

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Immunologie  
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Direktor Prof. Dr. Bernhard Fleischer

## Die systematische Durchführung der Multicolor- Durchflusszytometrie zur T-Zell-Phänotypisierung mit kritischer Betrachtung der Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:

Tilo Freiwald  
aus Eckernförde

Frankfurt 2014

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 27.10.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. F. Haag**

**Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. O. Steinmetz**

**~~Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:~~**

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	3
1.1 Mechanismen und Abläufe der T-Zellaktivierung.....	3
1.2 Das immunologische Gedächtnis.....	4
1.2.1 Grundlagen.....	4
1.2.2 Einteilung von T-Memory-Populationen.....	5
1.2.3 Zusammenfassung und klinischer Ausblick.....	7
1.3 Einführung in die Durchflusszytometrie.....	7
1.3.1 Standardisierung.....	8
1.3.2 Kompensation.....	9
2 Materialien und Methoden.....	11
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Laborgeräte und Software.....	11
2.1.2 Buffy Coats und Heparinblut.....	11
2.1.3 Antikörper.....	12
2.1.4 Chemikalien.....	13
2.1.5 Medien und Puffer.....	14
2.1.5.1 Kulturmedium.....	14
2.1.5.2 Waschpuffer.....	14
2.1.5.3 Gefrierlösung.....	14
2.1.5.4 Weitere Lösungen.....	15
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Umgang mit humanen peripheren Blut-Monozyten.....	15
2.2.1.1 Aufreinigen.....	15
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	16
2.2.1.3 Einfrieren.....	16
2.2.1.4 Auftauen.....	16
2.2.2 Stimulation von humanen T-Zellen.....	16
2.2.2.1 Vorbereitung der PBMCs.....	17
2.2.2.2 Stimulation.....	17
2.2.3 Durchflusszytometrie.....	17
2.2.3.1 Oberflächenfärbung.....	18
2.2.3.2 Intrazelluläre Färbung.....	18
2.2.3.3 CD154-Kokultur.....	18
2.2.3.4 Bestimmung der Zellviabilität.....	18
2.2.3.5 Kompensation.....	19
2.2.3.6 Auswertung der Daten und Gating Strategie.....	19
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Stimulationsbedingungen und Korrelate der Aktivierung.....	21
3.1.1 Auswahl eines Stimulanz.....	21
3.1.2 Inkubationszeit.....	23
3.1.3 Zelldichte.....	24
3.1.4 Korrelate der Aktivierung.....	25
3.1.5 Ermittlung der Zellviabilität.....	27
3.2 Entwicklung von Färbepanels.....	30
3.2.1 Zielfestlegung.....	30
3.2.2 Auswahl der Antikörper.....	30
3.2.3 Titration der Antikörper.....	32
3.2.4 Kompensation.....	33
3.2.5 Testen der Kombinationen.....	36
3.2.6 Kontrollen.....	39

3.3 Anwendungsmöglichkeiten.....	41
3.3.1 Zytokin-Panel.....	41
3.3.1.1 Qualität der T-Zell-Antwort im Normalkollektiv.....	44
3.3.1.2 Überprüfung der Wirksamkeit einer Tumorstoffimpfung.....	45
3.3.2 Memory-Panel.....	47
3.3.2.1 Memory-Kompartimentierung im Normalkollektiv.....	50
3.3.2.2 Überprüfung der Wirksamkeit einer Tumorstoffimpfung.....	52
4 Diskussion.....	54
4.1 Systematische Entwicklung von Multicolor-Färbepanels.....	54
4.1.1 Optimierung von Stimulationsassays.....	54
4.1.2 Korrelate der Aktivierung.....	56
4.1.3 Paneldesign.....	57
4.2 Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen der Multicolor Flow Cytometry.....	59
4.2.1 Qualität der T-Zell-Antwort.....	59
4.2.2 Definition von Populationen.....	60
4.2.3 Entwicklung einer Tumorstoffimpfung.....	61
5 Zusammenfassung.....	63
Abstract.....	65
Literaturverzeichnis.....	69
Danksagung.....	73
Lebenslauf.....	74
Allgemeines.....	74
Berufliche Erfahrung und Ausbildung .....	74
Eidesstattliche Erklärung.....	75

# 1 Einleitung

Das Immunsystem teilt sich auf in einen angeborenen und erworbenen Anteil. Zum angeborenen Immunsystem gehören Granulozyten und Makrophagen. Sie sind sofort verfügbar und erkennen eine breite Palette an Pathogenen über typische Muster auf deren Oberfläche, ohne vorherige Exposition. Lymphozyten und Antikörper gehören zum erworbenen Immunsystem. Sie werden spezifisch im Rahmen der Infektionsabwehr produziert und garantieren teilweise lebenslange Immunität. In der Immunantwort können Zellen der erworbenen Abwehr die angeborene Abwehr mit einbeziehen.

T-Zellen, als Teil der erworbenen Abwehr, werden im Thymus generiert und rezirkulieren fortan als naive T-Zellen zwischen Blut und Lymphknoten bis sie auf ihr Antigen treffen. Dies muss ihnen durch aktivierte antigenpräsentierende Zellen (APC) im Lymphknoten präsentiert werden. Nach Aktivierung reifen sie zu Effektorzellen, verlassen den Lymphknoten und migrieren in das periphere Gewebe. Im Rahmen dieser primären Immunantwort bildet sich auch ein immunologisches Gedächtnis, was bei Reinfektionen zu einer besseren Abwehr führt (siehe 1.2).

## 1.1 Mechanismen und Abläufe der T-Zellaktivierung

Grundsätzlich wird Aktivierung ausgelöst durch Stimulation am T-Zell-Rezeptor (TCR) und Kostimuli (Janeway 2002). Auf Grund der Heterogenität der Reaktion der T-Zelle, bereitet es Schwierigkeiten messbare Korrelate der Aktivierung zu definieren. Es bestehen Möglichkeiten in unterschiedlichen Richtungen, die jedoch allesamt den Nachteil beinhalten nicht die Gesamtheit der aktivierten Zellen zu erfassen. Das geeignete Korrelat ist einerseits vom Messzeitpunkt abhängig, andererseits von der Fragestellung. Als frühe Korrelate der Aktivierung eignen sich die sogenannten Aktivierungsmarker. Sie sind häufig kostimulatorische Proteine auf T-Zellen, die nach TCR-Stimulation hochreguliert werden. Sie sind zum Teil nur für kurze Zeit sichtbar, aber recht umfassend exprimiert. Ebenfalls zum Teil früh werden Effektormoleküle exprimiert, die sich über intrazelluläre Antikörper-Färbungen sichtbar machen lassen. Sie erfassen nur einen Ausschnitt aus reaktiven Zellen, bilden jedoch zusätzlich funktionelle Attribute einer Aktivierung ab. Ein weiteres Korrelat der Aktivierung ist die Teilungsaktivität von Zellen. Diese benötigt jedoch eine längere Inkubation. Es lassen sich Zellteilung oder Zellzyklus-assoziierte Proteine sichtbar machen.

Obwohl sich die spezifischen Mechanismen der Aktivierung zwischen verschiedenen Typen von T-Zellen leicht unterscheiden, lässt sich ein gemeinsamer Ablauf festhalten.

Ein Pathogen gelangt in der Regel über die Schleimhäute in den Körper und trifft bereits dort auf APCs. Diese phagozytieren das Pathogen und werden - das passende immunologische Milieu vorausgesetzt - aktiviert und wandern ins sekundäre lymphatische Gewebe aus, wo sie das Antigen präsentieren. Eine T-Zelle muss daher ins sekundäre lymphatische Gewebe auswandern um aktiviert zu werden. Dies passiert regelhaft durch T-Zell-Zirkulation.

Der initiale Kontakt zwischen APC und T-Zelle kommt mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen zustande. Die Aktivierung teilt sich in zwei notwendige Signale und ein mögliches modulierendes drittes Signal. Erstes Signal ist der Kontakt von Antigen-spezifischem TCR und CD4 (bzw. CD8) mit einem Peptid-präsentierenden Major Histocompatibility Complex II (MHCII, bzw. MHCI) der APC. In der *in vitro* Stimulation kann das Supe-

rantigen Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) zur unspezifischen Vernetzung von TCR und MHCII führen, und diesen initialen Aktivierungsschritt imitieren. In diesem Fall ist kein Kostimulus zu Aktivierung notwendig. Als physiologisch nötiger Kostimulus bindet CD80/86 an CD28 der T-Zelle. Antikörperbeschichtete CD3/CD28-Polymerkugeln bilden diesen erweiterten Weg mit Kostimulus nach. Durch die beginnende Aktivierung werden eine Reihe weiterer Proteine von der T-Zelle exprimiert, die dann kostimulatorische Signale erhalten können. Dadurch werden die eingeleiteten Differenzierungsschritte und Proliferation moduliert und aufrechterhalten. Eine Reihe dieser Proteine eignen sich als Korrelat der Aktivierung. Ein früher Marker auf der T-Zelle ist CD154, das von CD40 gebunden wird. Es spielt bei der Aktivierung von B-Zellen eine Rolle. Daneben ist CD137, ein anderes Molekül aus der Tumornekrosefaktor-Familie (TNF) an der Kostimulation beteiligt. CD137L auf APCs bindet hieran. Wie auch CD154 wirkt das stimulatorische Signal in beide Richtungen und wird daher auch als Dialog bezeichnet. Weitere verwendete Oberflächenmarker für Aktivierung sind CD69 und der IL-2 Rezeptor CD25. Auch verändern sich die Homing-Eigenschaften nach Aktivierung. So wird beispielsweise CD62L, ein Selektin mit dessen Hilfe die T-Zelle in lymphatisches Gewebe gelangen kann herabreguliert und VLA-A, das als Rezeptor für vaskuläres Endothel in Entzündungsherden dient, heraufreguliert.

Wurde eine Zelle bereits geprimed, kann die einfache Peptid-Stimulation ohne Kostimulus bereits eine Sezernierung von Effektormolekülen hervorrufen, was sich ebenfalls als Korrelat der Aktivierung nutzen lässt. Mit der Besonderheit, dass nur für dieses Peptid spezifische Zellen aktiviert werden. Dies erfordert besondere Sorgfalt in der Messung, denn es handelt sich häufig um kleine Subpopulationen.

Nach der Aktivierung beginnen erste Zellen wieder in den Zellzyklus einzutreten. In allen aktiven Phasen des Zellzyklus wird der nukleäre Proliferationsmarker Ki-67 exprimiert. Teilungen selber können durch Farbstoff-Verdünnung, z.B. Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) sichtbar gemacht werden.

Die intrazellulären Vorgänge die durch Aktivierung ausgelöst werden sind komplex, nicht linear und noch nicht vollständig entschlüsselt (Smith-Garvin et al. 2009). Es wird vermutet, dass die Aktivierung des TCR physiologisch über die Phospholipase C zur Bildung von Diacylglycerin (DAG) führt, welches seinerseits die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Im Verlauf kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Phorbol-Ester Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), der die PKC direkt stimuliert, verwendet.

## **1.2 Das immunologische Gedächtnis**

### **1.2.1 Grundlagen**

Die Antigenerkennung durch das Immunsystem ruft eine Reihe von Veränderungen in den Lymphozyten hervor, die sie in die Lage versetzen den Erreger zu eliminieren und ihn bei erneutem Auftreten schneller und angepasster zu begegnen – die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses. Einmal durchgemachte Krankheiten treten hierdurch klinisch nur einmal im Leben auf, beispielsweise Masern oder auch Hepatitis A. Die Grundlage dieses Gedächtnisses ist zellulär und besteht aus expandierten und differenzierten T- und B-Zellen, die zum Teil lebenslang fortbestehen.

Im B-Zell-Gedächtnis finden sich schützende antikörperproduzierende Plasmazellen neben reaktiven, reifungsfähigen B-Zellen. Eine ähnliche Einteilung ließe sich im T-Zell-Gedächtnis vornehmen, auf das im Folgenden näher eingegangen wird.

In Folge einer Infektion kommt es bei den Antigen-spezifischen T-Zellen zu einer massiven klonalen Expansion. Dies wird ausgelöst durch Präsentation von Peptid-Fragmenten über MHC-Moleküle durch reife (d.h. kostimulierende) dendritische Zellen (DC) im Lymphknoten. Die DCs erhalten neben dem Antigen-Kontakt weitere Steuersignale über *Toll Like Receptors* (TLRs) und anderen Faktoren des Mikromilieus. Sie migrieren vom peripheren Gewebe in die Lymphknoten. Neben der zahlenmäßigen Expansion bilden die T-Zellen Effektor-Mechanismen aus und disseminieren über den Verlust von CD62L und CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) vom Lymphknoten in die peripheren Gewebe. Die Expansions-Phase dauert im Allgemeinen bis zu zwei Wochen und wird gefolgt von einer schnellen Kontraktion der Zellzahl im Rahmen derer 90-95% der Antigen-spezifischen T-Zellen in die Apoptose gehen. Die verbleibenden Zellen formen den initialen Memory-Pool. Durch die logistischen Schwierigkeiten ist nur wenig über die Lebensdauer von Memory-Population bekannt. Es zeichnete sich ab, dass der Memory-Zell-Pool langlebiger ist, jedoch nicht an die Halbwertszeit humoraler Immunität von geschätzt 50 Jahren heranreicht. Der Mechanismus und Auslöser der auf die Expansion folgenden Kontraktion ist nur teilweise verstanden (Badovinac & Harty 2006). Mögliche Limitation der Größe des Memory-Pools kann eine Konkurrenz um homöostatische Zytokine sein. Die Entstehung der Memory-Zellen scheint früh determiniert, denn früher Antigenentzug schwächt die Generierung von Memory-Zellen nicht. Allerdings werden diese Fragen noch kontrovers diskutiert (Beverley 2008).

### 1.2.2 Einteilung von T-Memory-Populationen

Innerhalb des T-Zell-Kompartiments gibt es die großen Gruppen der *Naiven*, *Effector* und *Memory* Zellen.

Eigenschaft	Naive	Effector	Memory
# spezifische Zellen	(-)	+++++++	+++
Persistenz	+++	(-)	+++
Schutz	(-)	+++	+++
Proliferation	+++	(-)	+++
Effektorfunktionen	(-)	+++	+++

Tabelle 1: Funktionelle Unterschiede von Naiven, Effektor und Memory-Zellen. Um Memory-Zellen abzugrenzen reicht ein einziges Merkmal nicht aus. (-) steht für wenig oder gar nicht. Modifiziert nach Badovinac et al. (Badovinac & Harty 2006).

Es gibt zwei unterschiedliche Ansätze diese Einteilung vorzunehmen. Eine funktionelle und eine phänotypische Einteilung. Nach der funktionellen Unterscheidung zeigt eine Memory-Zelle im Gegensatz zur naiven Zelle starke und schnelle Teilung in Folge von Restimulation (Booster-Immunsierung oder Reinfektion) und ihre Abwehr-Mechanismen sind vielgestaltiger und komplexer. Ein Memory-Phänotyp wird nach Primärstimulation in 40-60 Tagen erreicht, was in etwa der Zeit entspricht, nach der sich die Genexpressions-Muster stabilisiert haben (Harty & Badovinac 2008).

Die neuen Möglichkeiten der Multiparameter-Durchflusszytometrie erlauben demgegenüber eine differenzierte phänotypische T-Zellcharakterisierung, anhand von sezernierten Molekülen oder Oberflächenproteinen.

Den Anfang machten Hamann et al. mit der Unterscheidung von Effektor und Memory Zellen anhand der Expression von CD45-Isoformen (Hamann et al. 1997) und CD27 korreliert mit dem funktionellen Phänotyp. Memory Zellen definieren sich demnach als CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> und produzierten IL-2, aber kein IFN $\gamma$  und TNF und erwiesen sich als gering zytotoxisch. In der Literatur bleibt die Rolle der CD45-Isoformen bisweilen unklar. Es existieren die Spleißvarianten CD45R[A, B, C, O] in abnehmender Länge. Die Expression von CD45RA und CD45RO soll sich gegenseitig ausschließen und sich spiegelbildlich verhalten (Monteiro et al. 2007). Memory Zellen exprimieren also CD45RO, aber nicht CD45RA und Naive Zellen verhalten sich umgekehrt. Jedoch besteht Dissens in der Einteilung von Effektorzellen hinsichtlich dieser Marker (Vergleiche (Monteiro et al. 2007; Klebanoff et al. 2006)).

Es besteht weitgehend Konsens über die von Sallusto et al. vorgeschlagene Einteilung. Die Arbeitsgruppe erweiterte die Einteilung um den Homingrezeptor CCR7, der Memory-Zellen in *Central Memory* (CM, CCR7<sup>+</sup>) und *Effector Memory* (EM, CCR7<sup>-</sup>) Zellen auftrennt. *Central Memory* Zellen halten sich vorwiegend im sekundären lymphatischen Gewebe auf, zeigen wenig Effektorfunktionen, sind aber bereit nach Antigenkontakt stark zu proliferieren und als *Effector Memory* Zellen ins periphere Gewebe zu migrieren. *Effector Memory* Zellen sind daher in entzündetem peripherem Gewebe zu finden und zeigen unmittelbar auf Stimulation Effektorfunktionen (Sallusto et al. 2004; Reinhardt et al. 2001).

Jedoch werden *Central Memory* Zellen in verschiedenen Quellen über CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup> oder CD28<sup>+</sup> Expression definiert (Appay et al. 2008). Weiterhin tauchen verschiedene Begriffe wie *terminal differentiated effector* oder *exhausted cells* auf, deren Definition sich zum Teil überlappt. CD127 (Interleukin 7-Rezeptor) könnte ein Marker für Memory-Vorläuferzellen sein (Kaech et al. 2003). Auch die Herabregulierung von KLRG-1 soll eine frühe Memory-Zelle markieren (Klebanoff et al. 2006).

Obwohl zu Beginn vermutet wurde, dass die *Effector Memory* Zellen eine Art Endstation darstellen, die aus dem *Central Memory* Pool regeneriert wird, hat sich gezeigt dass die Abstammungsbeziehungen komplexer sind und weiterer Forschung bedürfen. Als weitere Population tauchen durch Verwendung der vorgestellten Marker in der CD8 Population die CD45RO<sup>-</sup>(CD45RA<sup>+</sup>)CCR7<sup>-</sup> Zellen auf. Sie verhalten sich vergleichbar mit *Effector Memory* Zellen und wurden deswegen T Effector Memory RA-Positiv (T<sub>EMRA</sub>) genannt (Geginat et al. 2003). Jedoch zeigen neuere Daten aus Genexpressionsmessungen auf Einzelzellebene, dass eine Einteilung von CCR7<sup>-</sup> Zellen unabhängig von CD45RO/RA Expression der Realität näher käme (Monteiro et al. 2007). Basierend auf den vorgestellten Erkenntnissen wurden mit der Zeit weitere Effektormoleküle (Zytokine, Granzyme), Homingrezeptoren und Rezeptoren, die mit Zellaktivierung und Regulation assoziiert sind, mit etablierten Memory Phänotypen korreliert. Marker, die mit Zellaktivierung assoziiert sind wie CD57, CD27 und CD28 können Aussagen treffen, über die Effektorfunktionen von Zellen (Brenchley et al. 2003). Sie werden bei längerem Antigenkontakt herab- (CD27, CD28) beziehungsweise heraufreguliert (CD57).

## T Zellen

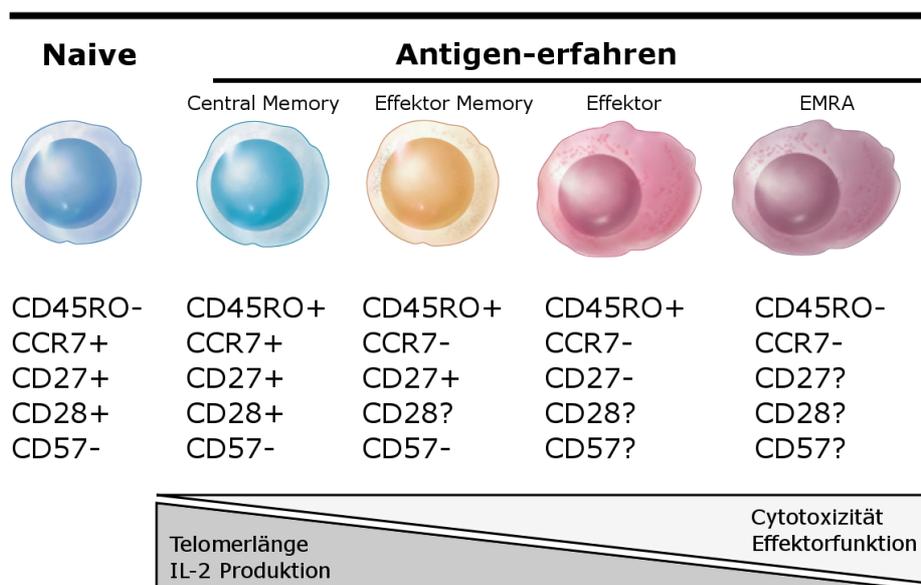


Abb 1.1: T-Zellen lassen sich mit Hilfe einiger Oberflächenmarker in Memory Kompartimente einteilen. Modifiziert nach Klebanoff und Appay et al. (Klebanoff et al. 2006).

### 1.2.3 Zusammenfassung und klinischer Ausblick

Letztlich ist das einzige durchgehende Merkmal in der Memory-Klassifikation eine erstaunliche Heterogenität der Zellen. Dementsprechend sind verschiedene Modelle entstanden. Die vorliegende Arbeit hat sich an der etablierten Einteilung nach Sallusto et al. in *Effector Memory* und *Central Memory* Zellen anhand von CCR7 und CD45RO orientiert.

Die Einteilung von Memory-Populationen ist für die Vakzin-Entwicklung von großem Interesse, da einzelnen Subpopulationen eine verstärkte Immunogenität zugesprochen wird. So ließen sich bei näherer Betrachtung Antigen-spezifischer Zellen Pathogen-spezifische Expressions-Profile erkennen (Casazza et al. 2006). Des weiteren wird ein Vorteil von polyfunktionalen T-Zellen gegenüber monofunktionalen T-Zellen gefordert (Seder et al. 2008).

### 1.3 Einführung in die Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden über einen Flüssigkeitsstrom separierte Einzelzellen an einem Laser vorbeigeführt, nachdem sie mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten markiert wurden. Das Streulicht und die spektralen Emissionen werden detektiert und ermöglichen Aussagen über Zelleigenschaften.

Die Begriffe Durchflusszytometrie und Flow Cytometry (respektive seine Abkürzung FC) entsprechen sich. Synonym wird auch FACS (Fluorescence-activated cell sorting) genutzt, obwohl dies im eigentlichen Sinn das Verfahren der Zell-Sortierung mit Hilfe eines Durchflusszytometers meint. Zusätzlich ist der Begriff markenrechtlich von der Firma Becton-Dickinson geschützt. Daher wurde in dieser Arbeit auf die Nutzung dieses Begriffes verzichtet.

Um eine durchflusszytometrische Messung vorzunehmen, sind die Zellen als Suspension aufzubereiten. Das ermöglicht die Analyse von Einzelzellen. Zusätzlich können sie mit Fluorochromen markiert werden (in der Regel über Antikörper), um bestimmte Eigenschaften sichtbar zu machen. Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine Kapillare in das Gerät gesaugt. Durch den geringen Durchmesser der Kapillare passieren die Zellen vereinzelt einen Laserstrahl. Bei Multiparameter-Analysen können mehrere Laser hintereinander installiert werden. Das eingestrahelte Licht wird von Zellen einerseits gebeugt und gestreut (Scatter-Licht), und andererseits wird Licht durch die Fluorochrom-Markierung emittiert. Von variabel angeordneten Spiegeln und Bandpassfiltern gelenkt, trifft das Licht auf Detektoren. Photomultipliertubes (PMT) sind aktuell die Detektoren erster Wahl auf Grund ihrer hohen Sensitivität. Vom emittiertem Licht zur Detektion geht bereits 98% des Lichtes verloren (Wood 1998). Die weitere Verarbeitung des Signals erfolgt über entsprechende Software am angeschlossenen Computer.

Die Durchflusszytometrie wurde von deutschen Wissenschaftlern an der Universität Münster entwickelt und 1968 patentiert (Wolfgang et al. 1971). Zuerst lief sie noch unter dem Namen Impulszytophotometrie, wurde aber später in den USA in Flow Cytometry umgetauft und ist auch unter diesem Namen bekannt geworden. Die weitere Entwicklung und Einführung in die Routine wurde maßgeblich in den Herzenberg Laboren an der Stanford Universität vorangetrieben (Roederer 2002). Dort wurde auch der erste *cell sorter* von Len Herzenberg marktfähig gemacht.

Initial wurde das Scatter-Licht nur genutzt um zu detektieren wann sich eine Zelle im Strom befindet. Später wurde erkannt, dass sich über den Scatter allein Leukozytenpopulationen differenzieren lassen. Das Aufkommen monoklonaler Antikörper in der Immunologie gab einen weiteren Entwicklungsschub. Schließlich war die beginnende AIDS-Pandemie eine treibende Kraft in der Entwicklung der Multicolor-Durchflusszytometrie. Zum einen wurden die Benchtop-Cytometer in dieser Zeit erschwinglich im Preis, zum anderen zeigte sich, dass Verschiebungen in T-Zell-Subpopulationen genutzt werden konnten um den Schweregrad der Erkrankung zu bestimmen. Mit ständiger Weiterentwicklung von Geräten, Farbstoffen und Software ist heute eine Messung von bis zu 18 Farben simultan möglich (Chattopadhyay, Price, et al. 2006). Viele, der in dieser Arbeit zitierten Messungen, stammen von Mario Roederer und seiner Arbeitsgruppe am Vaccine Research Center der NIH.

In der Immunologie sind Anwendungen zur Phänotypisierung, wegen der großen Heterogenität von Immunzellen, weit verbreitet. Jedoch haben sich zunehmend auch funktionelle Messungen von Metabolismus und Proliferation etabliert.

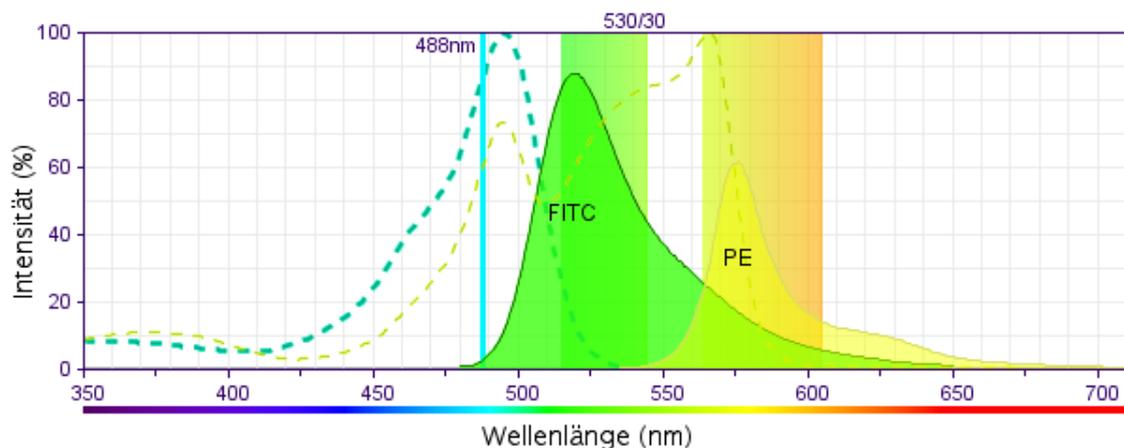
### 1.3.1 Standardisierung

Standardisierung ist ein wichtiges Thema in der der Durchflusszytometrie. Es zeigte sich, dass Ergebnisse stark abhängig sind von der individuellen Gating-Strategie. Aus diesem Grund wurde das Vorgehen in der vorliegenden Arbeit ausführlich dargestellt (Abschnitt 2.2.3.6). Eine Möglichkeit der Dokumentation und des Austausches von Informationen zum Gating bietet die *Gating-ML Spezifikation* (Spidlen et al. 2008). Die Beschreibung wird als Extensible Markup Language-Datei (XML) gespeichert. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit unterstützte jedoch keine gängige Software diesen Standard, obwohl er weit fortgeschritten war.

Ebenso steht es mit der Beschreibung von Experimenten am Durchflusszytometer. Eine Reihe von Informationen sind nötig um die Qualität der Durchflusszytometer-Analysen zu beurteilen und Experimente zu validieren. Dazu gehören Kompensationseinstellungen, verwendete Antikörper-Konjugate, Einstellung der PMTs und weitere Variablen des Experimentes. Der *Minimum Information about a Flow Cytometry Experiment* Standard (MIFlowCyt), definiert die minimale Information, die nötig ist, um ein durchflusszytometrisches Experiment zu interpretieren (Lee et al. 2008). Durch mangelnde Softwareunterstützung zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit musste dieser Aspekt ausgespart werden.

### 1.3.2 Kompensation

In der Multicolor-Durchflusszytometrie wachsen die Möglichkeiten durch neue Geräte und Farbstoffe stetig. Dabei spielt dann auch die Kompensation eine immer bedeutendere Rolle.



**Abb 1.2: Beziehung von Laser und Exzitationsspektren, sowie Emissionsspektren und Filter im Flow Cytometer am Beispiel von FITC (grün) und PE (gelb).** Ein Fluorochrom wird stets über einen Wellenlängen-Bereich angeregt (gestrichelte Linien). Der blaue Laser erregt sowohl FITC als auch PE. Durch Unterschiede ihrer Emissionsspektren (durchgezogene Linien) lassen sich ihre Emissionen jedoch über Filter auf unterschiedliche Detektoren leiten. Filter stellen immer einen Kompromiss dar zwischen gewünschter Absorption des Lichtes eines Fluorochromes einerseits und unerwünschter Absorption anderer Fluorochrome andererseits dar. Zu sehen ist das trotz Filter die Emissionsspektren von FITC und PE im Filterbereich überlappen. Zur Korrektur ist eine Kompensation der Messung erforderlich. Abbildung modifiziert nach BD Fluorescence Spectrum Viewer (BD Biosciences 2011b).

Idealerweise würde ein Farbstoff von Licht einer definierten Wellenlänge angeregt werden und daraufhin eine definierte Wellenlänge emittieren. Jedoch verhalten sich die Farbstoffe in der Realität nicht ideal. Absorptionsspektren und Emissionsspektren fallen breit aus und überlappen zum Teil zwischen einzelnen Farbstoffen. Dadurch sind sie nicht nur in ihrem Kanal (Bandpassfilter + Detektor) messbar. In Abbildung 1.2 ist dies beispielhaft gezeigt für die Fluorochrome Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Beide werden vom blauen Laser angeregt und überlappen sich in ihren Emissionsspektren. Davon theoretisch abzugrenzen, jedoch praktisch ebenso zu behandeln, ist der Zustand, in dem ein Fluorochrom zusätzlich von einem anderen, als dem ihm zugedachten Laser, angeregt wird und in für andere Fluorochrome reservierte Kanäle emittiert (*cross-laser* Signale).

