche wird sein, Methoden zu etablieren, bei denen der unspezifische Hintergrund gezielt klein gehalten werden kann [46]

In dem Versuchsabschnitt 4.2 wurden zwei Verfahren für die *in vitro* T-Zell-Stimulation, die Kurzzeit- und Langzeit-Stimulation der T-Zellen, verwendet. Bei dem Langzeitverfahren werden T-Zellen aus Vollblut aufgereinigt und mit dem Farbstoff EFluor670 markiert und anschließend 7 Tage inkubiert. Dieser Farbstoff wird bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, so dass sich die Farbstoffmenge pro Zelle mit jeder Zellteilung halbiert. In einigen Versuchen wurden die B-Zellen getrennt aufgereinigt und als APZ zu den mit EFluor670 gefärbten T-Zellen dazu gegeben. In diesen Langzeit-Stimulationen wurden als Indikatoren für die Aktivierung die Proliferation der T-Zellen (gemessen als Verlust der EFluor670-Fluoreszenz) und die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 verwendet.

In Abbildungen 12 und 13 konnten Erkenntnisse über die Rolle von APZ bei der T-Zell-Aktivierung gewonnen werden. Wie in 1.6 beschrieben ist die Positivkontrolle Cytostim abhängig von der Gegenwart von APZ. So führte die Stimulation mit Cytostim bei dem Kombinationsansatz aus B- und T-Zellen zu einer erhöhten T-Zell-Aktivierung (93,5% der CD4⁺ und 82,3% der CD8⁺ T-Zellen waren CD25⁺/Efluor⁻). Ebenfalls führte die Stimulation der aufgereinigten T-Zellen, die keine APZ enthalten sollten, zu einer Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 13A und B). Ein möglicher Grund ist, dass die T-Zellen nicht von allen APZ getrennt werden konnten. Es konnte zwar gezeigt werden, dass kaum noch B-Zellen in der Probe vorhanden waren (0,82% der CD4/CD8-doppelnegativen Zellen), es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass andere APZ wie Monozyten und dendritische Zellen noch enthalten sind. Darüber hinaus kann die Positivselektion mit anti-CD2-AK zu einer

„Vorstimulierung“ der Zellen führen, die eine Aktivierung durch Cytostim auch in Abwesenheit von APZ ermöglicht. Des Weiteren können einige T-Zellen in der Probe das MHC-II Molekül HLA-DR exprimieren und dadurch funktionell zu APZ werden. Dies muss in zukünftigen Versuchen geklärt werden. Obwohl die aufgereinigten T-Zellen und die T-Zell/B-Zell-Kombination nach Stimulation durch Cytostim ähnlich stark proliferiert sind, war doch ein Unterschied in der Expression von CD25 (dem hochaffinen IL-2-Rezeptor) zu sehen, der darauf hindeutet, dass in der Präparation mit den aufgereinigten T-Zellen die Aktivierung unvollständig im Vergleich zu der Probe mit den B-Zellen als APZ war. Dies bestätigt die Fähigkeit von B-Zellen, als vollwertige APZ zu fungieren und wirft Fragen auf über die Signalwege, die in T-Zellen durch Cytostim in der Abwesenheit von APZ ausgelöst werden.

5.3. Targeting von B-Lymphozyten: gezieltes Einschleusen von Antigenen in den Prozessierungs- und Präsentationsweg von B-Lymphozyten

Die gezielte Einschleusung von Antigenen in B-Zellen zum Zweck der Antigenpräsentation wurde in diesem Versuchsabschnitt untersucht. Der in Abbildung 15 dargestellte Versuch belegt, dass die Beladung der Beads mit Antikörpern gegen Oberflächenproteinen von B-Zellen (BZR und CD21) zu einer Aufnahme der Beads durch B-Zellen führt.