Als Kompensation wiederum bezeichnet man den Vorgang, den Signalanteil, der durch spektrale Überlappung zustande kommt, abzuziehen. So erhält man die reine Information eines Fluorochromes. Die spektrale Überlappung verhält sich linear zur Intensität des Signals und lässt sich somit als konstanter Koeffizient beschreiben. Die korrekte Fluoreszenzintensität lässt sich nun durch den mathematischen Zusammenhang mit dem Koeffizienten und gemessener Fluoreszenz bestimmen (Bagwell & Adams 1993).

Bei einem Zweifarben-Flow Cytometer lässt sich eine Kompensation noch einfach durchführen. Es sind lediglich zwei Kompensationswerte zu ermitteln (FITC->PE und PE->FITC bzw. allgemeiner: Farbenzahl<sup>2</sup> minus Farbenzahl). Bei acht Farben müssen bereits 56 Überlappungen berücksichtigt werden. Hier wird deutlich, dass Hilfe durch Software notwendig wird. Hinzu kommt noch, dass eine manuelle Kompensation durch visuelle Beurteilung von Dotplots gefärbter Zellen am Durchflusszytometer, wie vielfach durchgeführt, nicht korrekt möglich ist. Einerseits verzerrt ein eingestellter Spillover-Koeffizient die Beurteilung anderer Überlappungen in einem Kanal, andererseits sind verschiedene Überlappungen in einen Kanal nicht zu trennen. Hinzu kommt noch, dass die menschliche Wahrnehmung nicht in der Lage ist den Median aus Log-skalierten Darstellungen zu bestimmen und dadurch zur Überkompensation neigt (Roederer 2001). Bei korrekter Kompensation sollten sich Populationen hoher und niedriger Fluoreszenz im Spillover-aussendenden Kanal, in ihrem Median der Fluoreszenzintensität (MFI) im Spillover-empfangenden Kanal nicht unterscheiden.

Problematisch ist ebenfalls die Nutzung von Zellen für die Kompensation. Denn Zellpopulationen (hier: Monozyten und Lymphozyten) unterscheiden sich in ihrer Autofluoreszenz. Vergleicht man anti-CD14 gefärbte Monozyten mit ungefärbten Lymphozyten, so geht ein Teil der hohen Intensität der Monozytenfärbung auf die stärkere Autofluoreszenz dieser zurück und nicht auf die Bindung des konjugierten Antikörpers.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte und Software

FACSCalibur	Becton Dickinson
FACSCanto II	Becton Dickinson
Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen
Falcon 5ml Polystyren Rundboden FACS Röhren	Becton Dickinson
Falcon Cell Strainer 70µm Nylon	Becton Dickinson
96 well ELISA Microplatten, U-Boden, Microlon 600 – high binding	Greiner bio-one
FlowJo V7 Windows und V8 Mac	Tree Star, Ashland, USA
FACSDiva 6.1	Becton Dickinson

Tabelle 2: Laborgeräte und Software.

#### 2.1.2 Buffy Coats und Heparinblut

Bezeichnung	Nummer	Spender	Datum	CMV
A	9335498	w, *1984	30.01.08	∅
B	9335472	m, *1948	30.01.08	∅
C	9320375	k.A.	10.01.08	k.A.
D	k.A.	k.A.	26.09.07	k.A.
E	9364522	w, *1976	05.03.08	+
F	9365479	m, *1951	05.03.08	∅
G	9365594	m, *1956	05.03.08	+
H	9371253	m, *1943	13.03.08	∅
I	9429127	k.A.	26.05.08	+
X1	9399007	k.A.	17.04.08	∅
X2	9405200	m, *1961	24.04.08	+
X3	9440108	k.A.	k.A.	+
X4	9429143	k.A.	26.05.08	+
X5	9415563	k.A.	08.05.08	+
X6	9460940	k.A.	02.07.08	+
X7	08914204	k.A.	02.09.08	+

Tabelle 3: Aufgereinigte Buffy Coats

Sämtliche Buffy Coats wurden aus der Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf bezogen. Durch veränderte Modalitäten wurden bei einigen Lieferungen die Spender-Daten nicht komplett mitgeteilt. Direkt nach einer Blutspende wird

das Vollblut dort zentrifugiert um eine Auftrennung in drei Teile zu erreichen: Das Erythrozytenkonzentrat, darüber die konzentrierten Leukozyten (wegen der gelbbraunen Farbe wird die Schicht als Buffy Coat bezeichnet), angelagert die Thrombozyten und schließlich das Blutplasma. Durch Lichtsensor-gesteuertes Abpressen der umgebenden Phasen verbleibt der Buffy Coat im Blutbeutel. Die weitere Aufreinigung wurde nach Standard-Protokollen jeweils am selben Tag durchgeführt. Dirk Gaute stellte weitere Zellaliquots aus seinen Beständen zur Verfügung (gekennzeichnet durch ein X, Tabelle 3). Gudrun Dubberke stellte PBMC D zur Verfügung. Ab April 2008 verweigerte die Transfusionsmedizin größtenteils die Angabe des Spender-Geschlechts.

Bezeichnung	Nummer	Art	Spender	Datum
Maus-A	3181	murines Milzellysat	w, WT8xbalbc, 12 Wochen alt	09.06.08
HEP-A	9461542	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-B	9461625	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-C	9461716	Heparinblut	f	03.07.08
HEP-D	9461559	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-E	9461633	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-F	9461583	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-G	9461575	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-H	9461641	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-I	9461526	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-K	9461690	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-L	9461674	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-M	9461534	Heparinblut	m	03.07.08
HEP-N	-	Heparinblut	Friedrich Haag	22.10.08
HEP-O	-	Heparinblut	Cary McMillan	17.06.08
HEP-P	-	Heparinblut	Tilo Freiwald	23.06.08

Tabelle 4: Weitere Zellen: murines Milzellysat und humanes Heparinblut; f weiblich, m männlich.

Das Heparinblut HEP-A bis HEP-M wurde aus dem Institut für Transfusionsmedizin bezogen. Es wurde routinemäßig von gesunden Blutspendern entnommen. HEP-N bis HEP-P wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit selbst durch Venenpunktion gewonnen. Es wurde jeweils am selben Tag über das Accuspin-System aufgereinigt und für die Experimente weiterverwendet.

### 2.1.3 Antikörper

Sämtliche verwendete Antikörper richten sich gegen humanes Protein. Die Eigenschaft beinhaltet, den Einsatzzweck des Antikörpers und die Art der Färbung – intrazellulär (ICS), oberflächlich (SS) oder als Kokultur. Die angegebenen Antikörper stammen aus der Maus. Lediglich *CCR7 Alexa 647* von *BD Biosciences* stammt aus der Ratte.

Antigen	Fluorochrom	Klon	Färbung	Hersteller	Verdünnung
CD3	APC-Alexa750	UCHT-1	ICS	eBioscience	1:80
	FITC	SP30	ICS	Becton Dickinson	-
	Pacific Blue	UCHT-1	ICS	eBioscience	1:10
CD4	PerCP-Cy5.5	L200	SS	Becton Dickinson	1:160
	PE-Cy7	RPA-T4	SS	eBioscience	1:20
CD8	APC	06/07/53	SS	Becton Dickinson	1:20
	Pacific Blue	RPA-T8	SS	eBioscience	-
CD14	FITC	M5E2	SS	Becton Dickinson	1:20
CD25	PE	B1.49.9	SS	Becton Dickinson	-
CD27	FITC	O323	SS	eBioscience	1:1
CD45RO	PE-Cy7	UCHL-1	SS	Becton Dickinson	1:2
CD56	PE-Cy7	B159	SS	Becton Dickinson	1:10
CD69	PE	FN50	SS	Becton Dickinson	-
CD137	PE	4-1BB	SS	Becton Dickinson	-
CD154	PE	24-31	Kokultur	eBioscience	1:1
CCR7	Alexa 647	3D12	SS	Becton Dickinson	1:1
	PE	3D12	SS	Becton Dickinson	1:2
IFN $\gamma$	FITC	4S.B3	ICS	eBioscience	-
	APC	25723.11	ICS	Becton Dickinson	1:4
IL-17A	Alexa 647	eBio64DEC17	ICS	eBioscience	1:1
IL-2	PE	MQ1-17H12	ICS	Becton Dickinson	1:1
TNF	FITC		ICS	Becton Dickinson	-
	FITC	Mab11	ICS	eBioscience	1:2
	PE	Mab11	ICS	eBioscience	1:1
Aminogruppen	LIVE/DEAD aqua	-	SS	Invitrogen	1:1
Aminogruppen	LIVE/DEAD nearIR	-	SS	Invitrogen	1:10

Tabelle 5: Auflistung von verwendeten Antikörpern. Intracellular staining (ICS), Surface staining (SS)

## 2.1.4 Chemikalien

Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich
$\beta$ -glucan	k.A.
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich
CD28/CD49d Costimulatory Reagent	Becton Dickinson
CompBeads Anti-Mouse Ig, $\kappa$ /Negative Control (3,2 $\mu$ m)	Becton Dickinson
Concavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich
PepTivator - CMV pp65	Miltenyi Biotec
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase I (DN25)	Sigma-Aldrich
Dynal Dynabeads CD3/CD28	Invitrogen
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare
Fetal calf serum (FCS)	k.A.
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich
Monensin	eBioscience
Peptidoglycan (PGN)	Sigma-Aldrich
Phytohaemagglutinin (PHA-P)	k.A.
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
Polybead Amino Microspheres 3.00 $\mu$ m	Polysciences, Eppelheim
Staphylococcal Enterotoxin B Fragment	Sigma-Aldrich
Shiitake	k.A.
Staurosporin	Sigma-Aldrich
Zinkoxid	k.A.
Zymosan	Invivogen

Tabelle 6: Chemikalien.

### 2.1.5 Medien und Puffer

Die Komponenten wurden steril filtriert und bei 4°C gelagert.

#### 2.1.5.1 Kulturmedium

Das FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren vor Nutzung 30min bei 56°C erhitzt.

RPMI-1640

10% FCS

2 mM Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

#### 2.1.5.2 Waschpuffer

PBS -/-

0,5% BSA

Das BSA wurde eingesetzt, um die Adhäsion der Zellen zu erhöhen und somit Zellverlust beim Waschen zu reduzieren.

### **2.1.5.3 Gefrierlösung**

17,5ml RPMI-1640

2,5ml FCS

5ml DMSO

### **2.1.5.4 Weitere Lösungen**

Fixation Solution	eBioscience
Permeabilization Buffer	eBioscience
RBC Lysing Solution	eBioscience
RPMI-1640	Invitrogen
PBS -/-	Invitrogen

Tabelle 7: Weitere Lösungen.

## **2.2 Methoden**

Die im Folgenden vorgestellten Methoden entsprechen in zum Teil abgewandelter Form den Herstellerempfehlungen der genutzten Produkte.

### **2.2.1 Umgang mit humanen peripheren Blut-Monozyten**

#### **2.2.1.1 Aufreinigen**

Um die Lymphozyten zu konzentrieren und störende Zellen wie Erythrozyten zu entfernen wurden die gewonnenen Zellen über Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt. Über Zentrifugation wird das Zellmaterial durch eine Schicht aus Polysacchariden mit hoher Dichte getrieben. Es kommt dadurch zur Separation von Erythrozyten, Leukozyten und Plasma. Die Leukozyten-Schicht kann leicht entnommen werden. Es wurden zwei unterschiedliche Produkte genutzt: Ficoll und Accuspin. Die humanen BuffyCoats wurden über Ficoll Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt.

Zuerst verdünnt man den Buffy Coat 1:2 mit Kulturmedium. Davon je 20ml vorsichtig auf 15ml Ficoll in 50ml Röhrchen aufschichten. Es sollte dabei zu einem möglichst geringen Kontakt der beiden Flüssigkeiten kommen und die Tubes sollten zügig weiterverarbeitet werden, da Ficoll zytotoxisch wirkt. Die Röhrchen 20min zentrifugieren (2000rpm, Raumtemperatur, Dezelleration 0, Akzeleration 2). Die dadurch sichtbar gewordene ringförmige weiße Zwischenphase mit einer 2ml Pipette in ein 15ml Röhrchen abheben (insgesamt 4ml). Auf 15ml mit Kulturmedium auffüllen und 3x mit Kulturmedium waschen (Zentrifuge: 1600rpm, Raumtemperatur, Dezeleration 9, Akzeleration 9). Nach dem ersten waschen können die Zellpellets vereinigt werden. Es kommt hier in der Regel zur Bildung von schwer löslichen Klumpen durch nekrotische Granulozyten und andere Zelltrümmer. Lassen diese sich auch mit einer 1ml Pipette nicht resuspendieren, sollten sie aus der Suspension entfernt werden. Als Ergebnis erhält man hochkonzentrierte Mo-

nozyten und Lymphozyten mit Resten von Granulozyten und Erythrozyten: *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs).

Es könnten noch Schritte folgen um die restlichen Erythrozyten zu lysieren, z.B. über pH-Variation. Dies wurde nicht durchgeführt, u.a. weil es Stress für die Lymphozyten darstellt.

Vergleichbar hierzu wurde das Heparinblut über Accuspin-Röhrchen aufgereinigt. Neben dem gleichen Funktionsprinzip bietet es einen Vorteil gegenüber Ficoll. Durch ein integriertes Zweikammersystem fällt es bei kleinen Blutmengen leichter die mononukleäre Schicht abzupipettieren.

Zuerst sind die Accuspin-Röhrchen auf Raumtemperatur zu bringen und über der Fritte befindliche Flüssigkeit herabzuzentrifugieren. Das aufzureinigende Blut wurde 1:2 mit RPMI verdünnt und dann 3-6ml in ein Accuspin-Röhrchen gefüllt. Unmittelbar bei 800xg und 21°C für 15min zentrifugieren. Dann kann die entstandene Plasma-Schicht abpipettiert und verworfen werden. Anschließend das mononukleäre Band in ein frisches Röhrchen überführen und dreimal mit PBS (1x mit 10ml und 2x mit 5ml) waschen. Zuletzt werden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und stehen für Färbungen und Stimulationen bereit.

### **2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um den Zählaufwand zu begrenzen und die Erythrozyten zu lysieren wurden die PBMCs 1:100 in 3%iger Essigsäure verdünnt. Die ermittelte Zellzahl in einem großen Eckquadranten multipliziert mit 100 (Verdünnung) und  $10^4$  (1ml Volumen) ergibt die Zellzahl pro ml.

### **2.2.1.3 Einfrieren**

Grundlage für das Vorgehen beim Einfrieren und Auftauen der PBMCs war eine leicht angepasste Standardarbeitsanweisung (SOP) der Tumor Vaccine Group an der Universität Washington (Mary L Disis 2005).

Zielkonzentration der PBMCs im Gefrier Röhrchen ist  $2 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Als Vorbereitung müssen Gefriercontainer auf 4°C vorgekühlt werden, die Gefrier Röhrchen beschriftet werden (PBMC, Datum, Initialen, Versuchsnummer, eindeutige Kennziffer) und auch bei -20°C gekühlt werden. Die angesetzte Gefrierlösung sollte mindestens 30min auf Eis gestellt werden.

Die folgenden Schritte sollten zügig durchgeführt werden, da DMSO zytotoxisch wirkt. Die aufgereinigten PBMCs auf  $4 \cdot 10^7$  Zellen/ml mit gekühltem Kulturmedium ad 10ml verdünnen und 10ml der vorbereiteten Gefrierlösung tröpfchenweise und unter ständigem Mixen zugeben. Je 1ml in vorbereitete Gefrier Röhrchen aliquotieren. Diese 24h bei -80°C lagern und dann in den -180°C Stickstoff-Tank umlagern.

### **2.2.1.4 Auftauen**

9ml RPMI-1640 in 50ml Röhrchen vorlegen und im Wasserbad bei 37°C warm stellen (Disis et al. 2006). Die Gefrier Röhrchen im Wasserbad zügig antauen lassen, mit Ethanol von außen desinfizieren und rasch an der Steril-Werkbank in das 50ml Röhrchen umpipettieren. Es kann auch etwas warmes RPMI-1640 in das Gefrier Röhrchen gegeben wer-

den um das Tauen zu beschleunigen. Die Suspension wird jetzt zweimal mit 10ml Kulturmedium gewaschen (10min, 1200rpm, 4°C).

## 2.2.2 Stimulation von humanen T-Zellen

Die Kurzzeitstimulation dient der *Sichtbarmachung* von Zelleigenschaften. Stimulation kann zu Zytokinproduktion führen, die darauf mit Hilfe der intrazellulären Färbung gemessen werden kann. Bei antigenspezifischer Stimulation reagieren allgemein nur kleine Frequenzen von Zellen. Hier können reaktive Zellen mit einem Aktivitätsmarker markiert werden.

### 2.2.2.1 Vorbereitung der PBMCs

Nach dem Auftauen wurde die PBMC in 2ml Kulturmedium resuspendiert und 45min mit 10U/ml DNase I bei 37°C inkubiert. Um die DNase zu entfernen wurde jetzt mit 10ml Kulturmedium gewaschen.

Waren Zellklümpchen sichtbar wurde die Suspension auf 10ml mit Kulturmedium aufgefüllt, durch ein Zellsieb gegeben und erneut gewaschen.

Nach Zugabe von 1ml Kulturmedium wurde die Zellzahl nach 1:100 Dilution in Essigsäure bestimmt. Die Zellzahl wurde auf  $10^7$ /ml justiert. Die Zellen konnten bis zu 24h im Brutschrank ruhen. Dies sollte die Reaktion auf Stimulation nicht verändern (Maecker et al. 2001).

### 2.2.2.2 Stimulation

Die Stimulation wurde in 96er well U-Boden Microplatten angesetzt, um enge Zell-Zell-Kontakte zu ermöglichen. Die vorbereiteten Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und in jeden well 150µl Zellsuspension pipettiert in der Dichte  $10^7$  Zellen/ml. Sollte im Verlauf des Experimentes intrazellulär angefärbt werden, wurde 2µM Monensin, ein Inhibitor des Golgi-Netzwerkes, hinzugegeben. Es ist eine Alternative zum verbreiteten Brefeldin A. Inkubiert wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 bis 20 Stunden. Näheres wurde bei den Versuchsbeschreibungen angegeben.

Es wurden verschiedene Stimulanzen verwendet. Überwiegend kam SEB zum Einsatz. Das Superantigen führt durch Vernetzung von T-Zell-Rezeptordomäne Vβ und MHC II Molekül zur Aktivierung von T-Zellen. Durch Aktivierung am TCR ist dieser Weg relativ physiologisch. Es wurde in der Konzentration 1µg/ml eingesetzt. Anfangs kamen auch anti CD3/CD28 Beads zum Einsatz. Das sind antikörperbeschichtete, magnetische Polymer-Kugeln. Sie aktivieren T-Zellen unspezifisch. CD3 ist Teil des TCR-Komplexes und für dessen Signaltransduktion sowie Translokation in die Membran zuständig. Die Bindung von CD28 (normalerweise durch CD80/CD86 auf aktivierten Monozyten) ist ein obligatorisches Aktivierungssignal für T-Zellen. Vor der Anwendung wurden die Beads in 1ml PBS -/- mit Hilfe eines Magneten gewaschen. Einsatz im Verhältnis drei Beads zu einer T-Zelle.

Lektine sind eine Gruppe von spezifischen Proteinen die Kohlenhydratstrukturen innerhalb und außerhalb von Zellen binden und damit zahlreiche zellphysiologische Vorgänge beeinflussen. Es wurden die Lektine PHA-P, in 2µg/ml, und ConA, in 75µg/ml, eingesetzt – beides selektive T-Zell-Mitogene.

In seiner Potenz vergleichbar ist der Phorbolster PMA. Er aktiviert intrazellulär die Pro-

teinkinase C und wirkt ebenfalls als selektives T-Zell-Mitogen. Verwendet in der Konzentration 50ng/ml.

### **2.2.3 Durchflusszytometrie**

Sämtliche Experimente wurden an einem Durchflusszytometer durchgeführt. Vorwiegend kam ein BD FACS Canto II in der 8-Farb-Option mit drei Lasern (BD Biosciences 2011a) zum Einsatz. Somit konnten folgende Fluorochrome parallel genutzt werden: Fluorescein Isothiocyanat (FITC)/Alexa488, Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)/PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, Allophycocyanin (APC)/Alexa 647, APC-Cy7/APC-Alexa750/near-IR ViD, AmCyan/aqua ViD und Pacific Blue. Der achte Kanal blieb in der aktuellen Konfiguration ungenutzt.

Als zweite Möglichkeit stand ein BD FACS Calibur zur Verfügung. Hier konnten 4 Farben parallel verwendet werden: FITC, PE, PerCP-Cy5.5 und APC (hier sind nur die Standardfluorochrome aufgeführt) Es wurde lediglich in den Vorversuchen verwendet, da Qualität und Geschwindigkeit der Messung gegenüber dem BD FACS Canto II zurückstehen.

Antikörper-Färbungen wurden nach leicht abgewandelten Standard-Protokollen von eBioscience (eBioscience 2011c; eBioscience 2011b) durchgeführt.

#### **2.2.3.1 Oberflächenfärbung**

Die Färbung erfolgte in FC-Röhrchen. Zuerst wird die gewünschte Menge an Zellsuspension zugegeben und einmal mit 1ml PBS gewaschen. Um die verbliebene Flüssigkeit zu minimieren wurden die Röhrchen auf Zellstoff ausgeklopft. Zum verbleibenden Volumen wurde 50µl vorbereitetes Antikörper-PBS Gemisch hinzugegeben und für 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde zweimal mit 1ml Waschpuffer gewaschen.

An dieser Stelle wurden, wenn nötig, die intrazellulären Ziele gefärbt.

#### **2.2.3.2 Intrazelluläre Färbung**

Nach dem letzten Waschvorgang der Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit 100µl Fixation Solution fixiert und gevortext. Es folgt 20min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Um die Zellen durchgängig für den Antikörper zu machen wurden sie zweimal mit 1ml Permeabilization Buffer gewaschen. 100µl Antikörper-Permeabilization buffer Gemisch wurden hinzugefügt und für 20min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde einmal mit 1ml Permeabilization buffer gewaschen.

Im Anschluss die jeweilige Färbung wurden die Zellen in 400µl 1%igem PFA fixiert und bis zur Messung (maximal 24 Stunden) bei 4°C im Dunkeln gelagert.

#### **2.2.3.3 CD154-Kokultur**

CD154 kann als Aktivierungsmarker auch parallel zum Stimulations-Ansatz zugegeben werden und ermöglicht so eine sensitive Identifizierung von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, z.B. zur Erfassung Antigen-spezifischer Antworten (Chattopadhyay et al. 2005). Zu  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen wurden vor Zugabe des Stimulanz 20µl Antikörper gegeben. Damit ist die benötigte Antikörper-Menge nicht höher als bei klassischen Färbungen. Sie musste jedoch ebenfalls herab titriert werden. Die Inkubation muss in Gegenwart von 2µM Mo-

nensin erfolgen. CD154 wird nach Aktivierung der Zelle nur temporär auf der Zelloberfläche exprimiert und dann als Komplex mit dem gebundenen Antikörper internalisiert. Monensin, eigentlich ein Inhibitor des Golgi-Netzwerkes, verhindert die Degradation des Vesikels und ermöglicht so die Erfassung der Fluoreszenz.

#### **2.2.3.4 Bestimmung der Zellviabilität**

Die Erfassung nekrotischer und apoptotischer Zellen wurde einerseits anhand ihrer Eigenschaften im Scatter durchgeführt. Zusätzlich wurden spezifische Farbstoffe eingesetzt um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen.

Propidium Iodid kann durch die nicht intakte Zellmembran in die Zelle gelangen und bindet dort DNA. Führt man ICS durch ist PI jedoch nicht geeignet. ViDs reagieren unspezifisch mit Aminogruppen. Sie können auch in Kombination mit ICS eingesetzt werden. Ist die Membran geschädigt färben sie auch intrazelluläres Protein. Somit können lebende und tote Zellen anhand ihrer Fluoreszenzintensität unterschieden werden.

1µl PI wurde unmittelbar vor der Messung zu  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen gegeben. ViDs werden als Oberflächenfärbung eingesetzt. 0,2µl nearIR-ViD oder 1µl aqua-ViD zu  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen. Dabei sollten die Zellen in PBS ohne Proteinzusatz gelöst sein um unspezifische Reaktionen des Farbstoffs zu vermeiden.

#### **2.2.3.5 Kompensation**

Die Messung der Zellen erfolgte mit der Software FACS Diva. Die Berechnung der Kompensationsmatrix wurde mit FlowJo durchgeführt.

Grundlage für eine Kompensation war die Einzelfärbung von Kompensationsbeads. Es handelt sich dabei um Mikropartikel aus Polystyren. Es wurden zwei Varianten eingesetzt: CompBeads, die an Maus  $\kappa$  leichte Ketten von Immunglobulinen binden und damit die Kapazität besitzen fast alle eingesetzten Antikörper zu binden. Um die Vitalitäts-Farbstoffe aqua ViD und nearIR ViD zu kompensieren, wurden zusätzlich AminBeads (beschichtet mit Aminogruppen) eingesetzt (Amino Microspheres). Beide Beads besitzen einen vergleichbaren Durchmesser von ca. 3µm. Beads wurden der Färbung von Zellen vorgezogen, aufgrund der einheitlicheren Autofluoreszenz von ersteren, sowie deren starke Antikörperbindung und somit Fluoreszenz.

Bei der Färbung wurde weitgehend nach Hersteller-Protokoll vorgegangen. Für jedes verwendete Fluorochrom wird ein FC-Röhrchen beschriftet und 100µl PBS hineingegeben. Von den gevortexten Beads wird jetzt 2\*1 Tropfen (CompBeads, anti-Maus und Negativkontrolle) oder 0,0625µl hinzugegeben (Amino Microspheres, entspricht  $1,05 \cdot 10^5$  Beads). Nun die Antikörper hinzugeben und vortexen. 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wird danach mit 2ml Waschpuffer gewaschen (10min, 20°C, 200\*g). Den Überstand verwerfen und mit 400µl Waschpuffer auffüllen.

Im Scatter ist zu beachten, dass gegenüber PBMCs die PMTs eine höhere Spannung benötigen, da die Partikel kleiner sind. Je Einzelfärbung wurden 5000 bis 1000000 Ereignisse gemessen.

### 2.2.3.6 Auswertung der Daten und Gating Strategie

Die Messungen wurden mit FlowJo ausgewertet und zugehörige Abbildungen erstellt. Eine Nachbearbeitung erfolgte, falls nötig, mit GIMP. Diagramme wurden in LibreOffice Calc erstellt.

Im Folgenden wird die verwendete Gating Strategie erläutert (Abb 2.1). Das Gating ist ein wichtiger Bestandteil der Auswertung, um Aussagen auf bestimmte Teilpopulatio-

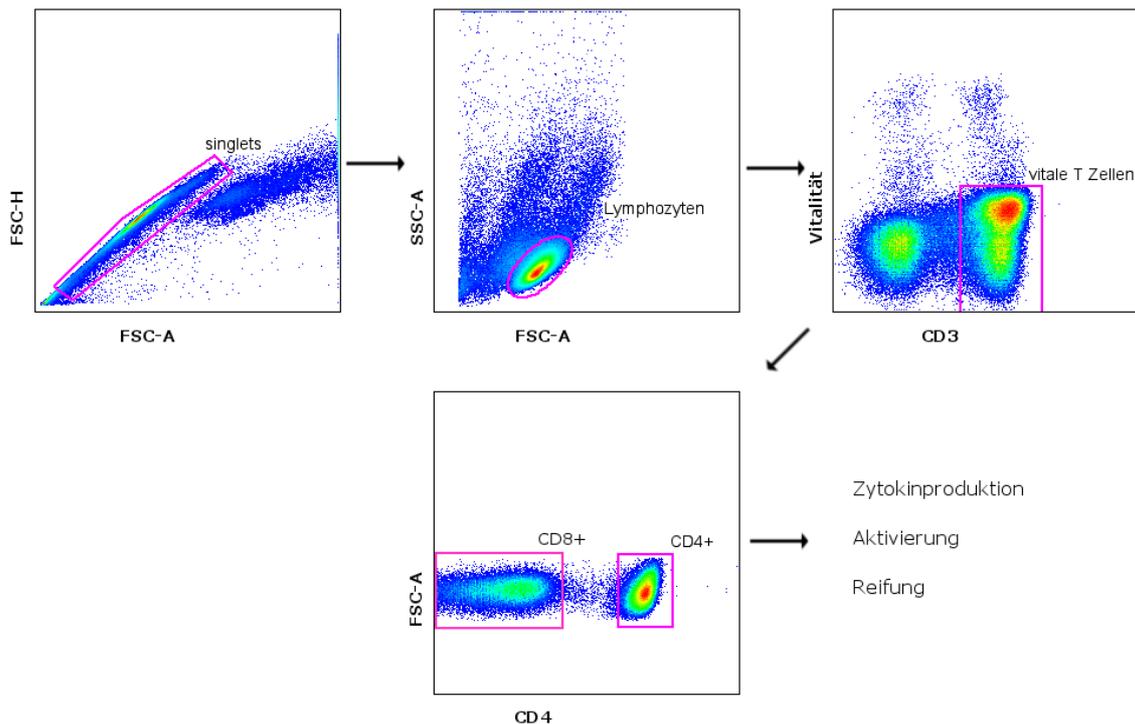


Abb 2.1: **Gating Strategie von den gesamten Zellen hin zur Charakterisierung einzelner T-Zellen.** In der oberen Zeile ist das stets angewendete Basis-Gating zu sehen. Singlets zeichnen sich durch einen linearen Zusammenhang zwischen FSC-H/A aus. Daraus werden über FSC-A/SSC-A die Lymphozyten ausgewählt. Vitale T-Zellen werden durch auftragen von CD3 gegen einen ViD bestimmt. Im Folgenden wurde, wenn nicht anders angegeben, mit CD4 gefärbt. Die resultierende Population konnte jetzt auf Zytokinproduktion, Expression von Reifungsmarkern oder Aktivitätsmarkern untersucht werden. Gefärbt wurde 1 PBMC nach Stimulation mit SEB. Die Darstellung entspricht nicht-stimulierten Proben (Daten nicht dargestellt).

nen einzuschränken und unerwünschte Ereignisse wie tote Zellen auszuschließen. Sie sollte möglichst konsistent sein, da sich prozentuale Aussagen andernfalls verschieben und die Vergleichbarkeit verloren geht. Ziel war vitale T-Lymphozyten herauszufiltern mit möglichst geringem Hintergrund.

Im ersten Schritt wurden Zellaggregate herausgefiltert, das ist durch Auftragen von *Forward Scatter* Fläche (FSC-A) gegen Höhe (FSC-H) möglich. Einzelne Zellen zeigen verhalten sich in beiden Signalen identisch und lassen sich somit von den Aggregaten unterscheiden. Dadurch wird die Ansicht im FSC-A gegen *Side Scatter* Fläche (SSC-A) übersichtlicher und es ließ sich anhand ihrer Größe und Granularität die typische Lymphozytenpopulation markieren. Bei Stimulationen länger als einen Tag muss berücksichtigt werden, dass einige Lymphozyten blastär werden und somit granulärer und größer

werden. Das ist ein Problem, weil sie damit im Scatter schlechter von den Monozyten abgrenzbar sind. Daher wurden zusätzlich nur CD3<sup>+</sup> Zellen in die Auswertung eingeschlossen. Im gleichen Schritt wurden die nekrotischen und apoptotischen Zellen über eine Färbung mit einem *amine reactive dye* ausgeschlossen. Zur genaueren Differenzierung der T-Zellen wurden dann weitere Marker herangezogen.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Panels zur Phänotypisierung von T-Zellen durch Multicolor-Durchflusszytometrie entwickelt. Das dazu nötige technische Grundwissen wurde in der Einleitung dargestellt. Im Folgenden wird vorgestellt, wie geeignete Bedingungen für die Zellstimulationen ermittelt wurden. Im Anschluss wird der Entwurf und die Erprobung eines Multiparameter-Durchflusszytometrie-Panels gezeigt. Dabei wird stets Bezug zu den vorgenommenen Messungen hergestellt und diese in den Kontext der Frage gestellt, wie T-Zellen sinnvoll klassifiziert werden können.

Zuletzt wurde die Methodik auf drei verschiedene Fragestellungen angewandt. Um einen Überblick zu geben, wurde das T-Zell-Repertoire von zwölf gesunden Blutspendern charakterisiert. Dieses Normalkollektiv wird beschrieben. Zuletzt wird gezeigt, wie ein Vielfarb-Panel in der Entwicklung von neuartigen Tumorstimmungen eingesetzt werden kann.

#### 3.1 Stimulationsbedingungen und Korrelate der Aktivierung

##### 3.1.1 Auswahl eines Stimulanz

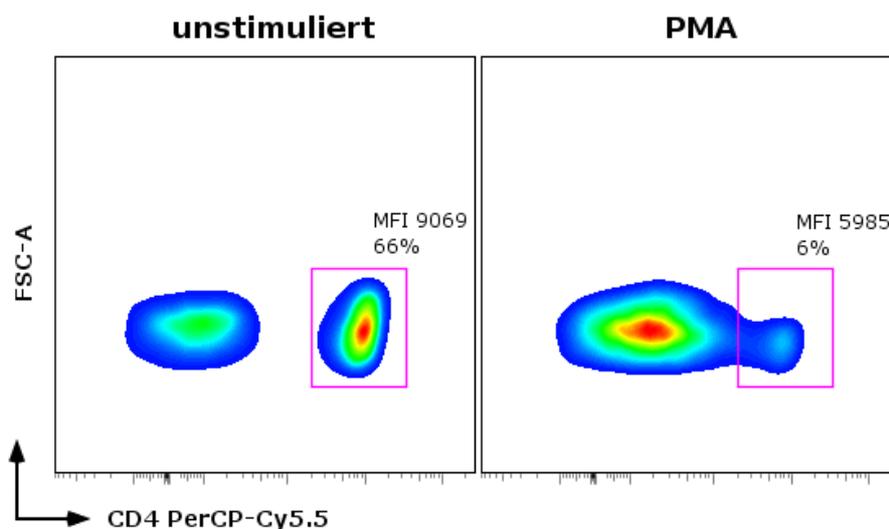


Abb 3.1: **Stimulation mit PMA macht Auftrennung der Zellen über CD4 unmöglich.** Zu sehen ist die Auftrennung von T-Zellen über CD4 unter verschiedenen Bedingungen. Unter PMA Stimulation (rechtes Bild) verringert sich der Anteil von CD4<sup>+</sup> Zellen gegenüber einer unstimulierten Probe (von 66% auf 6%). Die CD4-MFI der verbleibenden Population ist gesunken, was auf eine CD4-Herabregulation hinweist. Gated wurde auf T-Zellen. Die Daten sind repräsentativ für fünf Versuche unter Verwendung von FITC- oder PerCP-Cy5.5-Konjugaten. Gezeigt ist PBMC E nach 6h Stimulation mit 50ng/ml PMA (rechtes Bild) oder unstimuliert (linkes Bild).

Manche Zelleigenschaften, wie eine Zytokinproduktion, zeigen sich erst nach Zellaktivierung. Ein geeigneter Stimulator sollte einen großen Anteil der Zellen aktivieren, dabei aber weitgehend physiologisch agieren, um das untersuchte System wenig zu verändern. Die Stimulationszeit sollte kurz sein. In meinen Experimenten wurden folgende Stimulatoren auf ihre Eignung überprüft: In der Gruppe der polyklonalen Stimuli wurde das extrazellulär-wirkende Superantigen SEB, die anti CD3/CD28 Beads und das intrazellulär-wirkende PMA getestet. SEB nimmt eine Sonderrolle innerhalb der polyklonalen Stimuli

ein, da es eine Spezifität für TCR-V $\beta$  aufweist und nicht alle T-Zellen stimuliert. Der CMV-Peptidpool wurde stellvertretend für monospezifische Stimuli gewählt. Betrachtet man die Zytokinproduktion als Readout-Parameter, wirkten alle Substanzen innerhalb weniger Stunden. Für die Messungen war, übereinstimmend mit den Daten aus den Protokollen der eingesetzten Substanzen, eine Inkubation von 6-8h stets ausreichend. Jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Wirkweise und zeigen damit einige Besonderheiten.

PMA wird, insbesondere in der Kombination mit Ionomycin, häufig eingesetzt. Es wirkt mitogen durch Aktivierung der zytoplasmatischen Proteinkinase C (Manger et al. 1987). In den durchgeführten Experimenten war nach Stimulation eine saubere Auftrennung der T-Zellen über CD4 nicht mehr möglich (Abb 3.1). Die Abbildung zeigt, dass nach 6h Stimulation bereits eine starke Herabregulation von CD4 erfolgte. Der von 66% (unstimuliert) auf 6% (PMA) gesunkene Anteil von CD4<sup>+</sup> Zellen an T-Zellen ließ das Stimulanz als unbrauchbar erscheinen. Es wurden sowohl FITC, als auch PerCP-Cy5.5 Konjugate verwendet und in üblichen Konzentrationen stimuliert.

Die Stimulation mit anti CD3/CD28-Beads ist besonders, weil sie direkt am T-Zell-Rezeptor ansetzt und damit die natürliche Aktivierung imitiert. Dennoch zeigte ihre Anwendung Nachteile. Nach Stimulation ließen sich die Zellen nicht mehr über eine CD3-Oberflächenfärbung differenzieren (Abb 3.2).

SEB kommt der T-Zellaktivierung *in vivo* am nächsten. Es lagert sich in der Peptidbindungsgrube des T-Zell-Rezeptors an und führt zur Quervernetzung mit MHCII. Es aktiviert dadurch sowohl CD4<sup>+</sup>, als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Fleischer & Schrezenmeier 1988) und agiert unabhängig von deren Peptidspezifität, ist jedoch auf bestimmte TCR-V $\beta$  restringiert. Es kommt zur Aktivierung von 10-20% des T-Zell-Repertoires (Schütt & Bröker 2006). Weder führte SEB zu einer störenden Herabregulierung von CD4 (Daten nicht gezeigt) noch von CD3 (Abb 3.2).

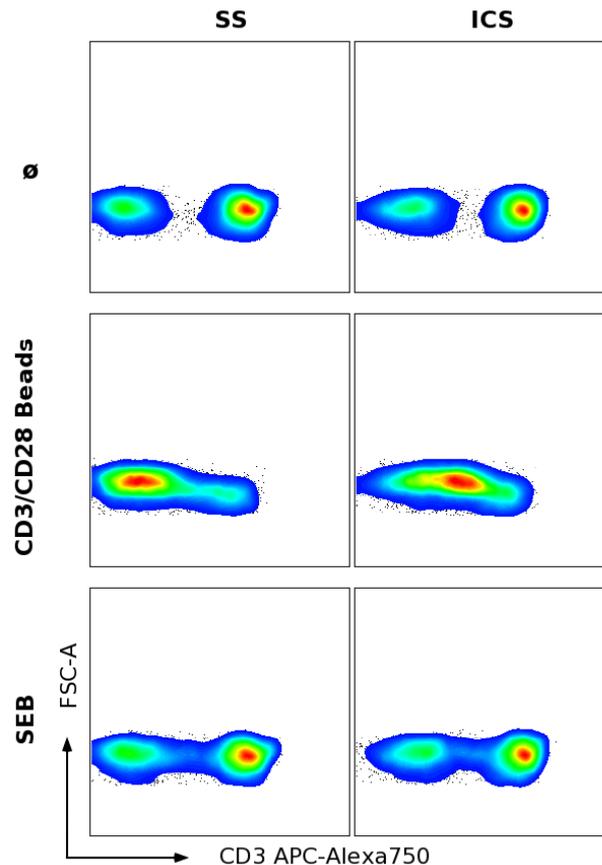


Abb 3.2: **Anti CD3/CD28 Beads führen zu einer Herabregulierung von CD3.** Verglichen wurden die drei Stimulanzien in ihrer CD3-Expression nach ICS oder SS. Ohne Stimulation können CD3<sup>+</sup> leicht getrennt werden. Nach Stimulation mit SEB ist eine Trennung möglich, jedoch entsteht eine größere Population CD3<sup>dim</sup> Zellen. Unabhängig von der Stimulation geben SS und ICS vergleichbare Ergebnisse. Gated wurde auf die Lymphozytenpopulation. PBMC G wurden 6h jeweils mit SEB, CD3/CD28-Beads oder ohne Stimulanz in der Anwesenheit von Monensin inkubiert. Gefärbt wurde dann jeweils SS oder ICS ausschließlich mit CD3 APC-Alexa750.

### 3.1.2 Inkubationszeit

Die Zellaktivierung ist ein langandauernder Prozess der verschiedene Phasen durchläuft. In diesem Versuch wurde die Zytokinproduktion als Readout-Parameter verwendet. Um Zellviabilität und Phänotyp möglichst nicht zu verändern und flexibler zu arbeiten, sollte die Inkubationszeit so kurz wie möglich gewählt werden. In diesem Fall bis die maximale Produktion von IL-2 und IFN $\gamma$  erreicht wurde. Die Ermittlung der optimalen Dauer wurde für SEB durchgeführt, das zuvor als optimales Stimulanz ausgewählt wurde (Abschnitt 3.1.1). Nach einer Stunde Stimulation zeigte sich wie erwartet noch keine Zytokinproduktion (Abb 3.3). Nach fünf Stunden erreichte die Produktion ihr Maximum und blieb im Mittelwert konstant.

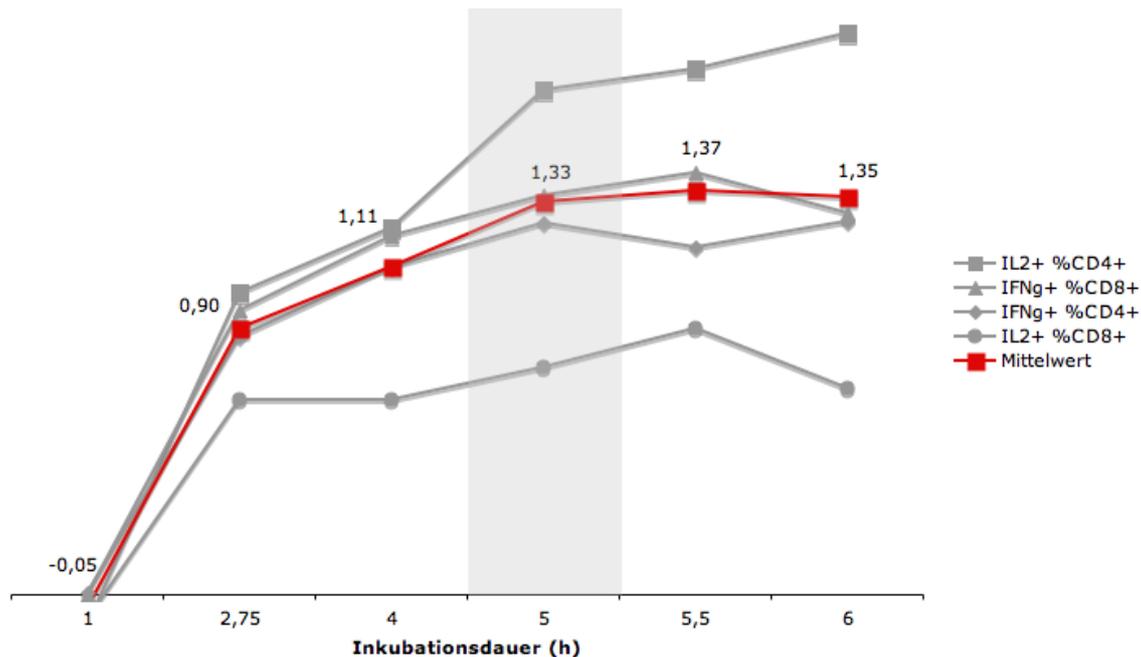


Abb 3.3: **5h Inkubation ist ausreichend für die Zellaktivierung.** Gezeigt sind Subpopulationen Zytokinproduzierender Zellen jeweils als Anteil von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Gesamtpopulation. Als Maß für Aktivierung wurden die Zytokine IL-2 und IFN $\gamma$  verwendet. Der Mittelwert dient als Anhaltspunkt für die gesamten Zytokinproduzenten. Das Gating erfolgte analog der eingangs vorgestellten Gating-Strategie auf CD4/CD8 T-Zellen. Gefärbt wurde 1 PBMC nach unterschiedlich langer Stimulation mit SEB unter Anwesenheit von Monensin.

In späteren Experimenten zeigte sich, dass auch eine längere Inkubation von 20h zu einer ausreichend starken Antwort bei den untersuchten Zytokinen (TNF, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-17) führte (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.3 Zelldichte

Als Korrelat der Aktivierung wurden hier repräsentativ CD154 und die beiden Zytokine TNF und IFN $\gamma$  gewählt. Damit sollten sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>-Antworten berücksichtigt werden. Im Gating wurden die CD3 Zellen nicht weiter differenziert. In diesem Versuch wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml als optimale Zelldichte ermittelt. Eine zu hohe Dichte führte zu mangelhafter Aktivierung (Abb 3.4). Da der Einfluss der Zelldichte auf die Aktivierung erst relativ spät im Verlauf der Arbeit systematisch untersucht wurde, wurden in den meisten anderen Experimenten Zelldichten von  $10^7$  Zellen/ml verwendet. Die Zytokinproduzenten verringerten sich bei zu hoher Dichte, um mehr als die Hälfte. CD154 ist offenbar weniger abhängig von der Dichte und schwankte insgesamt lediglich um 10%. Es zeigt dabei bei  $10 \cdot 10^6$  Zellen/ml einen erneuten Anstieg. Insgesamt führte dieser Versuch eine starke Abhängigkeit der Aktivierung von der Zelldichte vor Augen, zudem fiel insgesamt eine vergleichsweise starke Aktivierung auf (vgl. Abb 3.3). Zu beachten sind die veränderten Stimulationsmodalitäten in diesem Versuch. Denn statt 6h SEB/Monensin, wurde 8h mit SEB inkubiert und Monensin erst nach einer Stunde zugegeben. Dies entsprach nicht den gängigen Bedingungen (siehe 3.1.2).

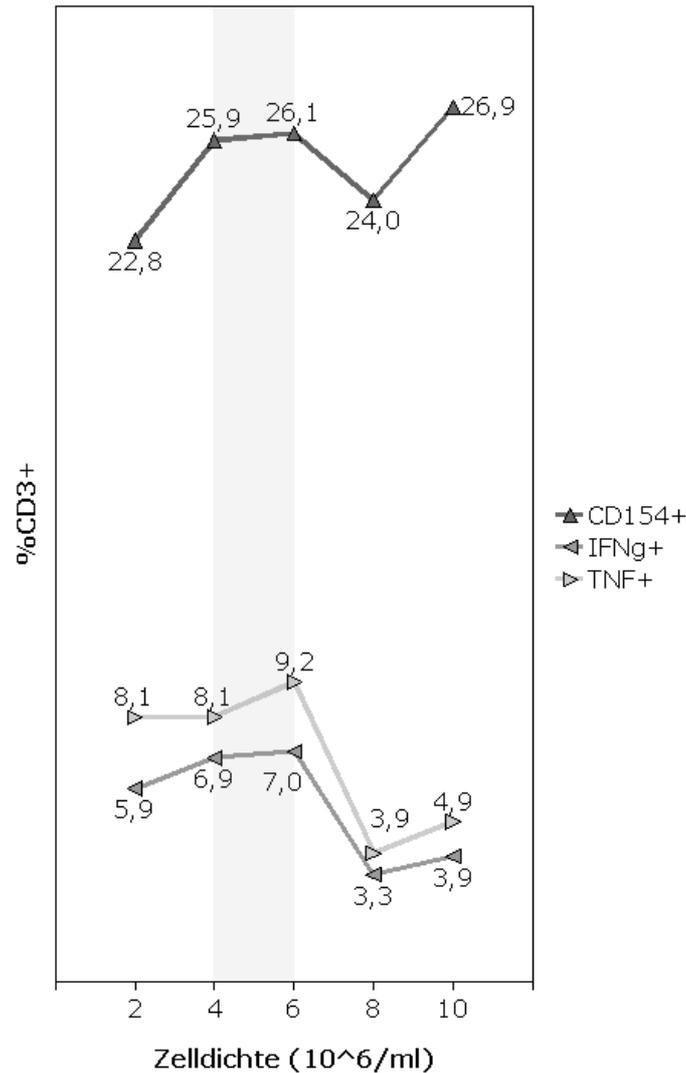


Abb 3.4: **Die Zelldichte beeinflusst das Ausmaß der Aktivierung von Zellen.** Eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml erwies sich als optimal. Als Korrelat für die Zellaktivierung wurden CD154, TNF und IFN $\gamma$  gemessen und der Anteil an positiven Zellen an gesamten T-Zellen dargestellt. Es wurde ein Abfall der Zytokinproduktion bei Konzentrationen höher als  $6 \cdot 10^6$  Zellen/ml beobachtet. Die CD154-Expression reagierte nur mit leichten Schwankungen auf die Änderungen. Darstellung der Werte erfolgte nach Herausrechnen der unstimulierten Proben. Diese zeigten nur eine geringe Reaktion (CD154: <3,3%, IFN $\gamma$ : <0,6%, TNF: <1,7%). Gating analog der eingangs vorgestellten Gating-Strategie. Gefärbt wurden 2 PBMC X6 nach 8h Inkubation mit SEB, nach 1h wurde Monensin zugegeben. Die Kultur wurde angelegt in 96er-well Rundbodenplatten.

### 3.1.4 Korrelate der Aktivierung

Um Zellen zu charakterisieren, die für einen Stimulus spezifisch sind, sollte als erster Schritt ein Korrelat der Aktivierung definiert werden. Dafür können Zytokine oder spezielle Oberflächenmarker verwendet werden. Jedem Korrelat der Aktivierung ist eine eigene zeitliche Dynamik inne. Da die optimale Stimulationszeit mit 6h ermittelt wurde, wurden die Marker anhand dieser Zeitvorgabe verglichen. Es wurden die Oberflächenmoleküle CD25, CD69 und CD154 verglichen (Abb 3.5). Um Wechselwirkungen zwischen den Markern zu vermeiden und die Messung unabhängig von den Eigenschaften der Fluorochrome zu gestalten, wurden die Antikörper in getrennten Reagenzgläsern ange-setzt. Man beachte die eingeschränkte Vergleichbarkeit der absoluten Werte dieser Mes-

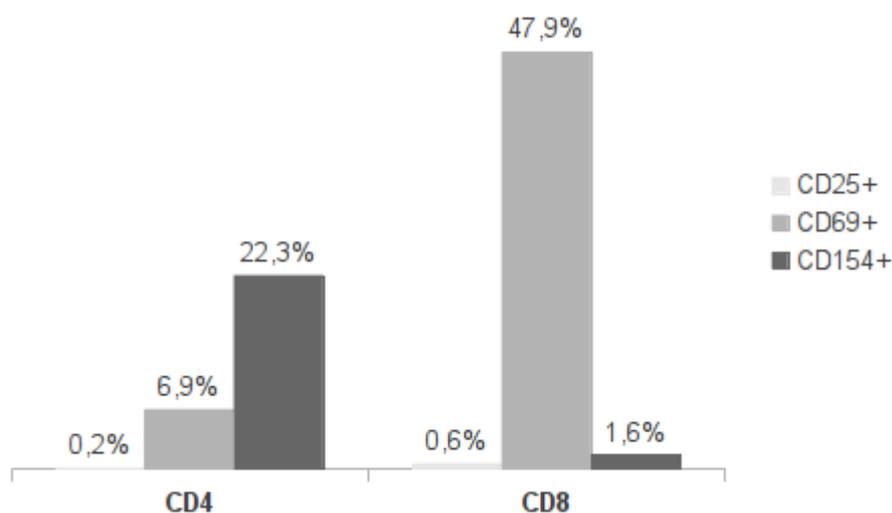


Abb 3.5: **Populationsspezifität und Eignung in der Kurzzeitstimulation verschiedener Aktivierungsmarker im Vergleich.** Dargestellt ist der Anteil der aktivierten Zellen innerhalb der CD4, bzw. CD8-Population nach Kurzzeitstimulation. CD25 zeigt keine nennenswerte Reaktion. CD69 markiert insbesondere CD8 T-Zellen und lieferte ein hinreichend starkes Signal für CD4-Zellen. CD154 markiert CD4 Zellen am stärksten, CD8 Zellen exprimieren den Aktivierungsmarker offensichtlich nicht. Gating auf CD3<sup>+</sup> Zellen. PBMC A/B wurden nach 6h Inkubation mit CD3/CD28-Beads gefärbt. Je Röhrchen wurde ein Aktivierungsmarker mit PE-konjugiertem Antikörper gefärbt. Werte berechnet als Differenz von stimulierten und unstimulierten Proben.

sung anderen Versuchen dieser Arbeit, da CD3/CD28-Beads anstelle von SEB zur Stimulation eingesetzt wurden. Im Gating wurden CD4 und CD8 innerhalb der T-Zellen unterschieden, um eine Populationsspezifität darzustellen. Die CD25-Expression stieg gegenüber der Ausgangsmessung nach 6h um 0,2% (CD4) beziehungsweise 0,6% (CD8) an, und verhielt sich unabhängig von der CD4-Expression. Eine CD69-Expression konnte auf beiden Populationen nachgewiesen werden in Höhe von 6,9% (CD4) und 47,9% (CD8). Auffallend ist, dass fast die Hälfte der CD8-Population markiert wurde. CD154 wird unter den verglichenen Markern mit 22,3% am höchsten auf CD4-Zellen exprimiert. CD154 wird hingegen kaum auf CD8-Zellen exprimiert (1,6%).

In einem weiteren Vergleich wurden CD137 und CD154 gegenüber gestellt (Abb 3.6). Die Simulationszeit betrug wie im vorherigen Versuch 6h. Um Wechselwirkungen zwischen den Markern zu vermeiden und die Messung unabhängig von Fluorochrom-Konjugaten zu gestalten, wurden die Antikörper in getrennten Reagenzgläsern angesetzt. Man beachte die eingeschränkte Vergleichbarkeit der absoluten Werte dieser Messung mit dem vorhergehenden Versuch, da SEB anstelle von CD3/CD28-Beads zur Stimulation verwendet wurde. Im Gating wurden CD4 und CD8 innerhalb der T-Zellen unterschieden, um die Populationsspezifität darzustellen. In der Gruppe der CD4-Zellen war CD154 (34,0%) CD137 (11,2%) deutlich überlegen. Bei CD8-Zellen hingegen zeigte CD137 (9,2%) eine stärkere Färbung gegenüber CD154 (2,8%).

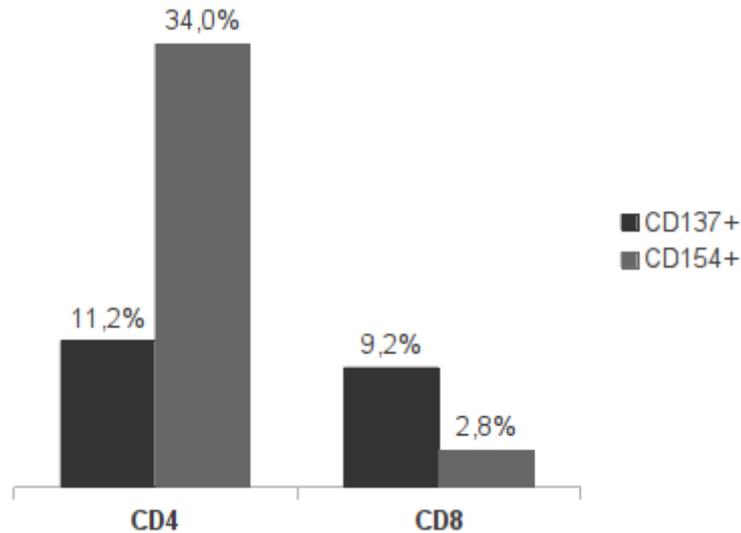


Abb 3.6: **Direktvergleich der Populationsspezifität von CD137 und CD154.** Dargestellt ist der Anteil der aktivierten Zellen innerhalb der CD4, bzw. CD8-Population nach Kurzzeitstimulation. CD154 färbt die CD4 Zellen stärker an, CD137 hingegen färbt CD8 Zellen stärker an. PBMC E wurde nach 6h Inkubation mit SEB und Monensin gefärbt. Je Röhrchen wurde ein Aktivierungsmarker mit PE-konjugiertem Antikörper gefärbt. Werte berechnet als Differenz von stimulierten und unstimulierten Proben.

Somit wurde CD154 als geeigneter Marker für CD4-Populationen und CD69, beziehungsweise CD137, als geeignete Marker für CD8-Populationen in der Kurzzeitstimulation ermittelt.

### 3.1.5 Ermittlung der Zellviabilität

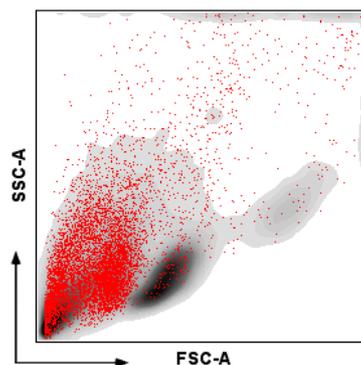


Abb 3.7: **Apoptotische Zellen sind auch im Lymphozytengate zu finden.** In der Grafik wurden durch PI als apoptotisch markierte Zellen (rot) über die Gesamtzellen (grau) gelegt. Höhere Grauwerte bedeuten eine größere Eventdichte. Gefärbt wurde ein unbehandelter PBMC X3.

In den Versuchsansätzen tauchen stets tote Zellen auf. Es gibt verschiedene Methoden diese von den vitalen Zellen zu unterscheiden und somit aus der Auswertung auszuschließen. In Abb 3.7 ist die Lymphozytenpopulation (dunkelgrau) Bezugspunkt. Von dort grenzt sich eine Monozytenpopulation mit höheren FSC/SSC-Werten als Insel ab. Die Granulozyten haben höhere SSC-Werte und sind teilweise am oberen Rand des Dotplots

gestaut. Tote Zellen (rot) sind mit PI markiert und über diese Darstellung geblendet. Sie lassen sich über ihre veränderten Eigenschaften im Scatter abgrenzen. Zum größten Teil sind sie kleiner bzw. granulärer als die lebende Lymphozytenpopulation (dunkelgrau). Mit niedriger Frequenz lassen sie sich jedoch auch innerhalb der Lymphozytenpopulation finden.

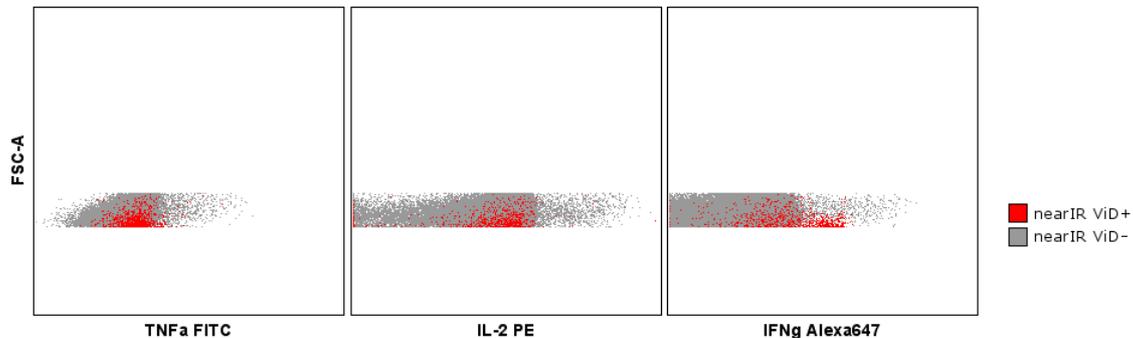


Abb 3.8: **Avitale Lymphozyten binden unspezifisch stärker IFNg, aber nicht TNFa und IL-2 als die vitalen Lymphozyten.** Im Hintergrund sind die vitalen Zellen (grau) dargestellt, überlagert durch avitalen Zellen (rot). Dies unterstreicht die Wichtigkeit eines Vitalfarbstoffes im Färbepanel. Gegated wurde auf T-Zellen. Gefärbt wurde 1 PBMC G nach 6h Stimulation mit SEB.

Eine weitere Untersuchung der avitalen Zellen zeigte, dass diese unspezifisch Antikörper binden (Abb 3.8, IFNg-Alexa647 Konjugat). Gegenüber der Gesamtpopulation (grau, nearIR ViD<sup>-</sup>) färbte sich ein unverhältnismäßig großer Anteil an toten Zellen (rot, nearIR ViD<sup>+</sup>) positiv für IFNg.

Es stehen mehrere Marker für die Nutzung im Flow Cytometer zur Verfügung. Um die Aussagekraft des recht neuen *amine reactive dyes* nearIR zu validieren, wurde er mit dem etablierten PI verglichen. Dabei wurden Zellen mit verschiedenen Methoden getötet, und die Anfärbungen beider Totfarbstoffe gegenüber gestellt, um Unterschiede aufzudecken (Abb 3.9). Der Hersteller bietet die *amine reactive dyes* in zahlreichen Farben an. Es wurden die Farben nearIR und aqua untersucht, da sich diese in Bezug auf ihre Absorptions- und Emissionsspektren ähnlich verhalten wie APC-Cy7 und AmCyan. Die Ergebnisse waren für beide Farbstoffe ähnlich. Der Einfachheit halber sind in Abb 3.9 nur die Ergebnisse für nearIR dargestellt. Im Vergleich hierzu wird PI im PerCP-Kanal gemessen.