Da B-Zellen Antigene, die sie später präsentieren werden, über ihren BZR aufnehmen, war es das Ziel dieser Versuche, durch Beschichtung der Beads mit Antikörpern gegen den BZR eine gezielte Aufnahme über diesen Rezeptor zu vermitteln. Das auf der Oberfläche der Beads sitzende spezifische Antigen sollte durch die Internalisierung des Beads mit in den Signalweg der Antigenprozessierung und –präsentation eingeschleust werden. In den folgenden Versuchen wurden solche Beads, die sowohl mit spezifischem Antigen als auch mit anti-BZR Antikörpern beschichtet waren, zu PBMC-Proben gegeben. Somit sollten Antigene durch die anti-BZR-Antikörper präferentiell aufgenommen und präsentiert werden [50]. Die Versuche in Abb. 17 und Abb. 18 belegen, dass die Beads von APZ aufgenommen und die Antigene präsentiert wurden, dies jedoch nicht durch B-Zellen geschah. In den Abbildungen konnte durch die Beschichtung mit anti-BZR-Antikörpern kein Vorteil in Bezug auf die Effizienz der Antigenpräsentation festgestellt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Beads von professionellen Phagozyten wie Monozyten oder dendritischen Zellen aufgenommen wurden, ehe sie eine Möglichkeit hatten, an B-Zellen zu binden [6]. Es ist auch möglich, dass die Beads zwar von B-Zellen aufgenommen wurden, diese aber als APZ keine Bedeutung hatten, da sie noch nicht ausreichend zur Antigenpräsentation ausgereift waren.

Um diese Probleme zu umgehen wurden in einem folgenden Versuch (4.3.5.) die mit Antigen und anti-BZR-Antikörpern beschichteten Beads gezielt zu aufgereinigten B-Zellen gegeben, deren Reifung zu APZ noch zusätzlich durch Zugabe von CD154 und IL-4 unterstützt wurde. Die so behandelten B-Zellen waren in der Lage, nach 7-tägiger Ko-Inkubation mit EFluor670-markierten T-Zellen eine deutliche Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen zu bewirken (Abb. 19). B-Zellen, die entweder keine Beads oder nur mit anti-IgG beladene Beads inkubiert wurden, bewirkten nur eine geringfügige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und keine von CD8⁺ T-Zellen (Abb. 19A und B). Dagegen vermittelten B-Zellen, die mit Beads mit Vaxigrip oder pp65 in Verbindung mit anti-IgG-Antikörpern inkubiert worden waren eine deutliche Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, und eine stärkere Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen. Insbesondere die Stimulation mit pp65/anti-IgG Beads führte zu einem Anteil von 2,76% aktivierter Zellen im Vergleich zu 0% in der Kontrolle.

Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da das pp65 den APZ als intaktes Protein aus dem extrazellulären Milieu angeboten wurde, welches aufgenommen und prozessiert werden muss, ehe es auf MHC-Molekülen präsentiert wird [49]. Bereits in dem in Abb. 14 gezeigten Versuch ist aufgefallen, dass die Zugabe von löslichem pp65 Protein vor allem zu einer Stimulation von CD8⁺ T-Zellen führte (Abbildung 14B). Der natürliche Prozessierungsweg für extrazelluläre Antigene führt zur Präsentation auf MHC II-Molekülen und der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. Damit CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden können, muss das Protein von den APZ in den MHC I-Prozessierungsweg eingeschleust worden sein. Dieser Vorgang wird als „cross-presentation“ bezeichnet, und kann nicht von allen APZ durchgeführt werden. Da in dem in Abb. 14 gezeigten Versuch sowohl B-Zellen als auch Monozyten in der Nicht-T-Zell-Fraktion als potenzielle APZ vorhanden waren, bleibt es zunächst offen, welche Art von APZ in diesem Fall die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen vermittelt hat. Die Ergebnisse in Abb. 19, in dem pp65 Protein über Beads gezielt in aufgereinigte B-Zellen eingeschleust wurde, belegen eindrücklich, dass B-Zellen auch mit hoher Effizienz zur „cross-presentation“ in der Lage sind [49, 48].

6. Fazit und Ausblick

Das Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines Ansatzes zur Untersuchung der Fähigkeit von B-Zellen zur Antigenpräsentation, und die Nutzung dieses Ansatzes zur direkten Detektion von menschlichen Memory-T-Zellen mit definierter Antigenpezifität. Solche Zellen sind im peripheren Blut in sehr niedrigen Frequenzen vorhanden.

Dazu wurden B-Zellen aus menschlichem Vollblut oder Leukozytenkonzentraten aufgereinigt, und in Gegenwart von T-Zellen entweder mit spezifischen Antigenen (Vaxigrip und pp65) oder als Positivkontrolle mit dem APZ-abhängigen polyklonalen T-Zell-Aktivator Cytostim versetzt. Um die T-Zell-Antigene in die Antigenprozessierungs- und Präsentations-Maschinerie der B-Zellen einzuschleusen, wurden die Antigene auf kleine Latexkügelchen (Beads) adsorbiert, die zusätzlich mit Antikörpern gegen den BZR beschichtet waren. Es konnte nachgewiesen werden, dass B-Zellen mit anti-BZR-Antikörper beschichteten Beads wechselwirkten, jedoch nicht mit Beads, die nicht mit einem solchen Antikörper beschichtet waren.

Die erarbeitete Methode kann unter anderem verwendet werden, um neue diagnostische Tests zu entwickeln, die eine Beurteilung der Fähigkeit von B-Zellen, Antigene zu präsentieren, erlauben. Des Weiteren kann diese Methode genutzt werden, um die seltenen T-Zellen, die für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind, zu identifizieren. Dadurch kann zum einen die Häufigkeit der für ein bestimmtes Antigen spezifischen T-Zellen innerhalb des im Blut zirkulierenden peripheren T-Zell-Pools festgestellt werden. Zum anderen wurde eine Methode entwickelt, um diese Zellen nach ihrer Aktivierung anzureichern und einer weitergehenden Analyse in Bezug auf ihre Oberflächenmarker zugänglich zu machen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des in dieser Arbeit entwickelten Ansatzes ist es, den Verlauf antigenspezifischer T-Zell-Antworten z.B. nach Impfungen oder im Verlauf von viralen Infektionserkrankungen, zu verfolgen.

Als ferne Perspektive kann dieser Ansatz therapeutische Anwendung, z.B. in der Tumorthherapie finden. Vorstellbar wäre etwa die Beladung von B-Zellen mit Tumorantigenen, um sie als APZ zur Verstärkung tumorspezifischer T-Zell-Antworten zu verwenden.

7. Danksagung

Diesen Teil meiner Arbeit möchte ich all den Menschen in meinem Leben widmen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit oder in meinem Studium fachlich und persönlich unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Haag bedanken. Ich bin dankbar für die Möglichkeit meine Arbeit in dem Institut für Immunologie absolvieren zu dürfen. Die außerordentliche Unterstützung bei der Fertigung, sowie die umfassende freundliche Betreuung während der gesamten Durchführung der Arbeit sind nicht selbstverständlich und dafür bin ich sehr dankbar. Des Weiteren möchte ich mich bei meiner zweiten Gutachterin, Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen, bedanken, die sich die Zeit genommen hat meine Arbeit zu lesen und zu bewerten.

Ich möchte mich zudem für die sehr gute Zusammenarbeit bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie am UKE bedanken. Während meiner Arbeit am Institut wurde ich von Anfang an mit offenen Armen empfangen. Mein besonderer Dank gilt den Kollegen, die mir ein zu Hause im Labor gegeben haben. Dafür möchte ich mich besonders bei Gudrun Dubberke, Klaus Kaschubowski, Sana Javed und Birte Albrecht bedanken. Vor allem Klaus stand mir während der Erstellung meiner Arbeit immer mit Rat zur Seite. Mein außerordentlicher Dank geht auch an Gudrun, die mir während der gesamten Zeit immer mit viel Geduld und Freundlichkeit geholfen hat. Meine anderen Kollegen im Institut möchte ich danken, dass sie stets meine Pausen mit erheiternden Geschichten versüßt haben.