Mauslymphozyten wurden verwendet, da diese nicht nur sensibel auf Hitze und Staurosporin reagieren, sondern auch auf ATP-Behandlung (A). Zur Validierung wurden unstimulierte PBMCs (B) mit unstimulierten Mauslymphozyten verglichen. PI trennte vitale und avitale Zellen deutlicher als nearIR ViD in ihrer Intensität, zu sehen insbesondere in den unstimulierten Proben. Die höhere Intensität der negativen Population in der nearIR Färbung im Vergleich zu PI ist zwar korrekt, jedoch abhängig von den jeweiligen PMT-Einstellungen im Kanal. Weiterhin zeichnete die Färbung mit PI einen kontinuierlichen Verlauf des Zelltodes was dem physiologischen Vorgang in vivo näher kommt. Dies wurde augenfällig in den Staurosporin-behandelten Proben. nearIR ViD zeichnete eher ein schwarz-weiß-Bild von lebend zu tot. Möchte man jedoch in die Apoptose eintretende Zellen nicht getrennt von bereits toten Zellen betrachten spielt dies keine Rolle und die

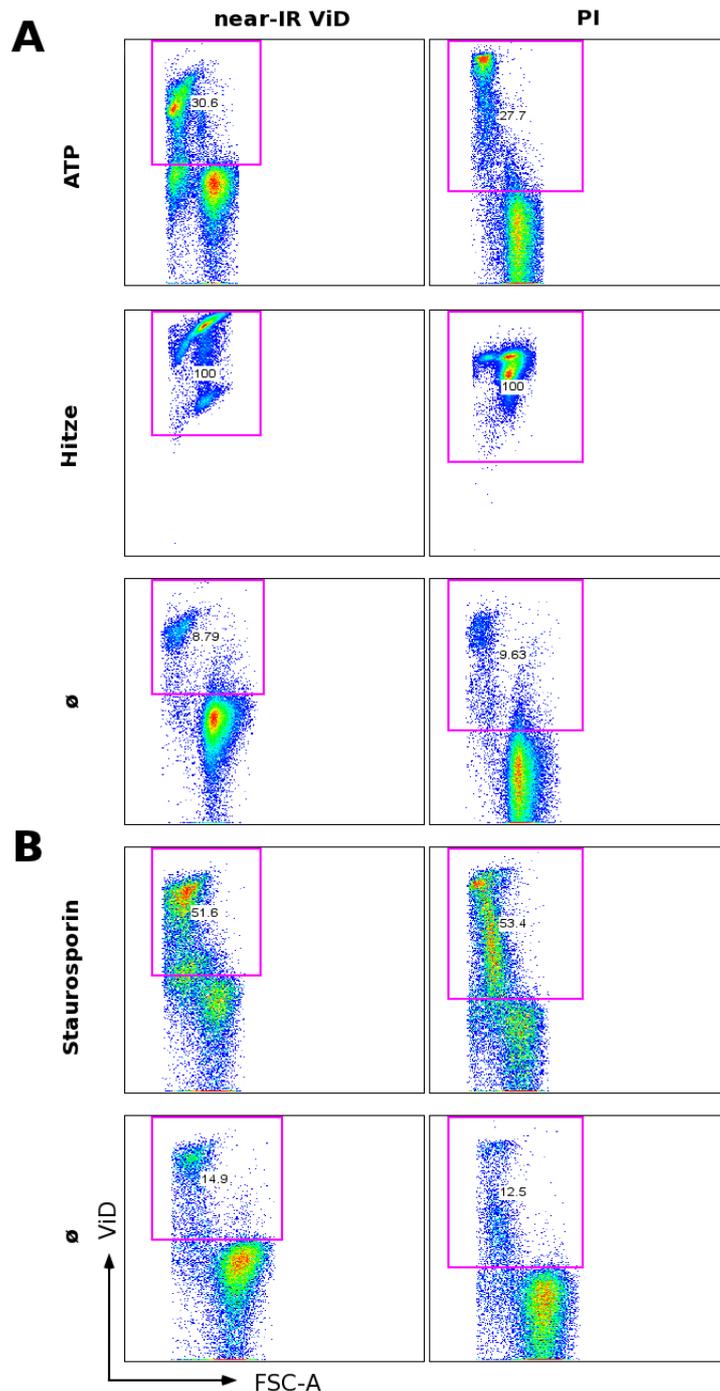


Abb 3.9: **PI und nearIR ViD sind gleichwertig in ihrer Erkennung apoptotischer Zellen.** Hierfür wurden Milzzellen aus der Maus (A) verschiedenen toxischen Bedingungen ausgesetzt. Zum Vergleich wurde PBMC X3 herangezogen (B). Tote Zellen zeigen sich durch eine stärkere Fluoreszenz im Kanal des Vitalfarbstoffs (rosa Box). Folgende Stressbedingungen wurden angesetzt: (A) 1. Reihe: 250µM ATP für 30min, 2.Reihe:5min bei 70°C im Wasserbad, 3. Reihe: Unstimuliert für 7,5h bei 37°C., (B) 1. Reihe: 7,5h mit 5µM Staurosporin bei 37°C, 2. Reihe: Unstimuliert für 7,5h bei 37°C. Ein Großteil der apoptotischen Zellen lässt sich anhand ihres niedrigeren Signal im FSC erkennen. PI (rechte Spalte) färbt den Zelltod als kontinuierliches Ereignis, wohingegen der ViD (linke Spalte) eher ein schwarz-weiß Bild zeichnet (gut sichtbar nach Staurosporinbehandlung). Gated wurde auf Gesamtlymphozyten.

Gesamtzahl, der als tot erkannten Zellen ist mit beiden Farbstoffen vergleichbar. Die Hitze-Behandlung (5min bei 70°C) war offenbar zu hoch gewählt, denn sämtliche Zellen

wurden als tot markiert.

### **3.2 Entwicklung von Färbepanels**

Ein Färbepanel bezeichnet eine feste Kombination von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern. Die Auswahl der Antikörper richtet sich nach der individuellen Fragestellung. Die Auswahl der Fluorochrome erfordert einige Vorüberlegung, da sie letztlich die Qualität des Panels bestimmt.

In den letzten Jahren stieg die Zahl der messbaren Farben in der Durchflusszytometrie rasant an. Derzeit werden – entsprechende Geräte vorausgesetzt - bis zu 18 Farben simultan in einer Probe zu kombiniert (Duvall et al. 2008). Doch steigen mit zunehmenden Möglichkeiten auch die Schwierigkeiten, daher ist ein planvolles Vorgehen sinnvoll (Roderer 2001).

Im Zentrum steht die Problematik der spektralen Überlappung, der einerseits mit einer sorgfältigen Auswahl und Testung der Antikörper und andererseits mit korrekter Kompensation zu begegnen ist. Zudem können einzelne Antikörper unerwartete Wechselwirkungen oder Besonderheiten zeigen, wie z.B. Inkompatibilität mit Fixierung. Dies sollte im Vorfeld erfasst werden.

Im Folgenden Abschnitt wird beispielhaft die Erstellung eines 7-Farben Panels beschrieben. Darauf aufbauend wird Abwandlung des Grundpanels für spezielle Fragestellungen gezeigt. Anbei werden Hintergrundinformationen erwähnt und auf beobachtete Probleme eingegangen.

#### **3.2.1 Zielfestlegung**

Das erstellte Panel soll die Möglichkeiten des FACSCanto II möglichst ausschöpfen. Es sollten aus den Gesamtzellen über die Darstellung im Scatter Lymphozyten betrachtet werden. Wie später ausführlich betrachtet, sollten tote Zellen über einen Farbstoff aus der Auswertung entfernt werden um die Messung sensitiver zu machen für antigenspezifische Stimulationen. Innerhalb der Lymphozyten sollten die Populationen Helfer und zytotoxische T-Zellen, NK Zellen und CD56<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen unterschieden werden. Dafür werden die Marker CD3, CD4/CD8, CD56 und ein Totfarbstoff benötigt. Zur Trennung von CD4 und CD8-Zellen wurden CD4-Antikörper allein eingesetzt. Es wurde auf die Zugabe CD8 verzichtet, weil innerhalb der T-Zellen T-Helfer-, T-Zytotoxische- und NKT-Zellen mit Hilfe von CD4 und CD56 hinreichend abgrenzbar sind. Auf den verbleibenden Kanälen können nun verschiedene Marker platziert werden, wie Zytokine, Aktivierungsantigene oder Marker, die bestimmten Differenzierungsstadien von T-Zellen zugeordnet werden.

#### **3.2.2 Auswahl der Antikörper**

Die Ermittlung geeigneter Fluorochrom-Antikörper-Konjugate kann mit Mitteln der Empirie erfolgen, indem alle möglichen Kombinationen getestet werden, wie von McLaughlin et al. vorgestellt (McLaughlin et al. 2008). Nachteile einer rein empirischen Herangehensweise, wie große Kosten und hoher Zeitaufwand liegen jedoch auf der Hand. Zusätzlich ist das Angebot von Konjugaten eingeschränkt. Daher bestand der hier eingeschlagene Weg aus einer Kombination von theoretischer Vorüberlegung und empirischer Testung, was schließlich zum Erfolg führte.

In die Vorüberlegungen werden neben dem Wissen über die Expressionsstärke der untersuchten Antigene folgende Daten mit einbezogen: (a) Die Leuchtintensität (*Stain index*) der Fluorochrome: Für die Auflösung von feinen Unterschieden in den Expressionsstärken von Markern wird eine hohe Leuchtintensität benötigt. Daher wurden starke Marker (hohe Expressionsstärke; klare Trennung von positiven und negativer Population) und schwache Marker (Kontinuierliche Expression z.B. bei Aktivierungsmarkern, oder undeutliche Trennung von Populationen oder niedrige Frequenz bei Zytokinen) unterschieden. (b) Spillover-Eigenschaften der Fluorochrome.

Um den Aufwand weiter zu reduzieren und flexibel zu bleiben, empfiehlt es sich, ein Grundpanel zu entwerfen. Dieses enthält Marker, die nötig sind, um häufig betrachtete Populationen zu trennen, und lässt Platz für Erweiterungen. Die Kanäle für FITC, PE und APC wurden freigelassen um das Panel zu erweitern. Die drei Fluorochrome sind etabliert, zeigen eine starke (PE, APC) bis ausreichende (FITC) Leuchtstärke und empfangen wenig Spillover im Vergleich zu anderen Kanälen. Zusätzlich sind viele Konjugate auch neuerer Antigene verfügbar. Damit sind sie gut geeignet, um schwache Marker von aktuellem Interesse zu messen. Aus vorangegangenen Betrachtungen haben sich drei sinnvolle Grundpanels ergeben:

<i>I</i>	<i>CD4 PerCP-Cy5.5</i>	<i>CD56 PE-Cy7</i>	<i>nearIR ViD</i>	<i>CD3 PacificBlue</i>
<i>II</i>	<i>CD4 PerCP-Cy5.5</i>	<i>CD56 PE-Cy7</i>	<i>aqua ViD</i>	<i>CD3 PacificBlue</i>
<i>III</i>	<i>CD4 PerCP-Cy5.5</i>	<i>CD56 PE-Cy7</i>	<i>aqua ViD</i>	<i>CD3 APC-Alexa750</i>

Als nächste Schritte stehen die Titration sämtlicher Antikörper und das Testen der entwickelten Kombinationen an.

### 3.2.3 Titration der Antikörper

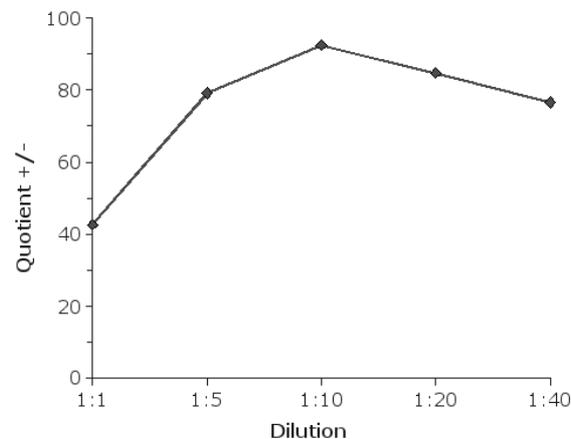


Abb 3.10: **Die Trennung von positiver und negativer Population ist abhängig von der Konzentration des Antikörpers.** Dargestellt ist hier der Quotient aus dem Median der positiven und der negativen Population gegen eine Verdünnungsreihe des Antikörpers. Man sieht, dass die Verdünnung auf 1:10, eine Verbesserung der Trennung gegenüber der Herstellerempfehlung gibt (1:1). Dies ist auf unspezifische Bindung des Antikörpers bei hoher Konzentration in der negativen Population zurückzuführen. Wie zu erwarten, nimmt bei weiterer Verdünnung die Intensität der Färbung stetig ab. Gezeigt ist eine CD3 APC-Alexa750 Einzelfärbung von PBMC X3; Gegated wurde auf Lymphozyten.

Jeder Antikörper wurde vor seiner Verwendung sorgfältig titriert (Ergebnisse siehe Abschnitt 2.1.3). Dies ist einerseits notwendig um Gelder zu sparen, andererseits auch um optimale Ergebnisse zu erhalten. Zu hohe Antikörperkonzentrationen können in einer starken unspezifischen Bindung resultieren und somit Abgrenzung von Populationen erschweren (Abb 3.10). Wie gezeigt wird, schafft ein häufigeres Waschen der Zellen Abhilfe, ist jedoch weder ökonomisch noch ökologisch sinnvoll. Zudem verbessert eine geringe Fluoreszenzintensität die Sensitivität in überstrahlten Kanälen, denn Spillover verhält sich proportional zur Intensität. Im Gegensatz kann zu wenig Antikörper zu einer schlechten Abgrenzung von Populationen führen und auch zur quantitativen Unterbewertung dieser. Um festzustellen welche Verdünnung optimal ist, wurde ein Stufenschema entwickelt.

Titriert wurde meist in einer Einzelfärbung, um Wechselwirkungen zu verhindern. Es kann jedoch sinnvoll sein Antikörper hinzuzugeben, wenn Oberflächenmoleküle mit niedriger Frequenz gefärbt werden. Beispielweise wurde bei der Titration von IL-2 PE ein CD3 Pacific Blue zugegeben, um durch Gating den Hintergrund zu minimieren. Wichtig ist hier, dass der helfende Antikörper nicht oder kaum in den Kanal des zu messenden Antikörpers einstrahlt und das korrekt kompensiert wird. Gegated wird bei der Titration nach dem vorgestellten Schema (Kantor & Roederer 1997).

Erster Schritt ist die Darstellung der Färbung in einem Histogramm (Abb 3.11). Können positive und negative Zellen unterschieden werden (a)? Wenn nicht wurde zu stark verdünnt. Andernfalls wird jeweils der Median der Populationen berechnet und der Quotient gebildet. Dies ist ein Maß für die Qualität der Abgrenzung. Zusätzlich wird der Anteil der positiven Zellen im Gate notiert. Die erhobenen Daten werden in einer Tabelle zu-

sammengefasst. Der Anteil der positiven Zellen darf bei stärkerer Verdünnung nicht abfallen (b), andernfalls werden Frequenzen falsch eingeschätzt. Dies kann leicht bei Markern mit kontinuierlichem Verlauf der Färbung geschehen, wie z.B. CD154. Zur besseren Interpretation wird der Quotient gegen die Verdünnung in einem Diagramm dargestellt, wie in Abb 3.11 gezeigt. Das nächste Kriterium ist, dass der Quotient nicht unter 10 abfallen darf (c), dies objektiviert die optische Beurteilung. Bei der Auswahl der Verdünnung ist schließlich die Stärkere aus Kostengründen zu bevorzugen (d). Zu beachten ist grundsätzlich, dass die Anzahl der Waschgänge die Sauberkeit der Trennung von positiver und negativer Population mitbestimmt, durch Lösen von unspezifisch gebundenem Antikörper (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.4 Kompensation

In der Multicolor-Durchflusszytometrie wachsen stetig die Möglichkeiten durch neue Geräte und Farbstoffe. Dabei spielt dann auch die Kompensation eine immer bedeutendere Rolle.

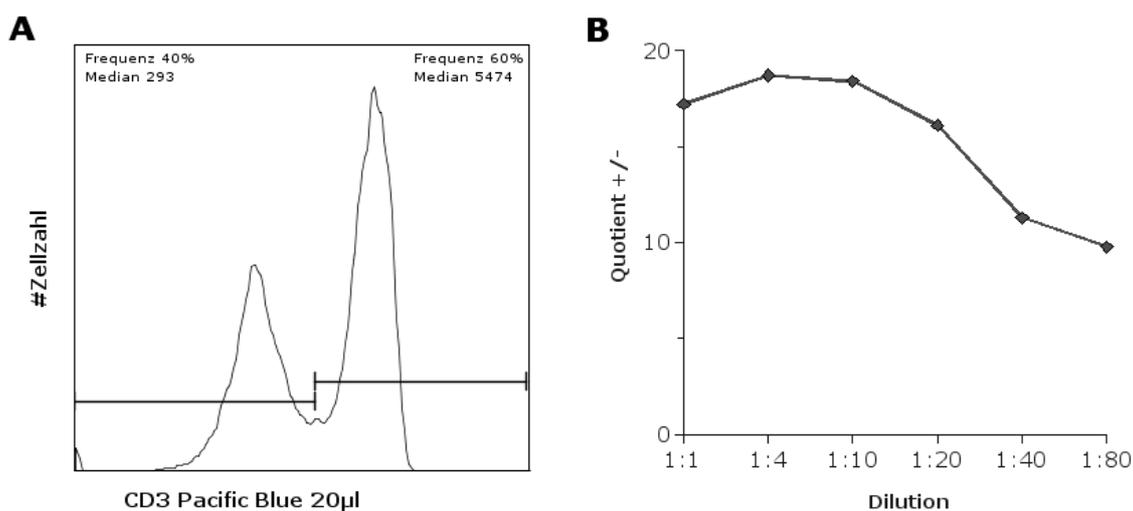


Abb 3.11: Systematisches Vorgehen bei der Titration am Beispiel von CD3 Pacific Blue.

Aus der detaillierten Darstellung im Einleitungsteil dieser Arbeit ergeben sich folgende sinnvolle Vorgehensweisen: Es sollten Kompensationsbeads statt Zellen genutzt werden. Die hier verwendeten Beads können Maus-IgG binden und weisen eine einheitliche Autofluoreszenz auf. Durch starke Affinität und Kapazität erzeugen sie ein kräftiges Signal im Detektor und können damit immer deutlich vom Hintergrundsignal getrennt werden. Auch Antikörper für zellulär schwach exprimierte Antigene erzeugen ein starkes Signal. Durch Vergleichen von Einzelfärbungen mit einer ungefärbten Probe werden spektrale Überlappungen einzelner Farbstoffe klar getrennt. Um das Messsignal zu quantifizieren und zu vergleichen ist die Beschreibung als Median über die Intensität sinnvoll. Dies ist objektiv und gegenüber dem Mittelwert weniger beeinflussbar durch einzelne Ausreißer in der Messung.

In der Darstellung kompensierter FC-Daten fällt häufig eine Ansammlung von Zellen auf der Achse auf. Ereignisse mit niedriger Intensität können durch die Kompensations-Subtraktion negative Werte erhalten. Diese Ereignisse können dann entweder verworfen oder auf der Achse aufgestaut werden. Beides ist nicht zufriedenstellend. Eine Lösung ist die von Tung et. al. vorgestellte logische Datenvisualisierung, die negative Werte ermöglicht und im Bereich um Null herum linear skaliert (Tung et al. 2004). Neuere FC-Software beherrscht diese Darstellung.

Betrachtet man die Einzelfärbungen für eine Kompensation, so fällt eine Streuung der positiven Population im Spillover empfangenden Kanal, gegenüber der negativen Population auf. Dies ist zurückzuführen auf Fehler, die durch die statistische Variation von detektierten Photonen in der Messelektronik auftreten und wird verstärkt durch Kompensation. Der Fehler steigt proportional mit der Quadratwurzel der Messintensität und ist somit auffälliger bei höheren Intensitäten. Ihm kann einerseits mit einer Erhöhung der Photonenzahl am Detektor begegnet werden (helle Fluorochrome, niedrige Flussrate der Probe). Andererseits sollte ihm mit entsprechend gestalteten Kontrollen zum Setzen von Gates Rechnung getragen werden. Der Fehler lässt sich nicht durch Überkompensation beseitigen, da dies ein linearer Vorgang ist.

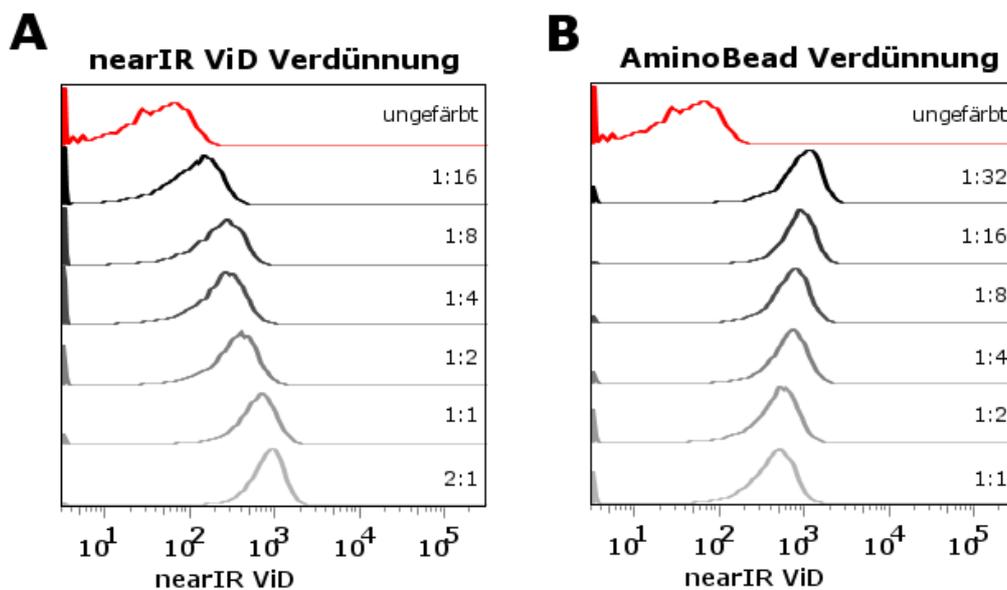


Abb 3.12: **Ermittlung der maximalen Intensität einer AminoBead Färbung.** Zuerst wurde ermittelt wie sich die Verdünnung des nearIR ViD auf die Fluoreszenzintensität auswirkt (A). Es zeigt sich, dass die Beads bis zur getesteten Menge von 2µl des Farbstoffs steigerbar ist. Ebenso verhält es sich mit einer Verdünnung der AminoBeads (B). Hier ist im Gegensatz zu den Kosten bei der Menge des eingesetzten Farbstoffs die Flussrate am Zytometer limitierend. Es zeigt sich auch hier keine Sättigung. Bis zu einer Verdünnung von 1:32 nimmt die Intensität der Färbung zu. In (A) wurde 1µl (1:1) nearIR ViD und in (B) 0,5µl (1:2) AminoBeads eingesetzt. Gated wurde auf die Bead Population.

Die CompBeads wurden jeweils mit der Menge Antikörper gefärbt, die auch bei der Messung von Proben eingesetzt wurden. Damit wurde das maximal mögliche Signal gemessen. Für die Bestimmung des Spillover der Totfarbstoffe aqua ViD und nearIR ViD

wurden AminoBeads eingesetzt. Diese wurden vom Hersteller nicht für diesen Einsatz getestet, daher mussten Antikörper und AminoBeads titriert werden. Das Ergebnis zeigt Abb 3.12. Wie erwartet, nimmt bei Verdünnung des Fluorochromes (A) die Intensität ab. Auch bei der größten getesteten Menge des Fluorochromes (2 $\mu$ l) liegt die Intensität mit 10<sup>3</sup> noch unter der Intensität die tote Zellen erreichen (10<sup>5</sup>). Eine weitere Erhöhung der Antikörper-Menge erscheint bei Betrachtung der Titration nicht sinnvoll, denn der Median der Intensität erhöhte sich durch Erhöhung der Konzentration um den Faktor 32 lediglich um den Faktor 10. Des Weiteren würde es die Kompensation teurer machen. Um die Intensität der Färbung zu erhöhen wurde ebenfalls die Anzahl der AminoBeads reduziert (B). Wie erwartet, zeigte sich eine Erhöhung der Intensität. Die Verdünnung wurde jedoch begrenzt durch die Flussrate am Durchflusszytometer. Eine annehmbare Flussrate ließ sich bis zu einer Verdünnung von 1:16 erzielen. Somit wurde als Kompromiss in den Experimenten 1:16 $\mu$ l AminoBeads mit 1 $\mu$ l nearIR ViD gefärbt. Die Intensität reichte in diesem Setting aus, um positive und negative Population zu unterscheiden.

Durch die Nutzung von zwei unterschiedlichen Bead-Arten (CompBeads binden nur Antikörper) musste eine getrennte Negativ-Kontrolle für beide bereitgestellt werden.

	APC	nearIR ViD	FITC	aqua ViD	PE	PE-Cy7	Pacific Blue	PerCP-Cy5.5
APC		24%						1%
nearIR ViD	1%					2%		
FITC				3%	74%			2%
aqua ViD		2%					14%	
PE								4%
PE-Cy7		11%			8%			3%
PacificBlue				42%				
PerCP-Cy5.5	3%	17%				25%	1%	

Tabelle 8: **Matrix über die spektrale Überlappung von eingesetzten Fluorochromen.** Der Lesbarkeit halber wurden Werte unter 1% nicht aufgeführt. Jede Zeile enthält den Spillover eines Fluorochroms in andere Kanäle (*Spalten*). Die Fluorochrome APC und FITC eignen sich durch geringen Empfang von Spillover zur Messung schwacher Marker wie Zytokine. Ein Marker der deutlichen Spillover zeigt, wie PerCP-Cy5.5 kann zum Ausgatten von unerwünschten Populationen eingesetzt werden oder ebenfalls zur Markierung schwacher Marker. Der Einfachheit halber werden Kanäle in der Matrix durch ihre typischen Farben repräsentiert. Die Matrix wurde mit Hilfe von Antikörper-bindenden Beads erhoben.

Aus der Messung von Bead-Einzelfärbungen, wurden mit FlowJo die Kompensationsmatrizen berechnet (Tabelle 8). Genaues Studium der Intensitäten und des Spillover von Fluorochromen ist essentiell für das Design eines erfolgreichen Färbepanels. Zur besseren Lesbarkeit wurden die Koeffizienten in Prozentwerte gewandelt und Werte < 1% weggelassen. Die erste Spalte enthält die genutzten Fluorochrome. Die spektrale Überlappung in andere Kanäle lässt sich dann in ihrer Zeile ablesen. Daraus lassen sich einige interessante Schlüsse ziehen. FITC empfängt keinen Spillover, strahlt aber bedeutend in den PE-Kanal. Damit eignet sich FITC trotz seiner geringen Leuchtstärke zur Messung von Zytokinen, denn seine Sensitivität wird nicht beeinträchtigt und durch die geringe Anzahl von positiven Events stört der Spillover nicht. Es ist zu sehen, wie viel Spillover nearIR ViD (APC-Alexa750) empfängt, was seine Eignung für leicht zu differenzierende Popu-

lationsmarker wie CD3 nur unterstreicht. Durch geschicktes Panel-Design können negative Effekte durch Spillover umgangen werden. Anhand eines Beispiels wird dies deutlich. Sind NK-Zellen von Interesse, müssen sie von anderen Lymphozyten unterschieden werden. Dies kann einerseits durch positive Markierung mit CD56 geschehen, andererseits sollte mit CD3 gefärbt werden, um T-Zellen und CD56<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTLs) rauszugaten. In diesem Setting könnte CD3-APC-Alexa750 eingesetzt werden ohne, dass der Spillover des Fluorochromes auf NK-Zellen wirksam wird. Selbiger Logik folgt der Einsatz eines Dump-Channels zum rausgaten von unerwünschten Zellen. Dabei werden verschiedene, mit gleichem Fluorochrom konjugierte Antikörper, hinzugegeben, die allesamt unerwünschte Zellen markieren. Unter Nutzung eines einzelnen Kanals werden verschiedene nicht benötigte Zellen entfernt.

Bei Betrachtung von PacificBlue fällt auf, dass dieses Fluorochrom lediglich nennenswert mit aqua ViD interferiert. Dieses wurde nur in einigen Experimenten verwendet. Die schwache Intensität von PacificBlue schränkt seinen Einsatz zur Messung von Zytokinen jedoch ein, eignet sich jedoch zur positiven Markierung von großen Populationen. Störend wirkte sich der Spillover von PerCP-Cy5.5 in den Kanal von PE-Cy7 aus. Der Kanal verlor stark an Sensitivität.

Die Spannung an den Photomultiplier Tubes (PMTs) wird am verlässlichsten im Vorhergehen mit Hilfe von Kalibrations-Beads durchgeführt. Eine erneute Kalibration sollte durchgeführt werden, wenn die Zellen entweder die Skala im positiven Bereich verlassen oder wenn das Hintergrundrauschen zu groß wird. Bei Herabsetzen der Spannung ist jedoch zu beachten, dass eine zu niedrige Spannung die Streuung des Variabilitäts-Koeffizienten erhöht und damit zu einer stärkeren Streuung der Zell-Populationen führt. Daher sollten die Populationen nicht manuell an den linken Rand verschoben werden.

### 3.2.5 Testen der Kombinationen

Durch die theoretische Betrachtung hat sich die Zahl der interessanten Konjugate drastisch verringert und mit einigem Aufwand können jetzt die möglichen Panels getestet werden. Dies ist wichtig, denn in der Praxis können sich erwartete und unerwartete Wechselwirkungen zeigen und diese hinsichtlich ihrer Störung des Panels bewertet werden. Es sei vorausgeschickt, dass mit dem gleichzeitigen Einsatz vieler Antikörper immer Kompromisse in der Sensitivität eingegangen werden müssen.

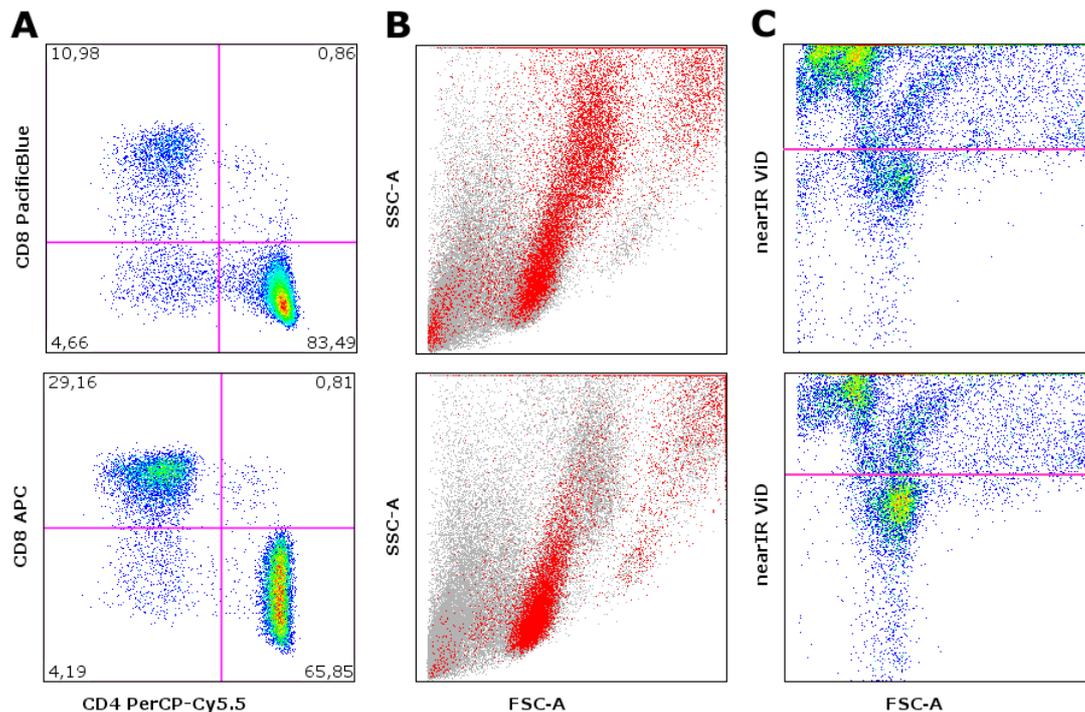


Abb 3.13: **Unerwartete Wechselwirkung: CD8 PacificBlue führt zum Zelltod und ist somit unbrauchbar.** Der Einsatz von CD8 PacificBlue führt zu einer geringen Detektion von CD8-Zellen und einem erhöhten Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen (A, oben). Im Vergleich zeigt CD8 APC eine Verteilung wie erwartet (A, unten). Gegated wurde nach vorgestelltem Schema. Durch Überlagerung von ungegateden CD8<sup>+</sup> Zellen über die Scattergrafik (B) wird erkennbar, dass CD8 PacificBlue einen Großteil von Zellen außerhalb des Lymphozytengates färbt. (C) zeigt eine nearIR Färbung mit Gating auf CD8<sup>+</sup> Zellen. Bei Verwendung von PacificBlue wird ein Großteil der Lymphozyten als tot markiert. Gefärbt wurde (für A/B) über das Accuspin System aufgereinigtes HEP-N mit CD3 FITC, CD4 PerCP-Cy5.5 und CD8 in getrennten Röhrrchen. Für (C) wurde PBMC A zusätzlich mit nearIR ViD gefärbt.

Überraschend verhielt sich CD8 PacificBlue-Antikörper (Abb 3.13 obere Reihe). Verglichen mit einem vorhanden CD8 APC (untere Reihe) färbte er substantiell weniger Zellen CD8 positiv (A). Gefärbt wurde am selben Tag in getrennten Röhrrchen unter Verwendung der selben PBMCs, das schließt Wechselwirkungen der CD8 Antikörper und natürliche Unterschiede von Blutspendern aus. Ebenso ausgeschlossen wurde eine geringere Affinität des PacificBlue-Konjugats oder eine präferentielle Färbung von Monozyten – wie die Ansicht im Scatter vermuten lassen könnte. In diesem Fall hätten sich Zellen im CD4-CD8<sup>-</sup> Quadranten gesammelt. Ein CD4/CD8 Quotient von 2,3 (APC Konjugat) ist auch plausibler für einen gesunden Spender als 7,6 (PacificBlue Konjugat). Folglich könnten die Zellen beim Gating verloren gegangen sein. Die Darstellung der Gesamtergebnisse (grau) im Scatter (B) bestätigt dies. CD8<sup>+</sup> Zellen (rot) sind zum großen Teil außerhalb des Scatters zu finden, sowohl mit höherem als auch niedrigerem SSC und FSC. Eine daraufhin durchgeführte Färbung mit dem Totfarbstoff nearIR ViD zeigt, dass CD8<sup>+</sup> Zellen zum größten Teil ebenfalls stark mit nearIR ViD reagieren – ein Zeichen für den Zelltod. Damit steht der Antikörper im starken Verdacht die Zellen zu schädigen und wurde nicht weiter verwendet.

Wie bereits besprochen erfordert die spektrale Überlappung eine Kompensation, die wiederum die Messabweichung vergrößert. In Abb 3.14 ist die Auswirkung nach Kompensation zu sehen. Die drei DotPlots zeigen CD3 gegen CD56. Wie in (A) zu sehen,

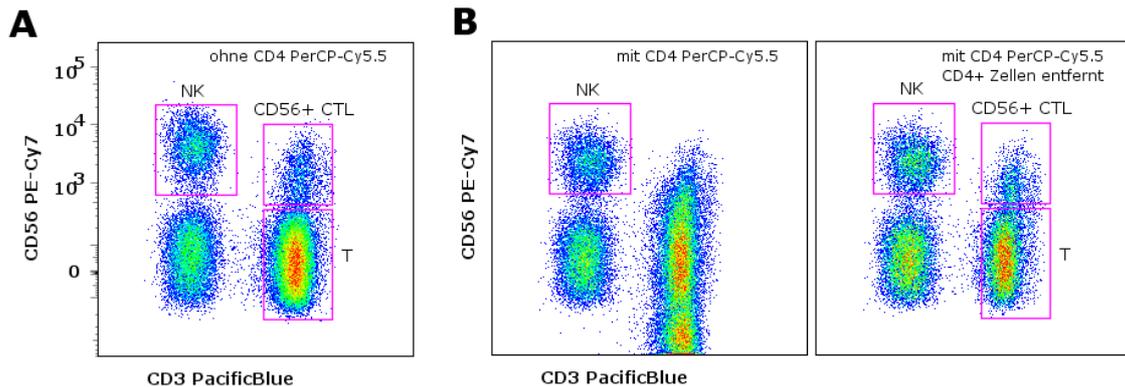


Abb 3.14: **Kompensationsprobleme: Spektrale Überlappung 1.** Durch Auftragung von CD3 gegen CD56 lassen sich NK und CD56<sup>+</sup> CTL Zellen von den übrigen Lymphozyten abgrenzen (A). Fügt man CD4 PerCP-Cy5.5 Antikörper hinzu, können trotz lege artis Kompensation die CD56<sup>+</sup> CTL Zellen nicht mehr abgegrenzt werden (B, links). Das ist auf die spektrale Überlappung von PerCP-Cy5.5 und PE-Cy7 zurückzuführen, denn entfernt man CD4 Zellen durch vorheriges Gating ist die Unterscheidung möglich (B, rechts). Gegated wurde auf Lymphozyten. Gefärbt wurde PBMC A ohne Stimulation.

sollten NK, CD56<sup>+</sup> CTL und T-Zellen (nicht markiert) abgrenzbar sein. Wird CD4 PerCP-Cy5.5 beigegeben sind die CD56<sup>+</sup> CTL Zellen nicht mehr von den T-Zellen abzugrenzen (B, links). Die CD3<sup>+</sup> Population erscheint im PE-Cy7 Kanal verbreitert. Die CD4-markierten Zellen durch PerCP-Cy5.5 stark in PE-Cy7, durch die Kompensation erhöht sich der Fehler und damit die Streuung der Population. Die Sensitivität im PE-Cy7 Kanal verringert sich und CD56<sup>+</sup> CTL Zellen sind auf Grund ihrer CD56<sup>dim</sup> Expression nicht mehr abgrenzbar. Den Beleg hierfür liefert das Ausgaten von CD4<sup>+</sup> Zellen (B, rechts). Trotz CD4 PerCP-Cy5.5 im Färbeansatz können CD56<sup>+</sup> CTL Zellen von T-Zellen abgegrenzt werden. Gleichzeitig macht das Beispiel deutlich, dass nur Ereignisse kompensiert werden, die entsprechende Konjugate binden. D.h. der Spillover von PerCP-Cy5.5 wird nur auf Zellen wirksam die CD4 binden. In diesem Fall bleiben Panel I und II, trotz der Mängel durch geschicktes Gating, geeignet, um die Populationen abzugrenzen.

Ein vergleichbares Problem zeigt Panel III (Abb 3.15). Das verwendete CD3 APC-Alexa750 überstrahlt IL-17 Alexa647. Die Wirkung der Kompensation zeigt sich wiederum in einer verbreiterten Population im Alexa647 Kanal. Durch geschicktes Gating lässt sich das Problem nicht lösen, denn CD3<sup>+</sup> Zellen sind von Interesse. Eine Quantifizierung von IL-17 Produzenten ist möglich, führt jedoch zur Unterschätzung ihrer Frequenz. In Gesamtlmphozyten werden ohne APC-Alexa750 0,35% IL-17<sup>+</sup> Zellen gefunden, mit APC-Alexa750 0,19%. Das hebt hervor, dass der Spillover trotz Kompensation ein zentrales Problem in der Multicolor-Durchflusszytometrie bleibt.

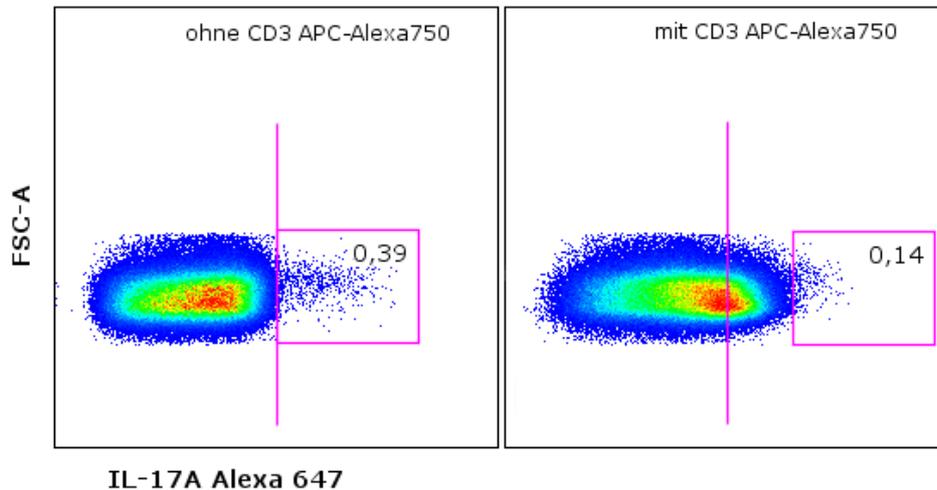


Abb 3.15: **Kompensationsprobleme: Spektrale Überlappung 2.** Ohne Verwendung von APC-Alexa750 Fluorochrom lassen sich IL-17-produzierende Zellen sauber abgrenzen (links). Durch Hinzufügen von CD3 APC-Alexa750 zeigen sich deutliche Kompensationsartefakte (rechts). Auf Grund des *broadening* verringert sich die Sensitivität im Alexa647-Kanal. Der bestimmbare Anteil von IL-17<sup>+</sup> Zellen erscheint dadurch geringer (rechts, die vertikale Linie markiert in beiden Teilbildern die gleiche Position). Es wurde lege artis kompensiert und auf Lymphozyten gated. Gefärbt wurde Accuspin-aufgereinigtes HEP-N nach 5h Stimulation mit SEB unter Anwesenheit von Monensin.

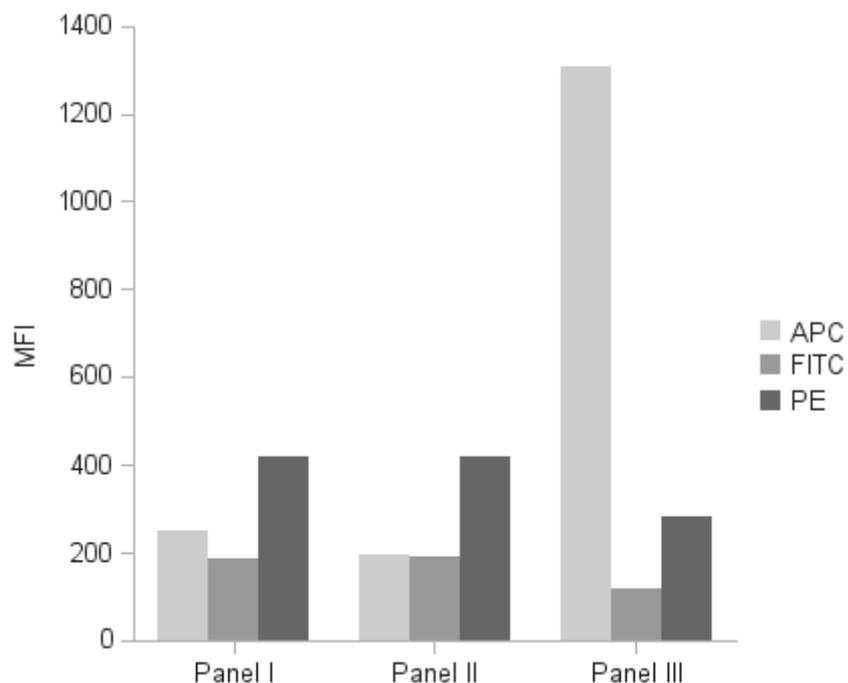


Abb 3.16: **Spillover in reservierte Kanäle bei drei Grundpanels.** Gating nach vorgestelltem Schema auf T-Zellen. In der verbleibenden Population zeigt sich je nach verwendeten Fluorochromen eine unterschiedlich starke Strahlung in die nicht genutzten Kanäle für FITC, PE und APC. Diese Grundlast wird über die MFI gezeigt. Gefärbt wurden PBMC A und Accuspin aufgereinigtes HEP-N.

Da alle drei Panel letztlich für die Unterscheidung der Lymphozytenpopulationen geeignet sind, wurden die Panels zuletzt hinsichtlich ihrer *Belastung*, der drei für schwache

Marker reservierten Kanäle, betrachtet. Dafür wurden die Kanäle nicht mit Konjugaten belegt, aber die Intensitäten gemessen. Unkompensiert betrachtet, entspricht diese der Grundlast und stellt ein gutes Maß für die Sensitivitätsminderung in den Kanälen dar. Im Vergleich (Abb 3.16) zeigt der FITC Kanal, wie erwartet (nach Tabelle 8), eine besonders geringe Grundlast in allen drei Panels. Der PE Kanal ist ebenfalls gering belastet. Die höhere mean fluorescence intensity im Vergleich zu FITC ist wohl auf CD56 PE-Cy7 zurückzuführen. Jedoch ist im APC Kanal die Auswirkung von CD3 APC-Alexa750 in Panel III zu sehen. Ein schwacher Marker würde dadurch trotz Kompensation beeinträchtigt werden.

Somit ergaben sich Panel I und II als geeignet. Die Wahl fiel letztendlich auf Panel I auf Grund des Vitalitätsmarkers nearIR. Dieser trennte vitale von avitalen Zellen schärfer und zeigte nicht die Interferenz mit PacificBlue, was eine Darstellung von CD3 gegen Vitalität verbessert.

### 3.2.6 Kontrollen

Ab wann ist eine Zelle positiv? Das willkürliche Setzen einer Schwelle zur Unterscheidung erweist sich als schwierig. Zellen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Autofluoreszenz, je mehr Farben in einem Panel genutzt werden desto größer wird auch die statistische Streuung von Populationen. Durch die unterschiedliche Markierung von Populationen verhält sich jede anders. Unspezifische Bindungen, besonders beobachtet bei intrazellulären Färbungen mit PE-Konjugaten, erschweren die Auswertung ebenfalls. Kontrollen sind somit ein unabdingbarer Bestandteil jeder durchflusszytometrischen Messung. Ihre Auswahl sollte vor dem Experiment sorgfältig erfolgen. Es gibt verschiedene Arten von Kontrollen. Es wurden hier unstimulierte Kontrollen, Isotyp-Kontrollen und *Fluorescence minus one* (FMO)-Kontrollen verglichen.

Für Marker deren Expression sich unter Stimulation verändert, wurden anhand des Vergleichs von unstimulierten und stimulierten Zellen die Gates gesetzt. Das hat den Vorteil, dass der Hintergrund berücksichtigt wird, wie z.B. unspezifische Bindung von Antikörpern, Kompensations-Artefakte und unspezifische Aktivierung an dem Reagenzgefäß. Die Bedeutung des Hintergrundes zeigt sich gerade bei schwachen Markern wie Zytokinen. In Abb 3.17A wurden die Intensitäten von unstimulierten, stimulierten Zellen und stimulierten FMO-Kontrollen für IFN $\gamma$  FITC verglichen. Der Median der unstimulierten Kontrolle kommt dem Median der stimulierten Probe deutlich näher, denn lediglich ein geringer Prozentsatz der Zellen sollte in diesem Setting reagieren (dargestellt durch die schmale rote Linie auf der Abszisse). Diese Kontrolle ist sehr nützlich, jedoch kann sie nur verwendet werden wenn es um Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen geht. Eine Ergänzung bietet die folgende Kontrolle.

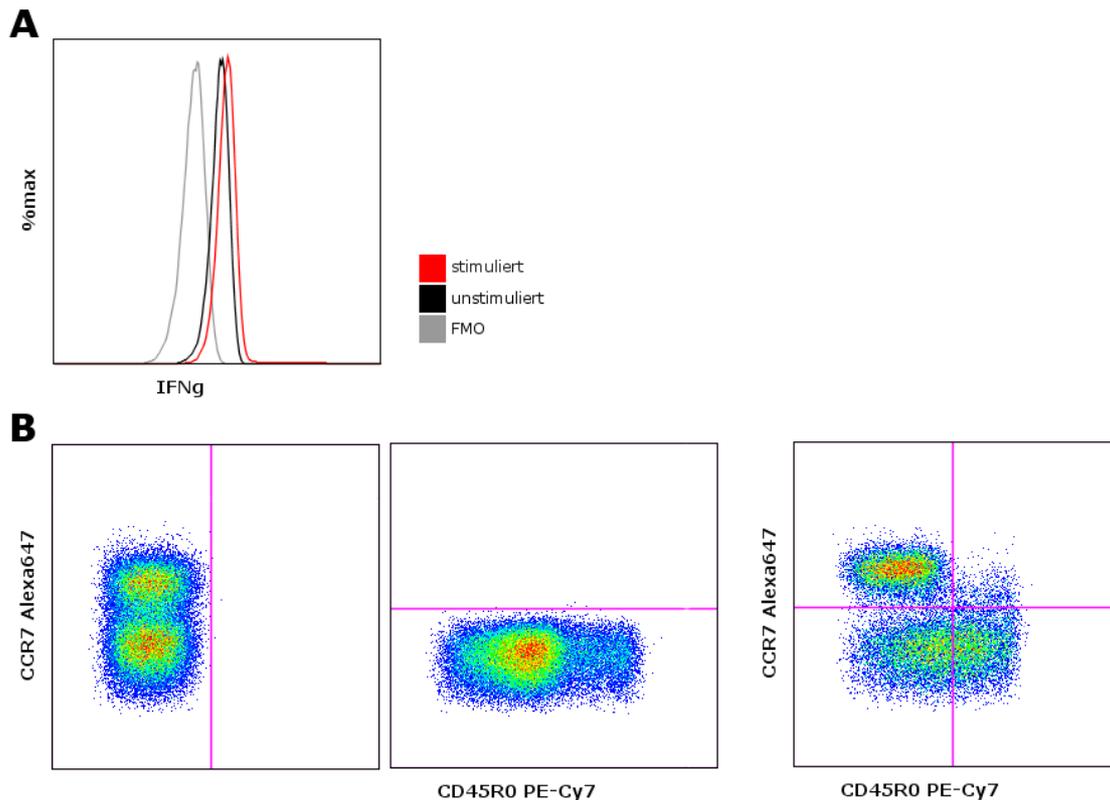


Abb 3.17: Unstimulierte Zellen und FMO als Kontrolle. Die Grenze zwischen positiv und negativ zu ziehen kann besonders bei kontinuierlichen Markern schwierig sein. (A) zeigt, die Verteilung der Zellen bei eingesetzten Kontrollen (grau, schwarz) gegenüber der stimulierten Probe (rot). Der Median der - nicht responsiven Zellen - liegt bei der unstimulierten Kontrolle näher an der Probe als die FMO Kontrolle. Dadurch lässt sich das Gate dort genauer setzen. Bei Markern die unabhängig von Kurzstimulation exprimiert werden eignet sich häufig die FMO Kontrolle besser. (B) zeigt beispielhaft das Setzen eines Gates zur Unterscheidung von Memorypopulationen (rechts) anhand zweier Einzelfärbungen (links).

Die FMO-Kontrolle ist erst in den letzten Jahren eingeführt, sowie notwendig geworden (Baumgarth & Roederer 2000). Durch Färbung des Ansatzes mit allen, außer einem Fluorochrom, werden die Spillover-Effekte der Multicolor-Durchflusszytometrie beim Setzen von Gates berücksichtigt. Abb 3.17B zeigt das Vorgehen anhand eines 2D-Dot-Plots. Zwei FMO-Kontrollen ermöglichen hier die Abgrenzung von Memorypopulationen. Durch den kontinuierlichen Verlauf von CCR7 ist ein Setzen des Gates ohne Kontrolle nicht möglich. Nachteil dieser Kontrolle ist der fehlende Hintergrund einer unspezifischen Bindung oder inkompletten Auswaschung bei ICS. Damit ist sie nur in Ausnahmefällen für Zytokinfärbungen geeignet.

Dieser Einschränkung kann durch Kombination mit Isotyp-Kontrollen begegnet werden. Anstelle des Antikörpers von Interesse wird ein Antikörper gegen ein im Zielgewebe nicht vorhandenes Epitop eingesetzt, der jedoch das gleiche Fluorochrom und den gleichen Isotyp aufweist. Die nicht-Bindung wird vom Hersteller getestet. In dieser Arbeit wurde diese Kontrolle nicht eingesetzt. Einerseits erhöht die zusätzliche Kontrolle Aufwand und Kosten, andererseits war sie hier nicht nötig.

Auch ungefärbte Zellen können als Kontrolle eingesetzt werden. Dies stammt jedoch noch aus den Anfängen der Durchflusszytometrie und sollte von der FMO-Kontrolle ab-

gelöst werden. Alle genannten Faktoren, die zum Hintergrund beitragen, werden nicht berücksichtigt.

### 3.3 Anwendungsmöglichkeiten

Die Anwendungsmöglichkeiten von Multicolor-Panels sind vielfältig. Prinzipiell kann jeder Zelltyp, der in Suspension gebracht werden kann, und für den konjugierte Antikörper verfügbar sind, untersucht werden. Auch in der Labordiagnostik hat das Flow Cytometer einen festen Platz. Vor allem für die Immunphänotypisierung von Lymphozytensubpopulationen. Auch häufiger in Verwendung sind Funktionstests, die die Zytokinproduktion als Antwort auf Stimulation quantifizieren. Jedoch beschränken sich die angebotenen Tests häufig auf maximal vier Farben, vor allem wegen der zur Verfügung stehenden Geräte und fehlender Standardisierung der Tests. Trotz wachsender Kenntnisse über die Grundmechanismen von Immunantworten fehlen bislang häufig noch Kenntnisse über messbare Korrelate von Krankheit und Gesundheit. Es ist zu hoffen, dass die durch die Einführung neuer Farben in die Durchflusszytometrie geschaffenen Möglichkeiten, zur genaueren Differenzierung von Zellpopulationen, die Identifikation solcher Korrelate erleichtert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Panels entworfen.

#### 3.3.1 Zytokin-Panel

Das Zytokin-Panel setzt sich aus folgenden Markern zusammen:

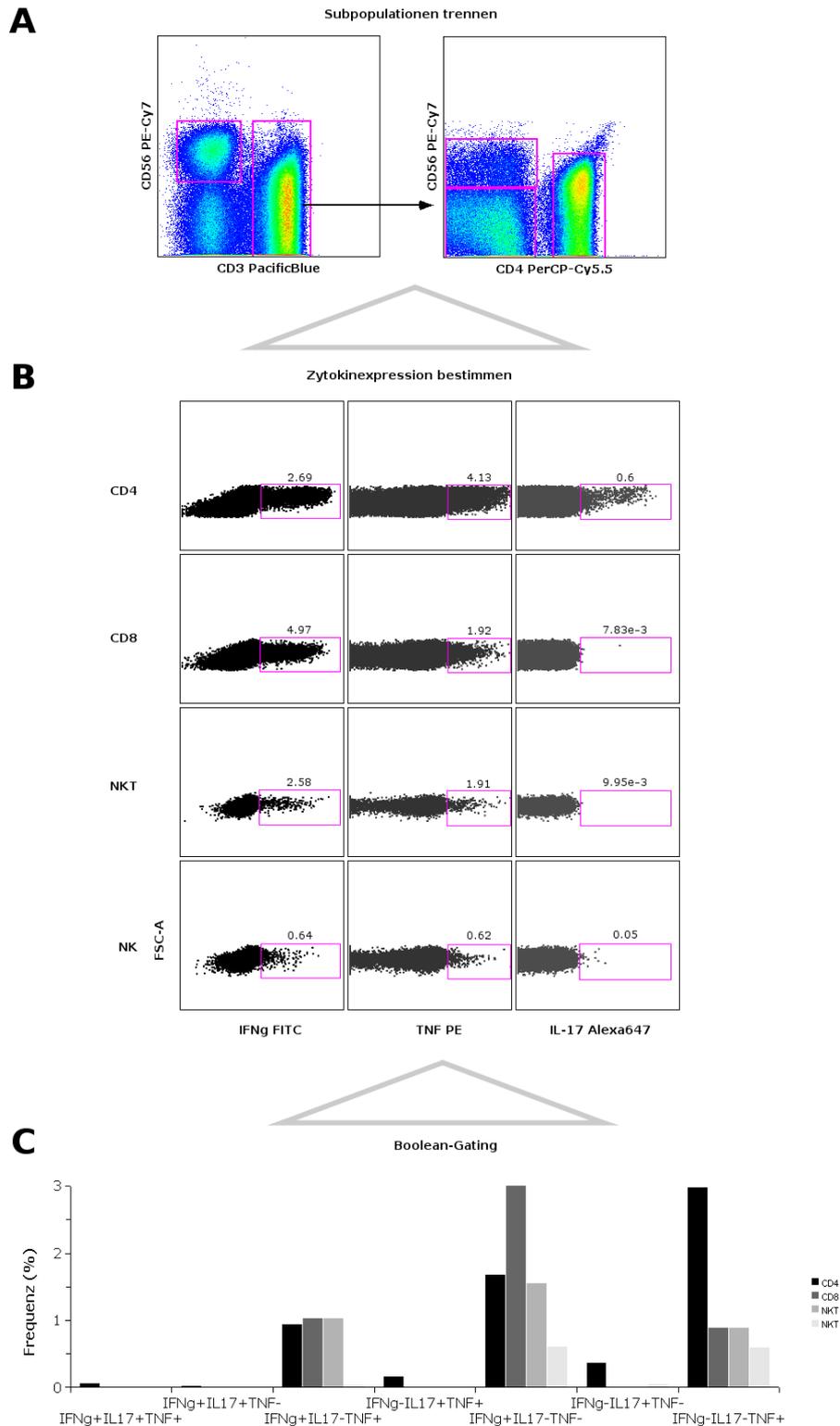
<b>Fluorochrom</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>Alexa647</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>PerCP-Cy5.5</b>	<b>PacificBlue</b>	<b>APC-Cy7</b>
<b>Antikörper</b>	TNF	IL-2	IFN $\gamma$	CD56	CD4	CD3	nearIR

Tabelle 9: Das Zytokin-Panel.

Somit kann man mit ihm Lymphozyten in wesentliche Populationen der CD4/CD8 T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK) und CD56<sup>+</sup> CTL Zellen einteilen und innerhalb jeder Gruppe die Qualität der Antwort anhand produzierter Zytokine bestimmen. Unter Qualität der Immunantwort wird hier die Fähigkeit von T-Zellen, eines oder mehrere Zytokine zu produzieren, verstanden.

Es ist ebenso möglich mit diesem Panel die Quantität der T-Zell-Antwort zu bestimmen, d.h. den Anteil von Zytokinproduzenten an den gesamten T-Zellen und die Stärke der Zytokinexpression. Somit lässt sich dieses Zytokin-Panel nutzen, um die Wirksamkeit neuartiger Vakzine zu validieren oder prädiktive Faktoren für Krankheitsprozesse zu finden.

Die angerissene Auflösungsfähigkeit des Panels ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal. Sie beschreibt wie genau oder facettenreich ein Aspekt des Immunsystems dargestellt werden kann. Auf Grund der immensen Komplexität des Immunsystems sollte die Auflösungsfähigkeit möglichst hoch sein. In Abb 3.18 wird schematisch die Menge der Information angedeutet, die durch das hohe Auflösungsvermögen gewonnen werden kann. Aufbauend auf der eingangs vorgestellten Gating-Strategie (Abb 2.1) wird gezeigt, wie die Qualität einer zellulären Antwort bestimmt werden kann. Zuerst erfolgt die Abgrenzung von NK und CD56<sup>+</sup> CTL/T-Zellen über CD56 und CD3. CD56<sup>+</sup> CTL-Zellen können von den T-Zellen aufgrund von Kompensationsartefakten (Erläuterung siehe Abb 3.14) in dieser Darstellung nicht sauber getrennt werden. Erst durch Trennung von CD3<sup>+</sup>



**Abb 3.18: Auflösungsfähigkeit des Zytokin-Panels.** Gezeigt ist die Fähigkeit des Zytokin-Panels die Qualität von T-Zell-Antworten darzustellen. (Die grauen Pfeile symbolisieren eine ansteigende Komplexität nach unten hin). Folgend auf die eingangs vorgestellte Gating Strategie, können hier über CD56 zusätzlich NK und CD56<sup>+</sup> CTL von CD4/CD8 T-Zellen abgegrenzt werden (A). Jede Subpopulation kann innerhalb einer Messung gleichzeitig hinsichtlich ihrer Expression von drei Zytokinen (IFNg, TNF und IL-17) betrachtet werden (B). Alle Populationen zeigten eine Antwort auf die Stimulation. IL-17 wurde lediglich von CD4 und zu einem kleineren Anteil von NK Zellen produziert. IFNg und TNF wurden von allen untersuchten Zellgruppen produziert, jedoch in unterschiedlicher Stärke. TNF fand sich vor allem in CD4<sup>+</sup> Zellen, IFNg hingegen vor allem in CD8<sup>+</sup> Zellen. Aus den ermittelten Daten wurden mit Hilfe des Boolean-Gating acht mögliche Qualitäten einer T-Zelle hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion unterschieden (C). Gefärbt wurde PBMC G nach 13h SEB Stimulation unter Anwesenheit von Monensin.