Ich möchte mich besonders bei meiner Familie bedanken. Vor allem meine Eltern, Lucia Barry de Wittke und Thomas Wittke, sowie meiner Schwester Katherina Wittke haben mich immer unterstützt und meine Leistungen gefördert. Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Kevin Burmester bedanken, der immer Verständnis für mich hatte und auch in stressigen Zeiten immer die richtigen Worte zur Aufmunterung gefunden hat.

Die erfolgreiche Fertigstellung meiner Arbeit wäre ohne diese Menschen in meinem Leben nicht möglich gewesen. Ich bin froh, dass sie ein Teil meine Reise waren und mir vieles erleichtert haben.

Ich danke euch allen von ganzem Herzen.

8. Literaturverzeichnis

1. Christine Schütt, Barbara Bröker: Grundlagen der Immunologie, 3. Auflage 2011, Was gehört zum Immunsystem: Zellen und Organe des Immunsystems, S. 2-4
2. Yatim, Karim M.; Lakkis, Fadi G. (2015): A Brief Journey through the Immune System. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 10 (7), S. 1274–1281.
3. Antonio Pezzutto, Timo Ulrichs, Gerd-Rüdiger Burmester: Taschenatlas der Immunologie, 2. Auflage 2007. T-Zell-Aktivierung, S.19, zuletzt geprüft am 12.01.2018
4. Chen, Xinjian; Jensen, Peter E. (2008): The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. In: *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 56 (2), S. 77–83.
5. Guermontprez, Pierre; Valladeau, Jenny; Zitvogel, Laurence; Théry, Clotilde; Amigorena, Sebastian (2002): Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. In: *Annual review of immunology* 20, S. 621–667.
6. Aderem, A.; Underhill, D. M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. In: *Annual review of immunology* 17, S. 593–623.
7. Trombetta, E. Sergio; Mellman, Ira (2005): Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. In: *Annual review of immunology* 23, S. 975–1028.
8. Germain, R. N. (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. In: *Cell* 76 (2), S. 287–299.
9. Plüger, Esther B. E.; Boes, Marianne; Alfonso, Christopher; Schröter, Christian J.; Kalbacher, Hubert; Ploegh, Hidde L.; Driessen, Christoph (2002): Specific role for cathepsin S in the generation of antigenic peptides in vivo. In: *European journal of immunology* 32 (2), S. 467–476.
10. Villadangos, J. A. (2001): Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. In: *Molecular immunology* 38 (5), S. 329–346.
11. Williams, A.; Peh, C. A.; Elliott, T. (2002): The cell biology of MHC class I antigen presentation. In: *Tissue antigens* 59 (1), S. 3–17.

12. Hsieh, Chyi-Song; deRoos, Paul; Honey, Karen; Beers, Courtney; Rudensky, Alexander Y. (2002): A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (6), S. 2618–2625.
13. Mellins, Elizabeth D.; Stern, Lawrence J. (2014): HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. In: *Current opinion in immunology* 26, S. 115–122.
14. Brocke, Pascale; Garbi, Natalio; Momburg, Frank; Hämmerling, Günter J. (2002): HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. In: *Current opinion in immunology* 14 (1), S. 22–29.
15. Garcia, K. Christopher; Adams, Erin J. (2005): How the T cell receptor sees antigen--a structural view. In: *Cell* 122 (3), S. 333–336.
16. Seder, Robert A.; Ahmed, Rafi (2003): Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. In: *Nature immunology* 4 (9), S. 835–842.
17. Suvas, Susmit; Singh, Vinod; Sahdev, Sudhir; Vohra, Harpreet; Agrewala, Javed N. (2002): Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (10), S. 7766–7775.
18. Kin, Nicholas W.; Sanders, Virginia M. (2007): CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (3), S. 1516–1523.
19. Bour-Jordan, Hélène; Blueston, Jeffrey A. (2002): CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. In: *Journal of clinical immunology* 22 (1), S. 1–7.
20. Chen, Lieping; Flies, Dallas B. (2013): Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (4), S. 227–242.
21. Davies, D. R.; Metzger, H. (1983): Structural basis of antibody function. In: *Annual review of immunology* 1, S. 87–117.
22. Mårtensson, Inga-Lill; Almqvist, Nina; Grimsholm, Ola; Bernardi, Angelina I. (2010): The pre-B cell receptor checkpoint. In: *FEBS letters* 584 (12), S. 2572–2579.
23. Mackay, Fabienne; Mackay, Charles R. (2002): The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity. In: *Trends in immunology* 23 (3), S. 113–115.

24. Melchers, Fritz (2015): Checkpoints that control B cell development. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (6), S. 2203–2210.
25. Busslinger, Meinrad (2004): Transcriptional control of early B cell development. In: *Annual review of immunology* 22, S. 55–79.
26. Cornall, R. J.; Goodnow, C. C.; Cyster, J. G. (1995): The regulation of self-reactive B cells. In: *Current opinion in immunology* 7 (6), S. 804–811.
27. Löffert, D.; Ehlich, A.; Müller, W.; Rajewsky, K. (1996): Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. In: *Immunity* 4 (2), S. 133–144.
28. Gray, D.; Siepmann, K.; Wohlleben, G. (1994): CD40 ligation in B cell activation, isotype switching and memory development. In: *Seminars in immunology* 6 (5), S. 303–310.
29. Avery, Danielle T.; Ellyard, Julia I.; Mackay, Fabienne; Corcoran, Lynn M.; Hodgkin, Philip D.; Tangye, Stuart G. (2005): Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (7), S. 4034–4042.
30. Blattner, F. R.; Tucker, P. W. (1984): The molecular biology of immunoglobulin D. In: *Nature* 307 (5950), S. 417–422.
31. Defrance, T.; Vanbervliet, B.; Aubry, J. P.; Takebe, Y.; Arai, N.; Miyajima, A. et al. (1987): B cell growth-promoting activity of recombinant human interleukin 4. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 139 (4), S. 1135–1141.
32. Vijayanand, Pandurangan; Seumois, Grégory; Simpson, Laura J.; Abdul-Wajid, Sarah; Baumjohann, Dirk; Panduro, Marisella et al. (2012): Interleukin-4 production by follicular helper T cells requires the conserved Il4 enhancer hypersensitivity site V. In: *Immunity* 36 (2), S. 175–187.
33. Michel Jourdan, Anouk Caraux, Bernard Klein: Characterization of a Transitional Preplasmablast Population in the Process of Human B Cell to Plasma Cell Differentiation. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 2011)* 187 (8). S. 3931 – 3941.