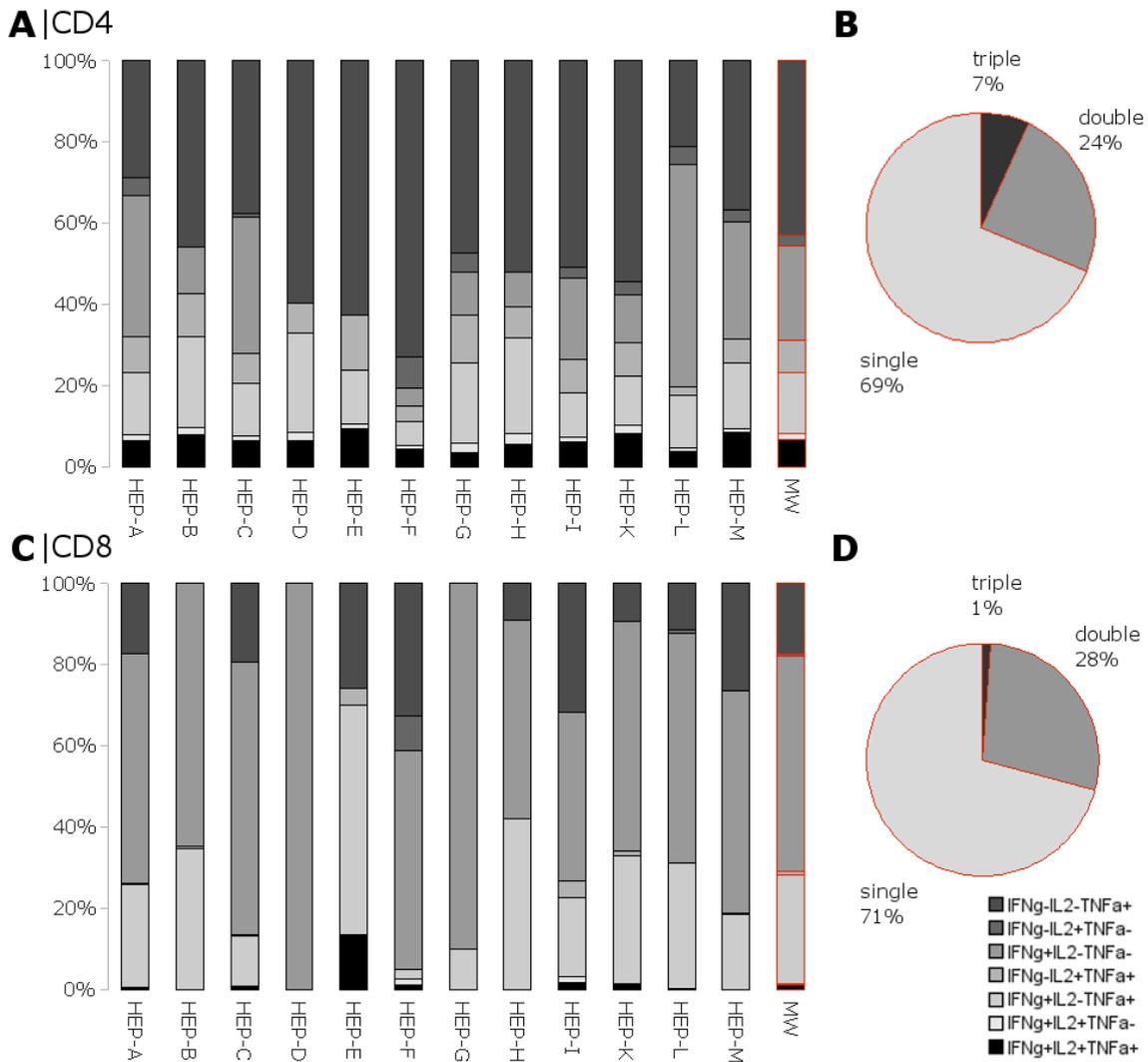
Zellen mit CD56 gegen CD4 wird die Population sichtbar und kann von CD4 und CD8-Zellen sauber abgegrenzt werden. Die Subpopulationen können innerhalb einer Messung unabhängig hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion quantifiziert werden. Jedoch ist bei Interpretation dieser Messung zu berücksichtigen, dass das Verhalten der Zellen einerseits vom verwendeten Stimulus und andererseits von den intrinsischen Eigenschaften der jeweiligen Zellgruppe abhängt. Die Wirkung von SEB ist am besten untersucht an T-Zellen. CD56<sup>+</sup> CTL-Zellen exprimieren ebenfalls zu großen Teilen die entsprechenden Vβ T-Zellrezeptoren und werden somit wahrscheinlich direkt durch SEB aktiviert (Ragin et al. 2006).

Dies bestätigte die folgende Messung. Es wurde IFNγ und TNF-Produktion durch CD56<sup>+</sup> CTL-Zellen nachgewiesen. Andere Veröffentlichungen zeigen ebenfalls die Aktivierung von NK-Zellen durch SEB. Neben einer direkten Aktivierung wird die indirekte Aktivierung über T-Zell-Zytokine diskutiert (D’Orazio & Stein-Streilein 1996; D’Orazio et al. 1995).

In dieser Messung produzierte ein kleiner Anteil von NK-Zellen IFNγ, TNF und IL-17. Als folgenden Schritt wurde mit Hilfe des Boolean-Gating für jedes Ereignis, die Kombination von Zytokinen die es exprimiert und damit die Qualität der Antwort ermittelt. Die Methodik erstellt Gates automatisch aus allen möglichen Kombinationen von Zytokinexpressionen. Nun lassen sich die Populationen hinsichtlich ihres Anteils an Doppel- und Dreifachproduzenten vergleichen. Hier zeigt sich wie groß die Informationsfülle ist, die aus einer Messung mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie gewonnen werden kann. Wie erwartet fanden sich bezüglich der hier untersuchten Zytokine fast keine Dreifachproduzenten. Doppelproduzenten fanden sich in der Gruppe der CD4, CD8 und CD56<sup>+</sup> CTL-Zellen, jedoch nicht innerhalb der NK-Zellen. Nur CD4 und NK-Zellen produzierten IL-17.

### **3.3.1.1 Qualität der T-Zell-Antwort im Normalkollektiv**

Bedingt durch seinen Aufbau lassen sich die Zytokine leicht austauschen in diesem Panel. Für das nächste Experiment wurden die Zytokine IFNγ, TNF und IL-2 verwendet. Im Gegensatz zu IL-17 wird IL-2 nicht nur von CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Mit dem veränderten Panel wurde ein Normalkollektiv aus zwölf gesunden Blutspendern untersucht, davon elf männlich und einer weiblich (HEP-C). Die Messung ermöglicht die Beschreibung einer normalen Population. Auf dieser Basis können Messergebnisse an kranken Patienten besser bewertet werden, da ein Bezugssystem existiert. Das untersuchte Normalkollektiv wird in Abb 3.19 beschrieben, indem allgemeine Tendenzen anhand des Mittelwerts hervorgehoben und Ausreißer charakterisiert werden.



**Abb 3.19: Varianz und Qualität von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell-Zytokinantworten.** (A/C) CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Produktion von IFN $\gamma$ , TNF und IL-2 untersucht. Dies ist eine qualitative Betrachtung ohne Berücksichtigung der Stärke der Antwort. (B/D) Um die Qualität zu bestimmen, wurde der Anteil von Mehrfachproduzenten an den gesamten zytokinproduzierenden Zellen bestimmt. (A) Betrachtet man die CD4-Zellen findet man am meisten TNF Einzelproduzenten und viele IFN $\gamma$  Einzelproduzenten, jedoch kaum IL-2 Einzelproduzenten. (B) Die Mehrfachproduzenten haben damit verglichen einen geringeren Anteil, dennoch fallen viele IFN $\gamma$ /TNF-Doppelproduzenten auf. Auffällig zeigt sich HEP-F, der fast ausschließlich TNF-Einzelproduzenten (73% gegenüber 44% MW) besitzt. (C) Die beschriebene Verteilung lässt sich bei CD8-Zellen nicht wiederfinden. Hier dominieren die IFN $\gamma$ -Einzelproduzenten. Es finden sich kaum IL-2-Einzelproduzenten. Auffallend ist zum einen HEP-D, der fast ausschließlich TNF-Einzelproduzenten ausweist (78% gegenüber 8% MW) und HEP-E in dessen PBMCs sich keine IFN $\gamma$ -Einzelproduzenten, aber ein großer Anteil IFN $\gamma$ /IL-2-Doppelproduzenten zeigen. Gating erfolgte analog der vorgestellten Strategie (Abb 2.1). Gefärbt wurden PBMCs stimuliert für 5h mit SEB (+ Monensin). Diese wurden frisch aufgereinigt aus Heparinblut über das Accuspin-System.

In der Gruppe der CD4-Zellen war eine TNF-Einzelantwort dominant (43%), gefolgt von IFN $\gamma$  Einzelproduzenten (23%). Bei CD8 Zellen drehte sich das Verhältnis um (53% IFN $\gamma$  gegenüber 17% TNF). IL-2 allein wurde von beiden T-Zell-Populationen nur selten sezerniert (1% in CD4 bzw. 3% in CD8). Jedoch war es bei CD4 Zellen häufig Teil einer Mehrfachantwort (16%), bei CD8 Zellen jedoch nicht (2%). Vergleichbar zeigte sich der Anteil an Doppel- und Dreifachproduzenten an Gesamtproduzenten. Einzelproduzenten waren sowohl bei CD4 als auch CD8 Zellen am häufigsten mit 69% bzw. 70%. Mit eini-

gem Abstand folgten ebenso vergleichbar Doppelproduzenten mit 24% bzw. 28%. Die Dreifachproduzenten waren selten, kamen aber häufiger in der CD4<sup>+</sup> (7%) als CD8<sup>+</sup> Population (1%) vor. In Hinblick auf die CD4 Antwort fiel vor allem HEP-F auf. In dem Spender dominierte eine TNF Einzelantwort mit 73%. Das ließ kaum Platz für die anderen Zytokine. Der Spender ist dadurch möglicherweise anfälliger gegenüber Infektionen (Seder et al. 2008).

Eine antigenspezifische Analyse würde mehr Aufschluss geben, welche Populationen betroffen sind. Die Möglichkeiten der Analyse sind aber eingeschränkt durch fehlende Etablierung der Methodik für zahlreiche Erreger. Innerhalb der CD8<sup>+</sup> Zellen tauchten mehr Ausreißer auf, jedoch fielen vor allem HEP-D und HEP-G auf. Sie zeigten 100% bzw. 90% IFN $\gamma$ -Einzelproduzenten. Hingegen fiel der Zuwachs an Mehrfachproduzenten verglichen mit dem Mittelwert nur bei einem Spender auf. HEP-E zeigte innerhalb der CD8 Antwort 56% IFN $\gamma$ /TNF doppelt positive Zellen und dazu 13% Dreifachproduzenten.

### **3.3.1.2 Überprüfung der Wirksamkeit einer Tumorstoffimpfung**

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Gentherapie des Instituts für Biochemie wurde das Zytokin-Panel bei der Entwicklung einer Tumorstoffimpfung angewendet.

Tumoren nutzen eine Reihe von Mechanismen, um der Auslöschung durch das Immunsystem zu entkommen. Dazu gehören unter anderem die Herabregulation von Antigenexpression oder MHC-I Expression auf der Oberfläche, Heraufregulation von inhibitorischen kostimulatorischen Molekülen und die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen (Zou 2006; Garcia-Lora et al. 2003).

Eine Immuntherapie kann darauf abzielen den Tumor immunogener zu machen durch Transfektion mit immunstimulatorischen Molekülen. Die ersten klinischen Studien in der Immuntherapie von Tumoren mit über Vektoren eingebrachte Immunstimulatoren zeigten nicht die Erfolge, die im Tiermodell nachgewiesen wurden (Waehler et al. 2005; Sangro et al. 2004).

Die Kombination verschiedener Immunstimulatoren in einem Vektor ist ein vielversprechender Ansatz, die Wirkung zu verstärken. Die Untersuchung der synergistischen und additiven Effekte im humanen System ist jedoch durch rechtliche Hürden und ethische Bedenken erschwert. Deshalb wurde ein Kokultur-Modell etabliert aus transfizierten Tumorzellen und Immunzellen (PBMCs). Dies ermöglicht die Untersuchung und Aufklärung von Effekten auf zellulärer Ebene.

Es wurden humane Tumorzellen (HUH-7) mit Fugene HD (Roche) mit verschiedenen Plasmiden nach Herstellerangaben transfiziert. Das Transfektionsgemisch wurde für 2d auf den Tumorzellen belassen. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch abgenommen und durch frisches Medium mit Immunzellen (PBMCs) ersetzt. Nach 24h, 48h und 72h wurden jeweils Teile der Zellsuspension abgenommen und durchflusszytometrisch im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dies ermöglicht die Interaktion der transfizierten Tumorzellen mit humanen PBMCs zu untersuchen. Es wurden drei Transfektionen unterschieden. Ausschließlich single chain IL-12 Fusionsprotein (scIL-12) (a), scIL-12 in Kombination mit CD137L (b) und die komplette Transfektion mit scIL-12, CD137L und IL-2 (c). Der T-Zell-Aktivierungsmarker CD137 wurde bereits besprochen (Abschnitt 3.1.4). Der Ligand bewirkt eine Proliferation von aktivierten Zellen. Auch IL-2 fördert

Proliferation. Zusätzlich soll scIL-12 eine Th1-Antwort propagieren, die durch proinflammatorische Zytokine wie IFN $\gamma$  gekennzeichnet ist. Das aktiviert Zellen des angeborenen Immunsystems, die Tumorgewebe schädigen können. Im Ratten-Tumormodell zeigte sich eine alleinige Transfektion mit scIL-12 bereits erfolgreich (Waehler et al. 2005).

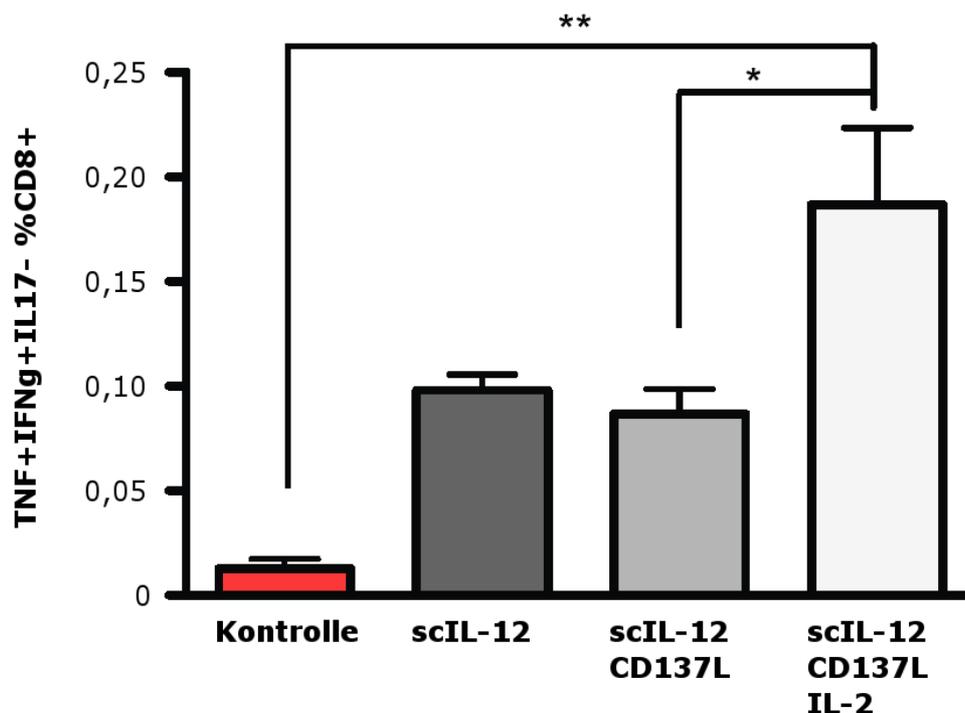


Abb 3.20: **Die komplette Transfektion führt zu einem größeren Anteil von aktivierten Doppelproduzenten.** In der Grafik werden die drei Transfektionen mit untransfizierten Tumorzellen hinsichtlich der Produktion, der angegebenen Zytokine verglichen (*Kontrolle*). Die Wirkung ist gezeigt über den Anteil von aktivierten TNF $^{+}$ IFN $\gamma^{+}$  doppelproduzierenden Zellen an den gesamten CD8-Zellen. Auch in der Kontrolle tauchen aktivierte Zellen auf, vermutlich durch die im Modell vorhandene Alloreaktion zwischen Tumor und PBMCs. Das Einbringen von Immunstimulantien verursacht einen Anstieg der reaktiven Doppelproduzenten um den Faktor zehn. Es zeigte sich kein Vorteil durch das Hinzufügen von CD137L zu scIL-12. Jedoch nahm die Anzahl reaktiver Zellen in der kompletten Transfektion signifikant zu. Gated wurde nach eingangs vorgestellter Strategie auf CD8 $^{+}$  T-Zellen. Die Messung erfolgte nach 24std Inkubation von PBMCs mit verschiedenen transfizierten Tumorzellen. Die letzten 5h wurde Monensin hinzugegeben. Die Färbung erfolgte mit dem angepassten Zytokinpanel (TNF, IFN $\gamma$ , IL-2) am selben Tag. Als statistisches Verfahren wurde one-way ANOVA verwendet. Ein Stern bedeutet p-Wert < 0,05, zwei Sterne bedeuten p-Wert < 0,01.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein passendes Färbepanel entwickelt und die durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen durchgeführt (Abb 3.20). Auf Wunsch der Kooperationspartner wurden die Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und IL-17 bestimmt. IFN $\gamma$  ist kritisch in der angeborenen und adaptiven Immunität gegen virale und intrazelluläre bakterielle Infektionen und für die Tumorkontrolle. Die Wichtigkeit beruht einerseits auf seiner Fähigkeit zur direkten viralen Replikationsinhibition, andererseits durch seine immunstimulatorischen und modulatorischen Fähigkeiten. Als Teil des angeborenen Immunsystems wird es produziert von NK und CD56 $^{+}$  CTL-Zellen, in der adaptiven Immunantwort von CD4 und CD8-T-Zellen. IL-2, ehemals als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, ist ein potenter Immunstimulator. Es wird produziert von aktivierten T-Zellen

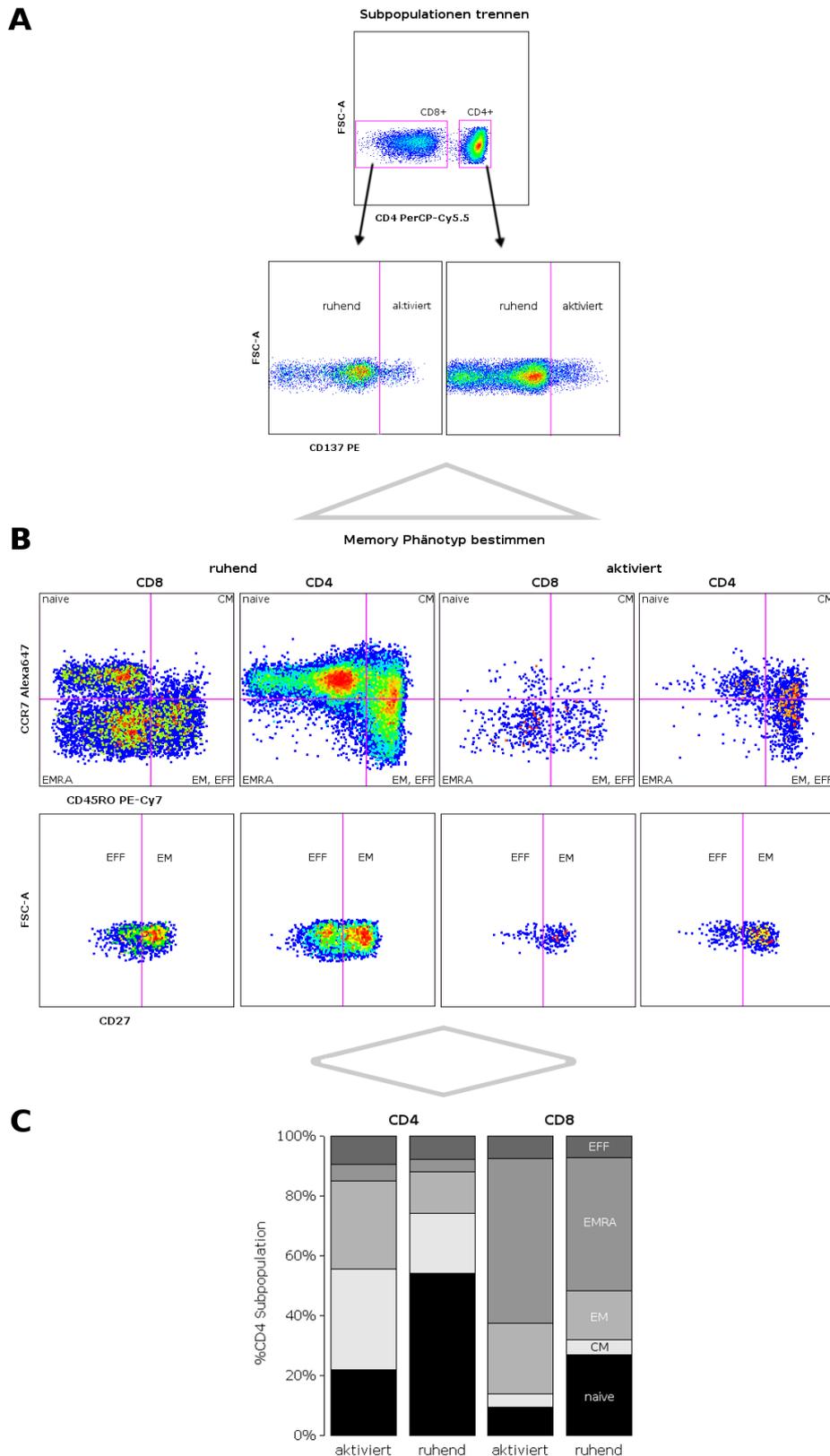


Abb 3.21: **Auflösungsfähigkeit Memory-Panel.** Gezeigt ist die Fähigkeit des Memory-Panels innerhalb einer Einzelmessung Zellen Kompartimenten zuzuordnen. (A) Ausgehend von der eingangs vorgestellten Gating-Strategie, werden je nach Anforderung CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen differenziert. Über einen Aktivierungsmarker, hier CD137, können Antigen-spezifische Zellen (aktiviert) von übrigen Zellen (ruhend) getrennt betrachtet werden. (B) Es folgt die Auftrennung nach Memory-Kompartiment über die Marker CCR7 und CD45RO. Zellen die CD45RO tragen, jedoch CCR7 nicht, können mit Hilfe von CD27 weiter in *Effector* und *Effector Memory* Zellen aufgetrennt werden. (C) Die gewonnenen Daten lassen sich in einem Diagramm zusammenfassen. Gefärbt wurde PBMC B nach 7h SEB Stimulation.

und wirkt wachstumsstimulierend auf B- und T-Zellen. IL-17 wird von einer definierten CD4-Subpopulation, den Th17-Zellen produziert. Th17-Zellen spielen eine Rolle in zahlreichen Autoimmungeschehen (Peters et al. 2011). Durch seine exklusive Produktion in CD4-Zellen ist es nicht geeignet, um die CD8-Antwort zu charakterisieren.

### 3.3.2 Memory-Panel

Das Memory-Panel umfasst folgende Marker

<i>Fluorochrom</i>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>Alexa647</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>PerCP-Cy5.5</b>	<b>PacificBlue</b>	<b>APC-Cy7</b>
<b>Antikörper</b>	CD27	<i>frei</i>	CCR7	CD45RO	CD4	CD3	nearIR

Tabelle 10: Das Memory-Panel.

Wie bereits in der Entwicklung der vorhergehenden Panels geplant, konnte auf das selbe solide Grundpanel (ViD, CD3, CD4), wie beim Zytokin-Panel zurückgegriffen werden. Mit Hilfe der Kombination von CD45RO, CCR7 und CD27 ist es möglich Memory-Populationen analog zum aktuellen Forschungsstand einzuteilen. Die Anwendung setzt weder intrazelluläre Färbung noch Stimulation voraus und ist somit simpel und verursacht wenig Verzerrung. Bei Bedarf kann ein Aktivierungsmarker im leicht zu bestückenden PE-Kanal hinzugefügt werden, was dann eine Stimulation erfordert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an dieser Stelle CD69, CD137, CD154 und IFN $\gamma$  eingesetzt. Jedoch kann die Bestückung variiert werden, um die Memory-Betrachtung auf bestimmte Subpopulationen zu beschränken oder die Unterteilung zu präzisieren. Dies zeigt abermals die Flexibilität des entwickelten Panels.

Analog zu der Vorgehensweise beim Zytokin-Panel wird zuerst die Auflösungsfähigkeit des Panels beschrieben, dann ein erhobenes Normalkollektiv vorgestellt und schließlich Ergebnisse aus der Testung einer Tumorstoffimpfung präsentiert.

Das Gating der Memory-Populationen unterscheidet sich je nach verwendeten Markern und Fragestellung. Im folgenden Beispiel wurde mit dem Aktivierungsmarker CD137 gearbeitet (Abb 3.21). Die nach beschriebenenem Schema (Abschnitt 2.2.3.6) vorgateten Zellen wurden über CD4 sauber in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen aufgeteilt. Innerhalb beider Populationen konnten aktivierte und ruhende Zellen über CD137 unterschieden werden. Besonders um Antigen-spezifische Zellen abzugrenzen, kann dies hilfreich sein (Wehler et al. 2008).

Die Zellen des Interesses wurden mit dem Homingrezeptor CCR7 und CD45RO weiter in vier Populationen aufgetrennt (Sallusto et al. 2004). Das Setzen der Gates muss für CD4 und CD8-Zellen getrennt mit Hilfe von FMO-Kontrollen erfolgen, weil sie durch ihre unterschiedliche Markierung nicht den gleichen Spillover in ihren Kanälen empfangen.

Neben den naiven Zellen (CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), ließen sich *Central Memory* (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) und *Effector Memory* Zellen (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) abgrenzen. Die T<sub>EM-RA</sub> (CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) zeigten sich nur bei CD8-Zellen. Sie werden funktionell mit *Effector Memory* Zellen in Zusammenhang gebracht. Die zwei Marker allein ließen noch keine Trennung von *Effector* und *Effector Memory* Zellen zu. Zu diesem Zweck wurde CD27 hinzugenommen, dessen Herabregulation antigenerfahrene Zellen kennzeichnet und eine Unterscheidung möglich machen soll. Somit konnte getrennt für ruhende und aktivierte

Zellen und CD4/CD8 Populationen die Memory Kompartimentierung innerhalb einer Einzelmessung aufgezeigt werden.

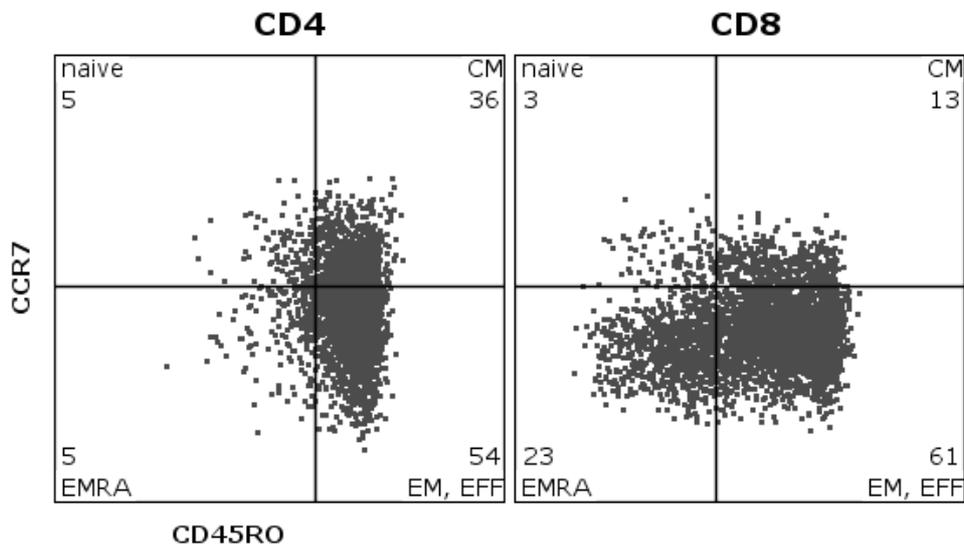
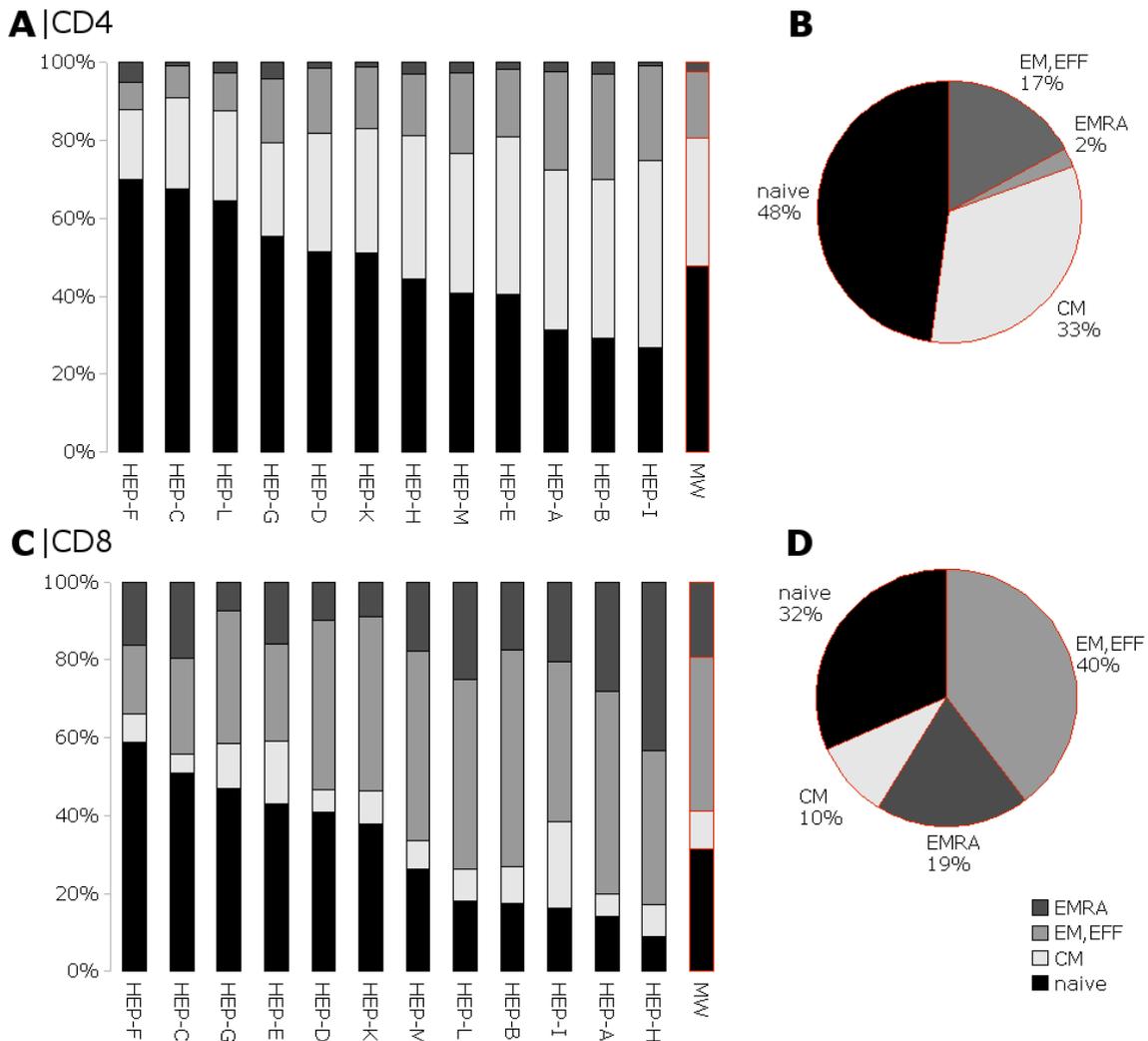


Abb 3.22: **Zuordnung von IFN $\gamma$ -Produzenten zu Memory-Kompartiment.** In der Abbildung sind lediglich IFN $\gamma$ -Produzenten gezeigt. Es ließ sich eine unterschiedliche Lokalisation dieser Zellen in der CD4 und CD8-Population erkennen. Bei den CD4-T-Zellen fanden sie sich fast ausschließlich im *Central Memory* und *Effector Memory/Effector*-Kompartiment (insgesamt 90%). Bei den CD8-Zellen fanden sie sich größtenteils unter den  $T_{EMRA}$  und *Effector Memory/Effector*-Zellen (gemeinsam 84%) ein kleinerer Anteil fand sich bei den *Central Memory*-Zellen (13%). Gated wurde auf CD4 bzw. CD8 IFN $\gamma^+$  T-Zellen nach eingangs vorgestelltem Schema. Gefärbt wurde PBMC G nach 6h Stimulation mit SEB (+Monensin).