34. Castle, B. E.; Kishimoto, K.; Stearns, C.; Brown, M. L.; Kehry, M. R. (1993): Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 151 (4), S. 1777–1788.
35. Cohen, L.; Yeshurun, M.; Shpilberg, O.; Ram, R. (2015): Risk factors and prognostic scale for cytomegalovirus (CMV) infection in CMV-seropositive patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society* 17 (4), S. 510–517.
36. Gamadia, Laila E.; Remmerswaal, Ester B. M.; Weel, Jan F.; Bemelman, Frederieke; van Lier, René A. W.; Berge, Ineke J. M. ten (2003): Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. In: *Blood* 101 (7), S. 2686–2692.
37. Liu, Yi-Chang; Lu, Po-Liang; Hsiao, Hui-Hua; Chang, Chao-Sung; Liu, Ta-Chih; Yang, Wen-Chi; Lin, Sheng-Fung (2012): Cytomegalovirus infection and disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: experience in a center with a high seroprevalence of both CMV and hepatitis B virus. In: *Annals of hematology* 91 (4), S. 587–595.
38. Robert Koch-Institut (RKI): Humanes Cytomegalievirus (HCMV) - Stellungnahme 17.03.2017, zuletzt geprüft am 11.03.2018.
39. Roman, Antonio; Manito, Nicolás; Campistol, Josep Maria; Cuervas-Mons, Valentín; Almenar, Luis; Arias, Manuel et al. (2014): The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. In: *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* 28 (2), S. 84–91.
40. Andreasen, S. O.; Christensen, J. E.; Marker, O.; Thomsen, A. R. (2000): Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (7), S. 3689–3697.
41. Bacher, Petra; Scheffold, Alexander (2013): Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. In: *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 83 (8), S. 692–701.
42. Nowak, Anna; Lock, Dominik; Bacher, Petra; Hohnstein, Thordis; Vogt, Katrin; Gottfreund, Judith et al. (2018): CD137+CD154- Expression As a Regulatory T Cell (Treg)-Specific Activation Signature for Identification and Sorting of Stable Human Tregs from In Vitro Expansion Cultures. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 199.

43. Grewal, I. S.; Flavell, R. A. (1998): CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. In: *Annual review of immunology* 16, S. 111–135.
44. Miga, A.; Masters, S.; Gonzalez, M.; Noelle, R. J. (2000): The role of CD40-CD154 interactions in the regulation of cell mediated immunity. In: *Immunological investigations* 29 (2), S. 111–114.
45. Amigorena, Sebastian (2015): Helping the Help for CD8+ T Cell Responses. In: *Cell* 162 (6), S. 1210–1212.
46. Garcia Marquez, Maria Alejandra: Characterization of four functionally distinct human B-cell subsets that are defined by the expression of CD21 and CD86. Dissertation. 2015
47. Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper, Daniel Myrtek: Experimentator-Immunologie, 4. Auflage 2014, Durchflusscytometrie, S. 73-74
48. Ackerman, Anne L.; Cresswell, Peter (2004): Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. In: *Nature immunology* 5 (7), S. 678–684.
49. Joffre, Olivier P.; Segura, Elodie; Savina, Ariel; Amigorena, Sebastian (2012): Cross-presentation by dendritic cells. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (8), S. 557–569.
50. Degauque, Nicolas; Elong Ngono, Annie; Ngono, Annie Elong; Akl, Ahmed; Lepetit, Maud; Crochette, Romain et al. (2013): Characterization of antigen-specific B cells using nominal antigen-coated flow-beads. In: *PloS one* 8 (12), e84273.
51. Franz, Bettina; May, Kenneth F.; Dranoff, Glenn; Wucherpfennig, Kai (2011): Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. In: *Blood* 118 (2), S. 348–357.
52. Kenneth Murphy and Casey Weaver: Janeway's Immunobiology, 9th edition, zuletzt geprüft am 11.03.2018.
53. *Aspergillus fumigatus*: <http://flexikon.doccheck.com/de/>, zuletzt geprüft am 13.12.2017