Anstelle des Aktivierungsmarkers wurden auch Messungen mit dem Zytokin IFN $\gamma$  durchgeführt (Abb 3.22). Durch selektives Gating auf IFN $\gamma$  Produzenten konnte deren Verteilung innerhalb der Memory Kompartimente dargestellt werden. Durch Stimulation mit dem polyklonalen Stimulus SEB sollte das Muster einen Querschnitt der gesamten T-Zellen abbilden. Es zeigte sich, dass CD4 und CD8-Zellen unterschiedliche Muster zeigen. So fanden sich die IFN $\gamma$ -Produzenten unter den CD4-Zellen zum größten Teil innerhalb des CD45RO<sup>+</sup> Kompartiments ( $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  und  $T_{EFF}$ ), aber nicht klar abgegrenzt durch die CCR7-Expression. Innerhalb der CD8 Zellen fanden sich IFN $\gamma$ -Produzenten vor allen im CCR7<sup>-</sup> Kompartiment ( $T_{EMRA}$ ,  $T_{EM}$  und  $T_{EFF}$ ) und es gab keine hohe Korrelation mit der CD45RO-Expression.

### 3.3.2.1 Memory-Kompartimentierung im Normalkollektiv

Nach erfolgreicher Etablierung wurde ein Normalkollektiv mit dem Memory-Panel erhoben. Zum Zeitpunkt der Messung war CD27 noch nicht in das Panel integriert. Es handelt sich um das selbe Normalkollektiv aus Blutspendern an dem das Zytokin-Panel getestet wurde. Die Messung erfolgte jedoch an unstimulierten Zellen, um die Phänotypisierung nicht zu beeinflussen. Als Ergebnis wurde die Memory-Kompartimentierung des gesamten T-Zellpools erhalten. Daraus konnte ein repräsentativer Phänotyp bestimmt werden. Bei der Untersuchung von Krankheits-assoziierten Veränderungen oder auch der Analyse Antigen-spezifischer Antworten kann auf ein Normalkollektiv verwiesen



**Abb 3.23: Varianz und Mittelwert von Memory-Populationen in PBMCs betrachtet am Normalkollektiv, aufgetrennt nach CD4/CD8.** Erwartungsgemäß variieren die Anteile stark (A/C), jedoch zeigen sich Regelmäßigkeiten (C/D). Betrachtet man die CD4<sup>+</sup> Zellen (A), machen die größte Population die *naiven Zellen* aus (27-70%, MW 48%). Sehr prominent sind weiterhin die *Central Memory*-Zellen (18-48%, MW 33%). Kaum bis gar nicht wurden T<sub>EMRA</sub> Zellen gefunden (1-5%, MW 2%). *Effector Memory* und *Effector*-Zellen machen zusammen einen Anteil von 7-27% (MW 17%). Mangels CD27<sup>+</sup> Antikörper können diese Populationen nicht getrennt werden. Besonders auffällig ist Spender HEP-F, der einen ungewöhnlich geringen Anteil an Memory-Zellen gegenüber *naiven Zellen* zeigt (25% zu 70%).

CD8<sup>+</sup> Zellen zeigen ein anderes Verhalten (B). Die größte Population machen die EM und EFF aus (17-56%, MW 40%). Es gibt weniger *naive Zellen* und diese schwanken stark in ihrem Anteil (9-59%, MW 32%). Zudem tritt deutlich eine T<sub>EMRA</sub> Population hervor (7-43%, MW 19%). *Central Memory*-Zellen haben einen geringen Anteil von 5-22% (MW 10%). Der Spender HEP-H fällt auf durch seinen sehr geringen Anteil von *naiven Zellen* (9%), die vor allem zugunsten der T<sub>EMRA</sub> (43%) abnehmen.

Vergleicht man CD4 und CD8-Zellen (B/D) fallen vor allem folgende Unterschiede auf: CD8-Zellen zeigen eine deutliche T<sub>EMRA</sub> Population sowie einen großen Anteil von EM, EFF-Zellen. Bei CD4-Zellen schrumpfen diese Population gegenüber den *naiven* und *Central Memory*-Zellen.

Gegated wurde jeweils auf CD4 (A/B) oder CD8-Zellen (C/D). Für die Einteilung wurden CD45RO und CCR7 verwendet. Die Messung erfolgte ohne Stimulation direkt in Accuspin-aufgereinigtem HEP-A bis HEP-M am selben Tag.

werden. Die hier verwendete Memory-Kompartimentierung ist dokumentiert und somit vergleichbar.

In der Messung zeigten sich interindividuelle Abweichungen, jedoch ließen sich feste Grundmuster in CD4 und CD8 Populationen feststellen (Abb 3.23). CD4-Zellen zeigten

als größte Population naive Zellen (48%). Viele *Central Memory* Zellen fielen auf (32%).  $T_{EMRA}$ , deren Existenz im der CD4 Subpopulation umstritten ist machten 2% aus (Monteiro et al. 2007). *Effector* und *Effector Memory* Zellen kamen gemeinsam auf 17%. Davon setzten sich CD8 Zellen deutlich ab. Naive Zellen (32%) und *Central Memory* Zellen (10%) fanden sich wesentlich seltener. Dahingegen zeigte sich eine klare Population  $T_{EMRA}$  (17%) und mehr als doppelt so viele *Effector Memory* und *Effector* Zellen (40%). Auf Marker-Ebene sagt es aus, dass weniger  $CCR7^+$  Zellen gefunden wurden als in der CD4 Vergleichspopulation.

### 3.3.2.2 Überprüfung der Wirksamkeit einer Tumorstoffimpfung

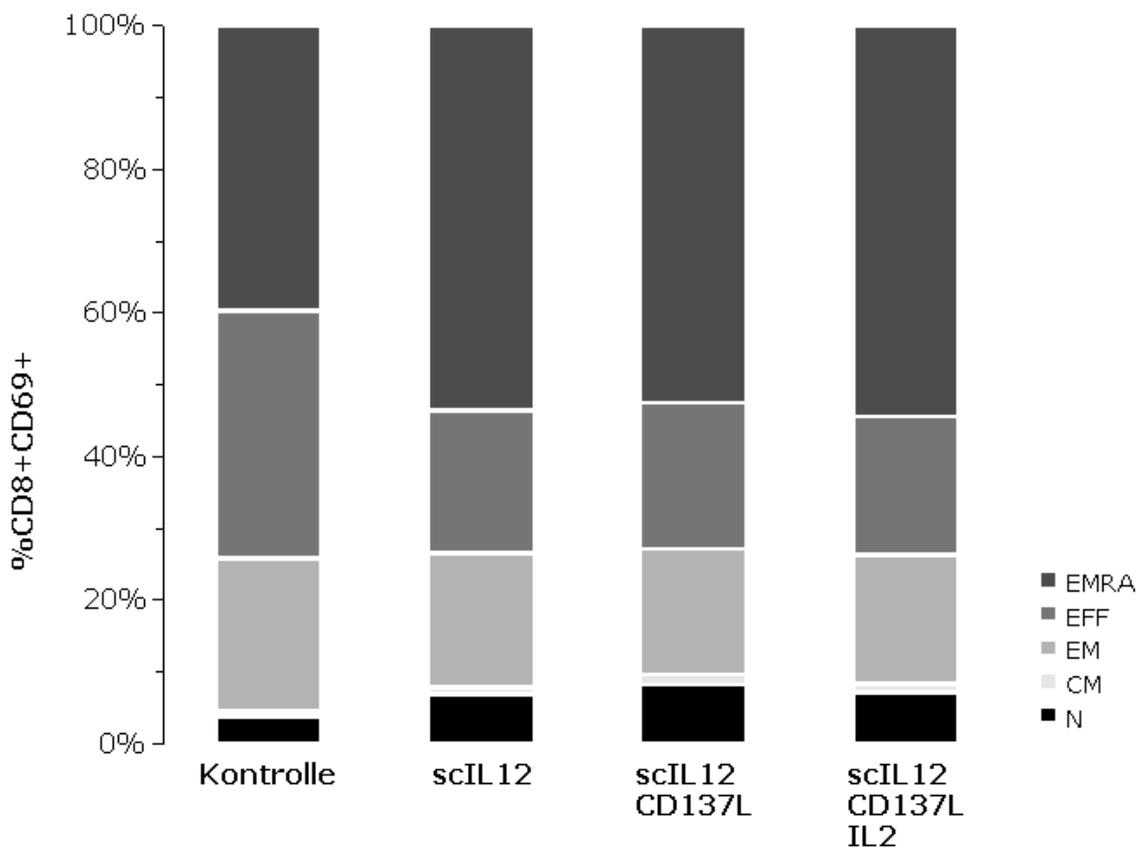


Abb 3.24: Die Transfektion begünstigt den  $T_{EMRA}$  Phänotyp gegenüber Effector Phänotyp. Die Abbildung zeigt die Memory-Kompartimentierung der aktivierten CD8 Zellen, aufgeschlüsselt nach verschiedenen Transfektionsbedingungen. Einen sehr geringen Anteil machen Naive und Central Memory Zellen aus (gemeinsam <10%). Deutlicher treten die Effektorpopulationen hervor (Effector Memory und Effector Zellen je 20%). Die  $T_{EMRA}$  Zellen dominieren das Bild (>50%). Alle Transfektionen erzeugen eine Verschiebung von Effector Zellen zu  $T_{EMRA}$  gegenüber der Kontrolle von >10%. Gated wurde nach eingangs vorgestelltem Schema auf  $CD8^+CD69^+$  T-Zellen. Gefärbt nach 1d Stimulation der PBMCs mit transfizierten Tumorzellen.

Im Rahmen der in Abschnitt 3.3.1.2 beschriebenen Kooperation wurde neben dem Zytokin-Panel auch ein angepasstes Memory-Panel eingebracht. Im PE-Kanal wurde CD69 als Aktivierungsmarker eingesetzt. Hinsichtlich seiner Kinetik passte dieser am Besten zum Setting einer Messung nach Stimulation von 1-3 Tagen.

Die Messung sollte klären, ob Zellen eines Memory-Kompartiments bevorzugt aktiviert werden und in welcher Weise die Aktivierung durch die Transfektion beeinflusst wird. Einige Autoren postulieren eine größere Potenz von *Central Memory*-Zellen in der Immunabwehr gegenüber *Effector Memory* Zellen (Monteiro et al. 2007). Zurückzuführen unter anderem auf deren stärkeres Proliferationspotenzial und effektivere Interaktion mit APCs, was schließlich zu einer ausgeprägteren Generation von *Effector* Zellen führen soll.

Von den drei Messpunkten nach 1-3 Tagen wurde lediglich die Messung an Tag 1 ausgewertet. Zum Einen, weil sich nur am ersten Tag eine aktivierte Population sauber abgrenzen ließ und zum anderen kann eine längere Stimulation den Phänotyp, der zu messenden Zelle, beeinflussen. Im Vordergrund der Messung stand welche Zellen aktiviert werden und nicht in wie der Phänotyp durch die Stimulantien beeinflusst wird. Zwischen den drei Transfektionsbedingungen konnten keine Unterschiede gezeigt werden (Abb 3.24). Kontrolle und Transfektion hingegen zeigten Unterschiede, Zellen welches Kompartiments rekrutiert wurden. So wurden deutlich mehr  $T_{EMRA}$  aktiviert (52-55% gegenüber 40% in der Kontrolle), der gleiche Anteil fehlte in der *T Effector* ( $T_{EFF}$ ) Population (20% gegenüber 35% in der Kontrolle). Entweder ist dies darauf zurückzuführen, dass die Transfektion mit scIL-12 besonders  $T_{EMRA}$  Zellen aktiviert oder auf *Effector* Zellen wurden CD45RO herabreguliert.  $T_{EMRA}$  Zellen zeigen ausgeprägte Effektorfunktionen. Bei Langzeitstimulation über 7 Tage konnte gezeigt werden, dass CCR7-Expression auf  $CD8^+$  Zellen dadurch herabreguliert wird (Geginat et al. 2003). In unserem Experiment wurde jedoch nur für 24h stimuliert. Vergleichbare Experimente nach Kurzzeitstimulation bis 6h konnten lediglich eine minimale Herabregulation von CCR7 zeigen (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung zweier Multicolor Flow Cytometry Färbepanels zur Charakterisierung von Effektor/Memory Populationen von T-Lymphozyten ausführlich beschrieben und auf ihre Aussagekraft im Hinblick auf Fragestellungen des Monitoring von T-Zell-Funktionen überprüft. Im ersten Schritt wurde detailliert die Antikörper-Auswahl vorgestellt und auf die Titration eingegangen. Zur Vorbereitung der Messung wurde eine zeitgemäße Kompensation beschrieben, die Bedeutung der Gating-Strategie erläutert und ein Kontrollendesign vorgestellt.

Während der Stimulationsmessungen zur Zytokinfreisetzung wurde ermittelt, welches Stimulanz in welchem Zeitverlauf und bei welcher Zelldichte eine maximale Zytokinantwort freisetzt. Verschiedene Korrelate dieser Aktivierung von T-Lymphozyten wurden verglichen. Um Messverfälschungen zu vermeiden wurde untersucht, welche Marker sich zur Ermittlung der Zellviabilität eignen.

Die Informationsfülle von Multicolor-Färbepanels wurde verdeutlicht anhand der Messung eines Normalkollektivs von Blutspendern am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Gentherapie des Instituts für Biochemie wurde das entwickelte Färbepanel eingesetzt, um ein neuartiges Tumorstimmulanz zu evaluieren.

### 4.1 Systematische Entwicklung von Multicolor-Färbepanels

#### 4.1.1 Optimierung von Stimulationsassays

Es konnte gezeigt werden, wie Messergebnisse von den Stimulationsbedingungen beeinflusst werden. Daraus ergibt sich, dass ein standardisiertes Vorgehen zur Vergleichbarkeit von Messungen unerlässlich ist. Ziel war es, in der Simulation eine größtmögliche Zellaktivierung zu erreichen und dabei eine sonstige Veränderung der Zellen zu vermeiden.

Es wurden die Stimulantien PMA, PHA-P, ConA, SEB und CD3/28-Beads verglichen.

Der Phorbol-ester PMA ist membrangängig und wirkt mitogen durch Aktivierung der zytoplasmatischen Proteinkinase C (Manger et al. 1987). Somit ist das Signal unphysiologisch gegenüber einer *in vivo* T-Zell-Aktivierung, es ist jedoch potenter als eine Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor. Obwohl es erfolgreich eingesetzt wird (McLaughlin et al. 2008) erwies es sich im Rahmen dieser Arbeit als nicht geeignet. Es konnte gezeigt werden, dass PMA eine Herabregulierung von CD4 bewirkt, und daher eine saubere Auftrennung der T-Zellen über CD4 nach der Stimulation nicht mehr möglich war. Ähnliches ist in der Literatur zu finden (Duvall et al. 2008), was möglicherweise auf den Zusatz von Ionomycin zurückzuführen sein könnte. Aufgrund der unphysiologischen Aktivierung und der CD4-Herabregulierung wurde von der Nutzung abgesehen.

Die Stimulation mit anti CD3/CD28 Beads ist interessant weil sie direkt am T-Zell-Rezeptor ansetzt und damit die natürliche Aktivierung imitiert. Jedoch ließen sich die Zellen nach Stimulation nicht mehr über eine CD3-Oberflächenfärbung differenzieren. Auch eine angestrebte Blockade der Rezeptor-Degradation durch Monensin zeigte keinen Effekt. Daher sind die Beads ungeeignet für T-Zell-Phänotypisierungen im Flow Cytometer.

SEB kommt der T-Zellaktivierung *in vivo* am nächsten. Es beeinflusste weder die CD3 noch die CD4-Expression und ist etabliert als Positivkontrolle (Chattopadhyay, Yu, et al. 2006; Perfetto et al. 2004). Aufgrund seiner geringen Nebenwirkungen und ausreichenden Aktivierung von T-Zellen wurde es hier vorzugsweise eingesetzt. Jedoch kann auch eine kurzzeitige Stimulation Zelleigenschaften verändern. Daher sollte bei einer Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, ob ein Phänotyp im stimulierten oder unstimulierten Zustand erhoben wurde.

Für SEB, das zuvor als optimales Stimulanz ausgewählt wurde, wurde die optimale Stimulationsdauer ermittelt. Ab 5h Stimulation zeigt sich eine Konstanz der Zellaktivierung. Dies deckt sich mit den Herstellerempfehlungen der verwendeten Antikörper (eBioscience) und des CMV Peptidpools (Miltenyi Biotec) und Angaben aus anderen Veröffentlichungen (McLaughlin et al. 2008; Duvall et al. 2008). Um Ergebnisse vergleichbar zu halten, sollte auf eine konstante Inkubationszeit zwischen und innerhalb eines Experimentes geachtet werden. Einzelne Versuche zeigten, dass ein verzögertes Zugeben von Monensin zu einer verstärkten Aktivierung führte. Dies wurde hier nicht systematisch untersucht, wäre jedoch sinnvoll zu vertiefen. Ein verzögerter Golgi-Block könnte eine Zytokin-Sekretion und Expression von Aktivierungsmarkern ermöglichen. Ein Schema könnte 8h Stimulationsdauer und Zugabe von Monensin nach 2h sein. Chattopadhyay et al. hingegen erreichten mit einer Stimulationsdauer von 6-24h und *gleichzeitiger* Gabe von Monensin eine ausgeprägte Stimulation (Chattopadhyay et al. 2005).

Die Zelldichte im Ansatz ist ein wichtiger Faktor für die Stärke der Stimulation. Zell-Zell-Kontakte können den Activation Induced Cell Death (AICD) behindern und so das Überleben steigern (Gorak-Stolinska et al. 2002). Ohne ausreichende Dichte kommt es nicht zur Aktivierung, da hierfür der Aufbau einer immunologischen Synapse mit dendritischen Zellen nötig ist. In den vorliegenden Versuchen zeigte eine Zelldichte bis  $6 \cdot 10^6$  Zellen/ml eine starke Reaktion auf Stimulation, wobei die Aktivierung bei weiterer Steigerung der Zelldichte stark abfiel. Eine geringere Zellzahl ist in der Regel auch nicht sinnvoll, damit ausreichend Events zur Messung seltener Zellen zur Verfügung stehen. Für die Stimulationen wurden 96er Rundboden-wells benutzt. Die ermittelte Zellzahl bezieht sich auf diese Bedingung.

Um flexibler zu arbeiten, wurden in diesen Experimenten fast ausschließlich gefrier-gelagerte PBMCs verwendet. Jedoch zeigen Veröffentlichungen, dass das Einfrieren sich signifikant auf die Zellviabilität auswirkt (Weinberg et al. 2000; Fowke et al. 2000). Dies fällt nicht weiter auf bei der Analyse der Gesamtpopulation. Arbeitet man jedoch mit monoklonalen Stimuli oder analysiert kleine Populationen wie Th17-Zellen können diese wenigen Zellen das Ergebnis verzerren.

Es konnte gezeigt werden, dass tote Zellen unspezifisch stärker Antikörper binden und sich im Scatter nicht eindeutig von lebenden Zellen abgrenzen lassen. Somit ist die Nutzung eines Markers für tote Zellen wichtig.

Es stehen mehrere Marker für die Nutzung im Flow Cytometer zur Verfügung, wovon allerdings viele gravierende Nachteile zeigen. AnnexinV kann bereits in die Apoptose eintretende Zellen markieren, benötigt jedoch den Einsatz spezieller Puffer während der Färbung. Ethidium monoazide (EMA) interkaliert mit der DNA poröser Zellen. Doch ist

zur Fixierung Bestrahlung mit UV-Licht nötig. Propidiumiodid (PI) wirkt ähnlich und benötigt kein UV-Licht, ist aber nicht für intrazelluläre Färbungen geeignet, da es nach Zellfixation alle Zellen anfärbt. Einen Ausweg bieten die *amine reactive dyes* (Perfetto et al. 2006). Diese Moleküle reagieren unspezifisch mit Aminogruppen die zahlreich auf der Oberfläche und innerhalb der Zelle vorhanden sind. Bei einer apoptotischen oder nekrotischen Zelle wird die Membran durchlässig und der Farbstoff kann eindringen. Anders als bei PI wird somit jede Zelle angefärbt, die toten Zellen zeigen jedoch eine stärkere Intensität. Die Färbung wird nicht durch eine folgende Fixierung/Permeabilisierung modifiziert. Die Handhabung gleicht der eines Antikörpers und erfordert somit keine zusätzlichen Schritte. Im Rahmen dieser Arbeit färbten die *amine reactive dyes* avitale Zellen zuverlässig vergleichbar mit PI, unabhängig von der Art des Zelltodes. Dabei trennten sie vitale und avitale Zellen im Dotplot klarer.

Ein anderer Weg wäre die Verwendung eines Dump-Channels zum Ausgaten unerwünschter Zellen. Statt eines einzelnen Markers werden verschiedene Marker für unerwünschte Zellen in einem Kanal kombiniert (Lamoreaux et al. 2006; Perfetto et al. 2004). Es hätten sich hier beispielsweise CD14 (Monozyten), CD19 (B-Zellen), CD56 (NK-Zellen) und ein Viabilitätsmarker angeboten. Kompensationsprobleme durch Kombination verschiedener Konjugate bestehen nicht, da sämtliche markierte Zellen ausgegattet werden. Die Genauigkeit der Messung steigt, da mehr Kriterien als der Scatter und die Viabilität zur Beurteilung der Zellen verfügbar sind. Andererseits steigt auch die Komplexität des Messansatzes und damit die Kosten. Somit wurde sich in dieser Arbeit gegen die Verwendung eines Dump-Channels entschieden, entgegen der Empfehlung in oben genannten Veröffentlichungen.

In diesem ersten Abschnitt meiner Diskussion wurde gezeigt, dass es zur Entwicklung eines Panels notwendig ist, Vorüberlegungen hinsichtlich der Bedingungen des Assays anzustellen, um die Möglichkeit zu erhöhen, auch seltene Events zuverlässig messen zu können. Dabei kam überraschend heraus, dass sich das häufig verwendete PMA wenig eignete, und daher SEB zur Stimulation verwendet wurde. Dabei sollte im Hinterkopf behalten werden, dass CD8<sup>+</sup> Zellen bei dieser Stimulationsart eine geringere Antwort zeigen. Die Inkubationszeit sollte mindestens 5 Stunden betragen. Sie kann auch verlängert werden, sollte jedoch innerhalb logisch zusammenhängender Experimente gleich bleiben, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Dichte der Zellen sollte 6\*10<sup>6</sup>/ml nicht überschreiten, um eine optimale Antwort nicht zu schwächen. Es ist vorteilhaft einen Vitalfarbstoff zu verwenden, als effizient und unkompliziert hat sich nearIR ViD erwiesen.

#### 4.1.2 Korrelate der Aktivierung

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen durch Zytokinproduktion in Folge von antigenen Stimulation charakterisiert. Hierfür wurden in den Panels bis zu drei Zytokine kombiniert. Damit lassen sich bereits grobe Aussagen über die Qualität einer T-Zell-Antwort treffen (Seder et al. 2008). Um eine vollständigere Aussage zu treffen, wäre jedoch die Erfassung sämtlicher Antigen-spezifischer T-Zellen nötig. Produzieren Zellen keines der untersuchten Zytokine werden sie nicht einbezogen und es können Zerrbilder der realen Situation entstehen. Es ist nötig antigen-spezifische von nicht-spezifischen Zellen zu unterscheiden. Bei der Auswahl eines passenden Korrelates der Aktivierung (Aktivierungsmarker) müssen Anforderungen beachtet werden.

(a) Die *Kinetik* des Markers muss zu dem Versuchsaufbau passen. Proliferationsassays mit Verdünnungs-basierten Farbstoffen wie CFSE haben beispielsweise eine sehr langsame Kinetik. Responsive Zellen beginnen nach 2 bis 3 Tagen mit der Zellteilung, die durch Farbstoffverdünnung sichtbar gemacht wird. In dieser Arbeit wurden die Oberflächenmarker CD25, CD69, CD137 und CD154 auf ihre Eignung in der 6h Stimulation untersucht. Für CD4 Zellen eignet sich demnach CD154 am besten durch die stärkste Reaktion (Chattopadhyay et al. 2005). Für CD8 kann entweder CD69 oder CD137 verwendet werden (Wehler et al. 2008).

(b) Wie viele der aktivierten Zellen werden durch den Marker als solche markiert (*Sensitivität*)? In dieser Arbeit wurde die größtmögliche Aktivierung als beste gewertet. Jedoch bleibt die Frage wie viele Zellen nicht berücksichtigt werden. Eine kombinierte Färbung mit verschiedenen Aktivierungsmarkern könnte Unterschiede aufdecken. Die Zahl der Antigen-spezifischen Zellen könnte durch den Einsatz von MHC-Multimeren bestimmt werden, jedoch ist diese Methode zum einen abhängig vom HLA-Haplotyp, und zum anderen gibt die Rezeptorspezifität keine Aussage über die Funktionalität der Zelle. Im ELISA würde die Möglichkeit zur Bestimmung des Phänotyps fehlen. CD69 zeigte in meinen Versuchen eine ausgeprägte Aktivierung der CD8-Population. Andere Arbeitsgruppen haben dies interpretiert als Detektion von nicht-spezifischer Bystander-Aktivierung (Wehler et al. 2008).

(c) Werden bestimmte Zellpopulationen bevorzugt markiert (*Spezifität*)? Intrazelluläre Zytokin-Anfärbungen detektieren naturgemäß nur diejenigen Zellen, die auf Stimulation mit der Produktion des jeweiligen Zytokins reagieren. Auch dieser Frage könnte mit kombinierten Färbungen unterschiedlicher Marker begegnet werden – unter der Annahme, dass eine Kombination nahezu alle Zellen identifiziert. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass der Marker CD154 auf CD4 Zellen nahezu alle zytokinproduzierenden Zellen unabhängig von der Art des Zytokins identifiziert (Chattopadhyay et al. 2005).

(d) Die *Handhabung* der gängigen Aktivierungsmarker ist simpel. Sie lassen sich ohne zusätzlichen Aufwand mit anderen Oberflächenfärbungen kombinieren. Für CD154 wurde eine Kokultur vorgeschlagen, doch meine Versuche zeigten eine ausgeprägte Färbung in der etablierten Oberflächenfärbung (Chattopadhyay et al. 2005). MHC-Multimere bedeuten einen erheblichen Mehraufwand. Der HLA-Haplotyp des Patienten muss bekannt sein und es sind nur wenige Multimere verfügbar.

In der Gesamtbetrachtung waren die Marker CD154 für CD4 und CD137 für CD8 T-Zellen für die vorgestellten Versuchsbedingungen am besten geeignet. Jedoch sind weitere Versuche zur vergleichenden Betrachtung ihrer Sensitivität und Spezifität notwendig.

### 4.1.3 Paneldesign

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde, basierend auf Überlegungen von Roederer und Baumgarth (Baumgarth & Roederer 2000), ein systematisches Vorgehen zur Entwicklung eines Basispanels zur Charakterisierung von T-Zell-Antworten herausgearbeitet und beispielhaft angewendet.

Die Titration der Antikörper erfolgte in systematischer Weise auf Basis von Arbeiten von Kantor et al (Kantor & Roederer 1997). Ziel war es, Antikörper in möglichst geringen

Konzentrationen einzusetzen, um Spillover-Intensität und Kosten zu verringern, bei bestmöglicher Trennung von positiven und negativen Populationen. Der Quotient der Mediane der Intensitäten von positiven und negativen Populationen, sowie der prozentuale Anteil positiver Populationen an der Gesamtpopulation wurden für jede Titrationsstufe verglichen. Ausgewählt wurde die stärkste Verdünnung, die bei optimaler Trennung zu keiner Verringerung der Populationsgröße führte. Dieses Vorgehen führt zu der optimalen Verdünnung, was besonders bei Zytokin-Antikörpern wichtig ist. Eindeutige Zellmarker wie CD3 sollten vom Optimum weiter herab titriert werden, eine maximale Trennung der Populationen ist nicht notwendig.

Als Kontrollen der Messungen wurde das Prinzip der *Fluorescence minus one* (FMO) Kontrolle eingeführt (Roederer 2001). Neben unstimulierten Kontrollen, sowie einer gesunden Vergleichsgruppe, wird diese Art der Kontrolle verwendet, um positive und negative Events abzugrenzen. Sie sollte ungefärbte Kontrollen ersetzen. Durch Weglassen von jeweils einem Farbstoff bleiben Spillover-Effekte aus den anderen Kanälen, die den Hintergrund der Messung bestimmen, und ermöglichen so das saubere Setzen der Gates für die Auswertung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die zentrale Bedeutung der Kompensation aufgezeigt und eine zeitgemäße Durchführung herausgearbeitet werden. Es wurden Beads eingesetzt, um die Antikörper zu binden. Damit wurde der Einfluss der unterschiedlichen Autofluoreszenz der Zellen auf die Messung vermieden. Jedoch mussten für Antikörper und Viabilitäts-Marker unterschiedliche Beads eingesetzt werden. Diese Beads unterschieden sich zwar in ihrer Autofluoreszenz, im Vergleich zu Zellen war diese jedoch konstant und einheitlich. Die Kompensation wurde dadurch nicht beeinträchtigt, denn gefärbte und ungefärbte Beads wurden nur innerhalb einer Bead-Klasse zur Berechnung der Kompensationsmatrix genutzt. Trotz Kompensation konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität durch Spillover beeinträchtigt wird. Dieses *broadening* der Populationen führt nicht zu einer Verschiebung des Median der Population, da der Fehler linear auf alle Events wirkt (Roederer 2001). Eine sorgfältige Antikörper-Auswahl, unter Berücksichtigung dieser Effekte, ist daher unerlässlich.