9. Anhang

9.1. CD-Nomenklatur

CD Antigen	Zelluläre Expression	Molekular Gewicht (kDa)	Funktion	Andere Namen	Familiäre Beziehungen
CD2	T-Zellen, Thymozyten, NK Zellen	45-58	Adhesion von Molekülen, Bindung von CD58 (LFA-3), Bindet Lck intrazelluläre und aktive T-Zellen	T11, LFA-2	Immunglobulin
CD3	Thymozyten, T-Zellen	20-28	Assoziiert mit dem T-Zell-Antigen-Rezeptor.	T3	Immunglobulin
CD4	Thymozyten-Untergruppen, T Zellen und T-Helfer-Zellen, einige NKT-Zellen und Makrophagen	55	Ko-Rezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle. Bindet LCK an Membran	T4, 13TA	Immunglobulin
CD8	Thymozyten-Untergruppen, zytotoxische T-Zellen, einige NKT-Zellen und Makrophagen	32-34	Ko-Rezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle. Bindet LCK an Membran	T8, Ly2, 3	Immunglobulin
CD14	Myelomonozytische Zellen	53-55	Rezeptor für Komplex von Lipopolysaccharid		
CD19	B-Zellen	95	Formt einen Komplex mit CD21 und CD81; Ko-Rezeptor für B-Zellen		Immunglobulin
CD20	B-Zellen	33-37	Oligomer von CD20 können Ca ²⁺ Kanal bilden; mögliche Rolle bei der Regulierung der B-Zell-Aktivierung; In der B-Zell-Reifung und Plasmazellen beteiligt		Enthält 4 Transmembransegmente
CD21	Reife B-Zellen, folliculäre dendritische Zellen	145	Rezeptor für Komplementkomponenten C3d, Epstein-Barr-virus. Mit CD19 und CD81 bildet CD21 einen Ko-Rezeptor für B-Zellen	CR2	Komponent Kontroll protein (CCP)
CD25	Aktivierte T-Zellen, B-Zellen, einige ILCs und Monozyten	55	IL-2 Rezeptor	Tac, IL2RA	CCP

Anhang

CD27	Medulläre Thymozyten, T-Zellen, NK-Zellen und einige B-Zellen	55	Bindet CD70, kann als Ko-Stimulation für T- und B-Zellen fungieren	S152, Tp55, TNFRSF7	TNF Rezeptor
CD28	T-Zell Populationen, aktivierte B-Zellen	44	Aktivierte naive T-Zellen, Rezeptor für Ko-stimulatorische Signale, bindet CD80 und CD86	Tp44	Immunglobulin
CD38	Frühe B- und T-Zellen, aktivierte T-Zellen, Plasma Zellen	45	NAD-Glykohydrolase, erhöht die B-Zell-Proliferation	T10	
CD40	B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, basale Epithel Zellen	48	Bindet CD154 (CD40L); Rezeptor für Ko-stimulatorisches Signal für B-Zellen, fördert Wachstum, Differenzierung und Isotyp-wechsel von B-Zellen; fördert Keimzentraubildung und Bildung von Memory-B-Zellen	TNFRSF5	TNF Rezeptor
CD73	B-Zell-Teilmengen und T-Zell-Teilmengen	69	Ecto-5'-Nukleotidase dephosphoryliert Nukleotide, um die Nukleosidaufnahme zu ermöglichen, Marker für Lymphozytendifferenzierung	NT5E, NT5, NTE	B-Zell-Teilmengen und T-Zell-Teilmengen
CD137	T- und B-Lymphozyten, Monozyten und einige Epithelzellen	28	Co-Stimulation von T-Zellen Poliferation	4-1BB, TNFRSF9	TNF Rezeptor
CD154	Aktivierte CD4 T-Zellen	30	Ligand für CD40, Induziert B-Zellen Poliferation und Aktivierung	CD40L, TRAP, T-BAM, gp39	TNF Rezeptor

9.2. Gefahrenstoffhinweise

Bezeichnung	Gefahrensymbol	Gefahrensätze
Ethanol		H: 225, 319 P: 210, 233, 305+351+338
Trypanblau		H: 350 P: 201, 308+313

H- und P-Sätze

H-Sätze

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H350 Kann Krebs erzeugen.

P-Sätze

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.

P233 Behälter dicht verschlossen halten

P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen: ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen

P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

9.3. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Samantha Wittke, an Eidesstatt, dass die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Charakterisierung von B-Lymphozyten als antigen-präsentierende Zellen für die *in vitro* Stimulation von T-Lymphozyten“, selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist. Alle Inhalte die direkt oder indirekt aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind als solche im Literaturverzeichnis gekennzeichnet. Dies gilt sowohl für den Textinhalt als auch für alle in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen und Skizzen.

Datum, Ort

Unterschrift: Samantha Wittke