Es konnte herausgearbeitet werden welche Fluorochrome in einem 7-Farben-Panel zum Einsatz kommen sollten nach rationalen Kriterien wie Spillover, Fluorochrom-Intensität und Ausstattung des verwendeten Durchflusszytometers. Die verwendeten Antikörper wurden ebenfalls rational ausgewählt. Die matten Farben PerCP-Cy5.5, nearIR und PacificBlue wurden mit Antikörpern gekoppelt, die Populationen eindeutig trennen. CD56 wurde in der helleren Farbe PE-Cy7 verwendet, denn es findet sich in kontinuierlicher Ausprägung auf der Zelloberfläche. FITC, PE und APC wurden für sensible Marker reserviert. PE und APC eignen sich aufgrund ihres hohen Färbeindexes für Zytokine und kontinuierliche Marker. FITC hat zwar einen niedrigen Färbeindex, die Sensitivität des Kanals wird aber wenig durch Spillover eingeschränkt (siehe Tabelle 8). Unter den mehreren bestehenden Möglichkeiten wurde die Kombination ausgewählt, die am wenigsten Spillover in die reservierten Kanäle zeigte. In Panel III zeigte sich eine starke Sensitivitätsminderung des APC-Kanals, wahrscheinlich ausgelöst durch Degradation von CD3 APC-Cy7. Eine Überlegung war durch Erhöhung der Spannung der PMT im APC-Kanal

oder Senkung im APC-Cy7-Kanal diese Störung auszugleichen, aber eine manuelle PMT-Änderung machte eine neue Kompensationsmatrix nötig und führt zu einem Verlassen des optimalen Sensitivitätsbereich der PMTs selbst. Dies könnte trotzdem ein gangbarer Weg sein, wenn PacificBlue für einen anderen Marker benötigt wird. PerCP-Cy5.5 wurde gegenüber PerCP aufgrund der höheren Intensität (eBioscience 2011a) bevorzugt. APC-Alexa 750 soll gegenüber APC-Cy7 eine höhere Stabilität aufweisen. Das Angebot an AmCyan-Konjugaten ist gering, somit konnte an deren Stelle der aqua ViD platziert werden.

Im Basispanel wurde als optimale Konstellation Panel I ausgewählt:

<b>Fluorochrom</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>Alexa647</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>PerCP-Cy5.5</b>	<b>PacificBlue</b>	<b>APC-Cy7</b>
<b>Antikörper</b>	<i>frei</i>	<i>frei</i>	<i>frei</i>	CD56	CD4	CD3	nearIR

Tabelle 11: Das Basispanel.

Ausgehend von diesem Basispanel wurde ein Panel zur Messung von Zytokinproduktion und eines zur Charakterisierung von Memory-Zellen entwickelt. Beide zeichnen sich durch Flexibilität, im Sinne von einfacher Austauschbarkeit der Marker, und Verlässlichkeit, aus.

Ein weiterer Schritt zur Verbesserung des Panels wäre eine Erweiterung auf eine 8-Parameter-Messung mit Hilfe von QDOT-Nanopartikeln. Dies sind anorganische Kristalle bestehend aus Cadmium-Selen, umhüllt mit einer Zink-Sulfit-Hülle, die sich an Antikörper koppeln lassen. Vorteil der QDOTs sind ihre hohe Fotostabilität und schmale Emissionsspektren, was nur geringe Anpassungen in der Kompensation nötig macht (Chattopadhyay, Price, et al. 2006). Für die Verwendung der Nanopartikel wäre eine Anpassung der Hardware des FACS Canto II notwendig.

Die Methodik lässt sich standardisieren, die Hauptvariation liegt dann in unterschiedlichem Gating und Instrumenteneinstellungen (Nomura et al. 2008).

## **4.2 Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen der Multicolor Flow Cytometry**

### **4.2.1 Qualität der T-Zell-Antwort**

Das Zytokin-Panel ermöglicht eine Betrachtung von T-Zell-Subpopulationen. Diese können hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion charakterisiert werden. Es stellt sich die Frage welche Wertigkeit für das Immunsystem verschiedene Zytokinexpressionsmuster haben, also wie die Qualität der Immunantwort zu bestimmen ist. Der Begriff der Qualität wurde von Roederer et al. in die Diskussion eingeführt in Zusammenhang mit dem Bestreben, messbare Korrelate des erzielten Schutzes bei der Entwicklung neuer Impfstoffe zu definieren (Seder et al. 2008).

Häufig dienen Antikörper-Titer als messbares Korrelat für den erzielten Impfstoff. Diese stellen jedoch nicht in jedem Fall den relevanten Parameter dar. So besitzt der AK-Titer im Zusammenhang mit der Infektion mit *Leishmania major* keinen prädiktiven Wert für den Krankheitsverlauf (Darrah et al. 2007).

Bei mit HIV2 infizierten Patienten stellte sich der Anteil sogenannter polyfunktionaler T-Zellen, d.h. T-Zellen, die mehr als ein Zytokin produzieren, als prädiktiver Parameter für den Krankheitsverlauf heraus (Duvall et al. 2008).

Mit den ausgearbeiteten Panels lassen sich neben dem Anteil von polyfunktionalen Zellen auch andere Parameter bestimmen. Die Panels können somit das Werkzeug für Ansätze sein, Qualitäten von T-Zell-Antworten zu bestimmen. Dabei steht es noch aus, festzulegen, welche Parameter den höchsten prädiktiven Wert für die Immunantwort gegen verschiedene Pathogene innehaben. Ein erster Schritt kann es sein, die Expressionsmuster verschiedener Marker im Verlauf einer erfolgreichen Immunabwehr zu bestimmen. Jedoch stehen nur für wenige Pathogene Peptid-Pools zur Bestimmung Antigen-spezifischer Zellen bereit. Zur Bewertung der *Effektivität* der Abwehr in vivo eignet sich das vorgestellte Panel allein nicht. Besser sind hier *killing assays* (Casazza et al. 2006) oder eine Korrelation des Phänotyps der Zellen mit klinischen Daten.

#### 4.2.2 Definition von Populationen

Die Multicolor Flow Cytometry bietet die Möglichkeit mit Einzel-Zell-Auflösung Phänotyp und Funktion kleiner T-Zell-Subpopulationen detailliert zu charakterisieren. Die Stärke besteht in der Flexibilität und der simultanen Verwendung vieler Marker. Es ist die einzige Methode um auf Einzelzellebene ohne Zellyse eine genaue Charakterisierung vorzunehmen.

Eine Problematik ist, dass mit zunehmender Anzahl der verwendeten Marker nahezu unbegrenzt viele Subpopulationen definiert werden können. Bei acht Farben sind dies theoretisch schon 256, bei dem aktuellen Maximum von 20 Farben könnten mehr als eine Million Subpopulationen differenziert werden. Hier wird deutlich, dass ein Konsensus bezüglich der genauen Definition einer Population nötig ist, und mit jedem hinzugekommenen Marker erneut überprüft werden muss. Gibt man einer Subpopulation einen Namen, ist stets zu erwähnen anhand welcher Marker man definiert.

Die Definition von Memory-Populationen ist mit dem hier vorgestellten Memory-Panel möglich. Der geführte Diskurs zur Definition gibt einen guten Einblick in die Chancen und Schwierigkeiten, die eine steigende Zahl von Markern bietet. Eine Definition von langlebigen, proliferationsstarken und effektiven T-Memory-Zellen ist Basis für die Entwicklung von Zelltherapien und Impfstoffen.

Obwohl theoretisch ebenso viele Subpopulationen definiert werden könnten wie Markerkombinationen vorhanden sind, korreliert eine große Anzahl von Markern auffallend miteinander (Appay et al. 2008), und bestätigt die Wertigkeit der Durchflusszytometrie für die Einteilung. Die klassische Einteilung von Effektor/Memory-Populationen nach Sallusto et al. definiert Naive, *Central Memory* und *Effector Memory* Zellen anhand ihrer Expression von CCR7 und CD45RO (Sallusto et al. 2004). Effektorfunktionen seien vor allem in der Gruppe der *Effector Memory* Zellen zu finden. Monteiro et al. fanden hingegen, dass in der CD8-Subpopulation Effektorfunktionen unabhängig von der CD45RA/RO-Expression moduliert werden, aber abhängig von CCR7 und CD27 (Monteiro et al. 2007). In dieser Arbeit durchgeführte Messungen mit dem Zytokin Interferon-Gamma (IFN $\gamma$ ), sehen den größten Teil der Produzenten in der Gruppe der *Central Memory* Zellen. Jedoch zeigen sich im Dotplot Unterschiede zwischen CD4 und CD8 Zellen. CD4-IFN $\gamma$ -Produzenten erscheinen unabhängig von der CCR7-Expression, wohingegen CD8-IFN-Produzenten unabhängig von der CD45RO Expression erscheinen.

Dies deckt sich mit der Betrachtung von Monteiro et al. Zur Einschätzung einer eventuellen Überlegenheit von CD27 zu CD45RO bei CD8<sup>+</sup> Zellen müssten weitere Messungen durchgeführt werden.

Eine neuere Betrachtung identifiziert eine Population von Memory-Stammzellen mit dem Markerprofil CD45RO<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> IL-7RA<sup>+</sup>, und untermauert die Überlegung mit funktionellen Tests (Gattinoni et al. 2011). Damit werden die Zellen mit größtem proliferativen Potential und der Fähigkeit, zu verschiedenen Effektor-/Memory-Populationen zu differenzieren, im Kompartiment der naiven Zellen verortet.

Aus der geschilderten Problematik ergeben sich neue Herausforderungen an die Auswertungssoftware. Neue Ansätze zielen auf die Automatisierung von Gating, Abgrenzung von Populationen und das Aufdecken von Unterschieden zwischen Proben (Lugli et al. 2010).

Offensichtlich besteht noch kein Konsens bei der Definition von Memory-Populationen. Auf dem Weg zur klinischen Anwendung sind jedoch Standardisierungen nötig, die noch nicht herausgearbeitet wurden. Diese Arbeit liefert hier einen Beitrag und kann als Referenz herangezogen werden. Es wurde mit dem Memory-Panel im Normalkollektiv gesunder Blutspender die Verteilung von Effektor-/Memory-Populationen im T-Zell-Pool gemessen. Dabei zeigten CD4-Zellen eine andere Verteilung als CD8-Zellen. Es ist zu definieren, welche Abweichungen von diesen normalen Verteilungen Krankheitswert haben könnten. Dazu sind zusätzliche klinische Daten nötig. Es können aber auch Antigen-spezifische Verschiebungen betrachtet werden, z.B. bei CMV-Infektion (Casazza et al. 2006). Vergleiche der Profile könnten Aufschluss über Eigenheiten der Erreger geben.

### 4.2.3 Entwicklung einer Tumorstoffimpfung

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Gentherapie des Instituts für Biochemie wurden die Zytokin- und Memory-Panels bei der Validierung einer Tumorstoffimpfung angewendet. Bei diesen Versuchen wurden humane Tumorzellen mit verschiedenen Zytokinen oder anderen Effektormolekülen transfiziert, und auf ihre Fähigkeit untersucht, eine Immunantwort bei PBMCs gesunder Kontrollpersonen auszulösen.

Stellvertretend für die umfassend erhobenen Daten, sind zwei Ergebnisse herauszustellen. Wie bereits erwähnt, sind Mehrfachproduzenten von Zytokinen in ihrer Immunkompetenz, Einzelproduzenten überlegen. Die Identifizierung polyfunktionaler T-Zellen erlaubt es, die Unterschiede hinsichtlich des immunstimulierenden Effektes, den die unterschiedlichen Transfektionen erzielten, zu bewerten (Abb 3.20). Einerseits zeigte bereits das Einbringen von scIL-12 und CD137L in den Tumor einen deutlichen Anstieg von TNF<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL17<sup>-</sup> CD8 T-Zellen um den Faktor 10. Eine weitere Verdopplung in dieser Messgröße bewirkte das Einbringen von IL-2. Dies unterstreicht den Nutzen des zusätzlichen Aufwandes.

Die Immunreaktion im Experiment beruht auf einer Alloreaktion, da Blutspender (PBMC) und verwendete Tumorzelllinie unterschiedliche MHC-Typen aufwiesen, was zur Aktivierung von 1-10% aller T-Zellen führen kann (Janeway 2002). Es dürften jedoch keine präformierten tumorspezifischen T-Zellen existieren. Die Alloreaktion kann durch die Transfektion modifiziert werden. Die untransfizierte Kontrolle zeigte jedoch kaum reaktive IFN $\gamma$  Einzelproduzenten und TNF/IFN $\gamma$  Doppelproduzenten. Aber bei al-

len untersuchten Lymphozytensubpopulationen fand sich in der Kontrolle eine TNF-Produktion, die bei CD4 Zellen sogar gleichauf mit der maximal transfizierten Bedingung war (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ist in Frage zu stellen, inwieweit der ausgewählte Blutspender repräsentativ für das anvisierte Patientenkollektiv ist.

Bei diesen Versuchen sind außerdem die Schwierigkeiten hervorzuheben, die Experimente im humanen System mit sich bringen (Brenchley et al. 2003).

Vergleicht man in diesem Experiment die Verteilung der Effektor-/Memory-Populationen für CD8-Zellen mit der im hier erhobenen Normalkollektiv (Abb 3.23), so zeigen sich Unterschiede. In den Transfektionen werden wesentlich weniger *Naïve* und *Central Memory* Zellen aktiviert. Der *Effector Memory* und *Effector* Phänotyp (zusammengefasst im Normalkollektiv) zeigte keine Verschiebung gegenüber dem Normalkollektiv. Hingegen stiegen die  $T_{EMRA}$  Zellen stark an. Das bedeutet, es wurden aus dem gesamten CD8-Pool, bevorzugt Zellen mit starken Effektorfunktionen rekrutiert, jedoch nicht wie erwartet *Central Memory* Zellen mit ihrem hohen proliferativen Potential.

## 5 Zusammenfassung

Die funktionelle Beurteilung von T-Zellen ist ein wichtiges, aber bisher nur unbefriedigend gelöstes diagnostisches Problem im Umgang mit Patienten mit eingeschränkter Immunantwort. Die Entwicklung der Multicolor-Durchflusszytometrie bietet neue Möglichkeiten, T-Zell Antworten zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Multicolor-Durchflusszytometrie in der Arbeitsgruppe etabliert und anhand praktischer Versuche deren Anwendungsmöglichkeiten untersucht. Dabei wurde ein systematisches Konzept für die Entwicklung von Färbepanels entwickelt, mit dessen Hilfe zwei Panels (*Zytokin-Panel* und *Memory-Panel*) erstellt wurden. Schließlich wurden die Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen des Ansatzes untersucht.

Um zu gewährleisten, dass auch seltene Events zuverlässig detektiert werden können, mussten die Bedingungen des Assays optimiert werden. Als Stimulus war SEB am besten geeignet. Die Inkubationszeit sollte mindestens 5 Stunden betragen. Als optimale Stimulationsdauer zeigten sich 8.5h mit Zugabe eines Golgi-Blockers nach 2h. Die Dichte der Zellen sollte  $6 \cdot 10^6/\text{ml}$  nicht überschreiten, um eine optimale Antwort nicht zu schwächen. Es ist wichtig, einen Vitalfarbstoff zu verwenden, insbesondere um seltene Events zu messen. Für die intrazelluläre Anfärbung hat sich der *amine reactive dye* nearIR ViD als geeignet erwiesen.

Für die Auswahl eines Korrelates der Aktivierung spielen die Kinetik, Sensitivität, Spezifität und Handhabung eine Rolle. Unter den hier etablierten Bedingungen waren CD154 für CD4 T-Zellen und CD137 für CD8 T-Zellen am besten geeignet.

Für das Panel-Design ist eine sorgfältige Zuordnung der Antikörper zu den Farbstoffkanälen des Geräts wichtig. Sie erfolgte nach rationalen Kriterien wie Spillover, Fluorochrom-Intensität und Ausstattung des verwendeten Durchflusszytometers. Daraus ergab sich ein Basispanel zur Bestimmung der Haupt-Zellpopulationen, das nach den Anforderungen des aktuellen Experimentes mit Aktivierungsmarkern ergänzt werden konnte: CD56 PE-Cy7, CD4 PerCP-Cy5.5, CD3 PacificBlue und nearIR ViD. Die Kanäle für FITC, PE und Alexa647 blieben für Anpassungen frei.

Die Kompensation der Messungen nimmt eine wichtige Stellung in der Multicolor-Durchflusszytometrie ein. Um eine korrekte Kompensation zu gewährleisten, wurde jeder Antikörper nach einem systematischen Ansatz titriert. Um den Einfluss der Autofluoreszenz von Zellen auf die Kompensationseinstellungen auszuschalten, wurde die Kompensation mit an Beads gebundenen Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle zur Bestimmung der Positivität von Aktivierungsmarkern wurde das Prinzip der *fluorescence minus one* Kontrolle eingesetzt.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Panels wurden exemplarisch angewendet, um ihre Möglichkeiten und Grenzen zu untersuchen. Mit dem Zytokin-Panel konnte die Qualität von T-Zell-Antworten bestimmt werden und Einfach- bis Dreifach-Zytokinproduzenten unterschieden werden. Im T-Zell-Pool eines Normalkollektivs ergab sich eine Aufteilung 7% (triple), 24% (double) und 69% (single) unter den CD4 Zellen und 1% (triple), 28% (double) und 71% (single) unter den CD8-Zellen. Das Normalkollektiv kann als Bezugsrahmen für weitere Messungen verwendet werden. Die Qualität der Antwort spielt eine zentrale Rolle bei der Impfstoffentwicklung.

Die zunehmende Menge an verfügbaren Markern macht einen Konsensus in der Definition von T-Zell-Populationen nötig. Mit dem Memory-Panel wurden die Reifungsstadien von T-Zellen betrachtet. Dabei zeigte sich im Normalkollektiv gesunder Blutspender bei CD4-Zellen eine andere Verteilung als bei CD8-Zellen. Es ist zu definieren welche Abweichungen Krankheitswert haben könnten.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Gentherapie des Instituts für Biochemie wurde die T-Zell-Antwort auf eine Tumorstoffimpfung charakterisiert. In der Zytokinbestimmung nach 24h Inkubation zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich des Effektes, den die Transfektion unterschiedlicher Zytokine in Tumorzellen auf die Stimulation einer allopathen T-Zell-Antwort erzielten.

## Abstract

In the evaluation of immunocompromised patients the functional assessment of T cells is an important but not yet sufficiently solved diagnostic problem. Multicolor flow cytometry offers new possibilities in the characterization of T cell responses. In the present work multicolor flow cytometry was established in the workgroup and its applications were evaluated by using practical experiments. A systematic approach for designing antibody panels was developed, resulting in two panels (cytokine panel and memory panel). Eventually potential applications and limits of this approach were studied.

To reliably detect even rare events the stimulation assay had to be optimized. SEB was the most suitable stimulating agent. Assays should be incubated for at least 5 hours. The optimal duration of stimulation was determined at 8.5 h with addition of a Golgi block after 2 h. The cell density should not exceed  $6 \times 10^6/\text{mL}$  to not weaken an optimal response. To detect rare events it is crucial to use a viability dye. For intracellular staining the amine reactive dye nearIR ViD was suitable.

For the selection of an activation marker the kinetics, sensitivity, specificity and handling have to be considered. With the assay conditions outlined above the most suitable activation markers were CD154 for CD4 T cells and CD137 for CD8 T cells.

When designing a panel a careful pairing of fluorophores to fluorescence channels of the flow cytometer has to be ensured. This was done by rational criteria like spillover, fluorochrome intensity and equipping of the flow cytometer in use. The result is a basic panel to characterize the main cell populations with the option to expand further activation markers: CD56 PE-Cy7, CD4 PerCP-Cy5.5, CD3 PacificBlue and nearIR ViD. We spared the channels for FITC, PE and Alexa647 for adaptations.

Compensation is of utmost importance in multicolor flow cytometry. In order to minimize spillover, each antibody was titrated by a systematic approach. To eliminate the influence of cell autofluorescence to the compensation settings, the compensation was carried out using antibodies bound to beads. As a control to determine the cut off for activation markers, the principle of *fluorescence minus one* was used.

The panels developed in the present work were applied exemplarily to study their applications and limitations. The cytokine panel can be used to determine the quality of T cell responses and to distinguish single, double and triple cytokine producers. In a group of healthy subjects there were 7% triple, 24% double and 69% single cytokine producers within the CD4 cells and 1% triple, 28% double and 69% single producers in the CD8 cells. This group can be used as a norm group for further experiments. The quality of the T cell response plays a pivotal role in vaccine development.

The constantly growing number of available markers demands a consensus in the definition of T cell populations. The memory panel was used to measure stages of T cell maturation. In the norm group distribution within the stages differed in CD4 and CD8 cells. It has yet to be defined which deviations have clinical significance.

In collaboration with the gene therapy working group from the Department of Biochemistry the T cell response to a tumor vaccine was characterized. In these experiments the cytokine panel showed significant differences in the effect achieved by the transfec-

tion of different cytokines into tumor cells to stimulate the allogeneic T cell response after 24h of incubation.

# Abkürzungsverzeichnis

AICD

Activation Induced Cell Death

APC

Allophycocyanin

antigenpräsentierende Zelle

BC

Buffy Coat

BFA

Brefeldin A

BSA

Bovine Serum Albumine

CCR7

CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7

CFSE

Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

CM

Central Memory

ConA

Concavalin A

CTL

zytotoxische T-Zelle

DAG

Diacylglycerin

DC

dendritische Zellen

DMSO

Dimethylsulfoxid

EM

Effector Memory

EMA

Ethidium monoazide

FACS

Fluorescence-activated cell sorting

FC

Flow Cytometry

FCS

Fetal calf serum

FITC

Fluorescein Isothiocyanat

FMO

Fluorescence minus one

FSC

Forward Scatter

ICS

Intracellular staining

IFN $\gamma$

Interferon-Gamma

LPS

Lipopolysaccharid

MFI

Median der Fluoreszenzintensität

MHC

Major Histocompatibility Complex  
NK  
natürlichen Killerzellen  
PBMC  
Peripheral Blood Mononuclear Cell  
PE  
Phycoerythrin  
PerCP  
Peridinin-Chlorophyll-Protein  
PGN  
Peptidoglycan  
PHA-P  
Phytohaemagglutinin  
PI  
Propidiumiodid  
PKC  
Proteinkinase C  
PMA  
Phorbol 12-myristate 13-acetate  
PMT  
Photomultipliertubes  
scIL-12  
single chain IL-12 Fusionsprotein  
SEB  
Staphylococcus Enterotoxin B  
SS  
Surface staining  
SSC  
Side Scatter  
TCR  
T-Zell-Rezeptor  
TEFF  
T Effector  
TEMRA  
T Effector Memory RA-Positiv  
TLR  
Toll Like Receptor  
TNF  
Tumornekrosefaktor

## Literaturverzeichnis

- Appay, V. et al., 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry Part A*, 73A(11), pp.975–983.
- Badovinac, V.P. & Harty, J.T., 2006. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunological Reviews*, 211, pp.67–80.
- Bagwell, C.B. & Adams, E.G., 1993. Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 677, pp.167–184.
- Baumgarth, N. & Roederer, M., 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), pp.77–97.
- BD Biosciences, 2011a. BD FACSCanto II Datenblatt. Available at: [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/is/doc/tds/instruments/live/web\\_enabled/23-8786-01\\_FACSCanto%20II%20Tech%20Spec.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/is/doc/tds/instruments/live/web_enabled/23-8786-01_FACSCanto%20II%20Tech%20Spec.pdf).
- BD Biosciences, 2011b. BD Fluorescence Spectrum Viewer. Available at: [http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp).
- Beverley, P.C.L., 2008. Primer: making sense of T-cell memory. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 4(1), pp.43–9.
- Brenchley, J.M. et al., 2003. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*, 101(7), pp.2711–20.
- Casazza, J.P. et al., 2006. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(13), pp.2865–77.
- Chattopadhyay, P.K., Price, D.A., et al., 2006. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nature Medicine*, 12(8), pp.972–7.
- Chattopadhyay, P.K., Yu, J. & Roederer, M., 2005. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nature Medicine*, 11(10), pp.1113–7.
- Chattopadhyay, P.K., Yu, J. & Roederer, M., 2006. Live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T-cell responses by CD154 expression. *Nature Protocols*, 1(1), pp.1–6.
- Darrah, P.A. et al., 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature Medicine*, 13(7), pp.843–50.
- Disis, M.L. et al., 2006. Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *Journal of Immunological Methods*, 308(1-2), pp.13–8.
- D’Orazio, J.A., Burke, G.W. & Stein-Streilein, J., 1995. Staphylococcal enterotoxin B activates purified NK cells to secrete IFN-gamma but requires T lymphocytes to augment NK cytotoxicity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(3), pp.1014–23.
- D’Orazio, J.A. & Stein-Streilein, J., 1996. Human natural killer (NK) cells present

- staphylococcal enterotoxin B (SEB) to T lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 104(2), pp.366–73.
- Duvall, M.G. et al., 2008. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *European Journal of Immunology*, 38(2), pp.350–63.
- eBioscience, 2011a. Fluorochrome Intensity Chart. Available at:  
[www.ebioscience.com/ebioscience/whatsnew/pdf/Multicolor\\_Flow\\_Cytometry\\_Poster.pdf](http://www.ebioscience.com/ebioscience/whatsnew/pdf/Multicolor_Flow_Cytometry_Poster.pdf).
- eBioscience, 2011b. Immunofluorescent Staining for Flow Cytometry. Available at:  
<http://www.ebioscience.com/ebioscience/appls/FCS.htm>.
- eBioscience, 2011c. Intracellular Immunofluorescent Staining for Flow Cytometry. Available at: <http://www.ebioscience.com/ebioscience/appls/FCI.htm>.
- Fleischer, B. & Schrezenmeier, H., 1988. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 167(5), pp.1697–707.
- Fowke, K.R. et al., 2000. Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunological Methods*, 244(1-2), pp.139–44.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I. & Garrido, F., 2003. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of Cellular Physiology*, 195(3), pp.346–55.
- Gattinoni, L. et al., 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 17(10), pp.1290–1297.
- Geginat, J., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F., 2003. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 101(11), pp.4260–4266.
- Gorak-Stolinska, P., Kemeny, D.M. & Noble, A., 2002. Activation-induced cell death in human T cells is a suicidal process regulated by cell density but superantigen induces T cell fratricide. *Cellular Immunology*, 219(2), pp.98–107.
- Hamann, D. et al., 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(9), pp.1407–18.
- Harty, J.T. & Badovinac, V.P., 2008. Shaping and reshaping CD8<sup>+</sup> T-cell memory. *Nature Reviews. Immunology*, 8(2), pp.107–19.
- Janeway, C.A., 2002. *Immunologie* 5th ed., Spektrum Akademischer Verlag.
- Kaech, S.M. et al., 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology*, 4(12), pp.1191–1198.
- Kantor, A.B. & Roederer, M., 1997. FACS Analysis of Leukocytes. In *The handbook of Experimental Immunology*. Cambridge, UK: Blackwell Science, pp. 49.1–49.13. Available at:  
<http://www.herzenberglab.org/images/stories/herzenberglab/Publications/Reprints/LAH>

408.pdf.

- Klebanoff, C.A., Gattinoni, L. & Restifo, N.P., 2006. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological Reviews*, 211, pp.214–24.
- Lamoreaux, L., Roederer, M. & Koup, R., 2006. Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. *Nature Protocols*, 1(3), pp.1507–16.
- Lee, J.A. et al., 2008. MIFlowCyt: the minimum information about a Flow Cytometry Experiment. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(10), pp.926–30.
- Lugli, E., Roederer, M. & Cossarizza, A., 2010. Data analysis in flow cytometry: the future just started. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(7), pp.705–713.
- Maecker, H.T. et al., 2001. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 255(1-2), pp.27–40.
- Manger, B. et al., 1987. The role of protein kinase C in transmembrane signaling by the T cell antigen receptor complex. Effects of stimulation with soluble or immobilized CD3 antibodies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 139(8), pp.2755–60.
- Mary L Disis, 2005. PBMC Cryopreservation Using Human Serum Albumin (SOP). Available at:  
[http://depts.washington.edu/tumorvac/MultiMedia/Publications/2005\\_SOP\\_PBMC\\_Cryopreservation.pdf](http://depts.washington.edu/tumorvac/MultiMedia/Publications/2005_SOP_PBMC_Cryopreservation.pdf).
- McLaughlin, B.E. et al., 2008. Nine-color flow cytometry for accurate measurement of T cell subsets and cytokine responses. Part I: Panel design by an empiric approach. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(5), pp.400–10.
- Monteiro, M. et al., 2007. Cartography of gene expression in CD8 single cells: novel CCR7-subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression. *Blood*, 109(7), pp.2863–70.
- Nomura, L., Maino, V.C. & Maecker, H.T., 2008. Standardization and optimization of multiparameter intracellular cytokine staining. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(11), pp.984–91.
- Perfetto, S.P. et al., 2006. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 313(1-2), pp.199–208.
- Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K. & Roederer, M., 2004. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 4(8), pp.648–655.
- Peters, A., Lee, Y. & Kuchroo, V.K., 2011. The many faces of Th17 cells. *Current opinion in immunology*, 23(6), pp.702–706.
- Ragin, M.J., Sahu, N. & August, A., 2006. Differential regulation of cytokine production by CD1d-restricted NKT cells in response to superantigen staphylococcal enterotoxin B exposure. *Infection and Immunity*, 74(1), pp.282–8.

- Reinhardt, R.L. et al., 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*, 410(6824), pp.101–5.
- Roederer, M., 2002. Multiparameter FACS Analysis. In J. E. Coligan et al., eds. *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://www.currentprotocols.com/protocol/im0508> [Accessed December 5, 2011].
- Roederer, M., 2001. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, 45(3), pp.194–205.
- Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A., 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22, pp.745–63.
- Sangro, B. et al., 2004. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(8), pp.1389–97.
- Schütt, C. & Bröker, B., 2006. *Grundwissen Immunologie* 1st ed., Spektrum Akademischer Verlag.
- Seder, R.A., Darrah, P.A. & Roederer, M., 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature Reviews. Immunology*, 8(4), pp.247–58.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S., 2009. T cell activation. *Annual Review of Immunology*, 27, pp.591–619.
- Spidlen, J. et al., 2008. Gating-ML: XML-based gating descriptions in flow cytometry. *Cytometry Part A*, 9999(9999), p.NA.
- Tung, J.W. et al., 2004. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 110(3), pp.277–83.
- Waehler, R. et al., 2005. Low-dose adenoviral immunotherapy of rat hepatocellular carcinoma using single-chain interleukin-12. *Human Gene Therapy*, 16(3), pp.307–17.
- Wehler, T.C. et al., 2008. Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4(+) and CD8(+) T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *Journal of Immunological Methods*, 339(1), pp.23–37.
- Weinberg, A. et al., 2000. Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(4), pp.714–6.
- Wolfgang, D., Wolfgang, G. & Dittrich, W., 1971. Flow-Through Chamber for Photometers to Measure and Count Particles in a Dispersion Medium.
- Wood, J.C., 1998. Fundamental flow cytometer properties governing sensitivity and resolution. *Cytometry*, 33(2), pp.260–266.
- Zou, W., 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 6(4), pp.295–307.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag für die engagierte Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit. Hervorheben möchte ich meinen Dank für die gemeinsamen Diskussionen, sein stets offenes Ohr und die tiefe Begeisterung für die Immunologie. Vielen Dank für die Überlassung eines spannenden Themas und die geduldige und kritische Durchsicht meines Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Nolte danke ich für seine Hilfsbereitschaft, sein kritisches Hineindenken in meine Arbeit und stets konstruktive Anregungen.

Des Weiteren danke ich herzlich allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die positive Arbeitsatmosphäre und nötigenfalls schnelle Hilfe.

Insbesondere danke ich Gudrun Dubberke für die geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit und viele der angewandten Methoden, die vielen Hilfestellungen und die äußerst angenehme Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt meinem Mitbewohner und guten Freund Philipp Gild für das Redigieren des Manuskripts und zahlreiche Anregungen.

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: