

Imaging Flow Cytometry als Werkzeug zur Untersuchung FoxP3-positiver regulatorischer B-Zellen

Antonia Lina Kindsmüller

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Susanne Kossatz

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber
2. Priv.-Doz. Dr. Adam Chaker

Die Dissertation wurde am 20.03.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 20.12.2023 angenommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Regulatorische B-Zellen (Bregs) sind eine heterogene Gruppe von Zellen mit einem CD-19-positiven Phänotyp und verschiedenen anti-inflammatorischen Mechanismen. Bei der Entstehung von Toleranz gegenüber Allergenen bei gesunden oder erfolgreich mit einer Allergen-spezifischen Therapie (AIT) behandelten Individuen wird den Bregs eine zentrale Rolle zugesprochen. Zu den bereits erforschten anti-inflammatorischen Mechanismen in Bregs gehört die Produktion von Interleukin 10 (IL-10), eines anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins. Auch das Vorkommen vom regulatorischen T-Zellmarker (Treg) forkhead box P3 (FoxP3) in Bregs wird vermutet. Bisher konnte dies noch nicht durch bildliche Darstellung nachgewiesen werden. Die Imaging Flow Cytometry (IFC) ist eine Kombination zweier Methoden zur Identifikation von Zellen, der Durchflusszytometrie, welche Zellmerkmale quantitativ untersucht, sowie der Fluoreszenzmikroskopie, die morphologische Beurteilungen möglich macht. Die Relevanz der IFC für die Darstellung von seltenen Zelltypen und –merkmalen wird in dieser Arbeit diskutiert.

Methoden: In dieser Arbeit wurde die IFC genutzt, um aus derselben Blutprobe eines Probanden sowohl morphologische als auch quantitative Daten über unterschiedliche Subtypen von Bregs zu erheben. Vorbereitend wurde ein Protokoll zu Nutzung eines Imaging Flow Cytometers erstellt, da etablierte Färbungen und Färbeprotokolle für Durchflusszytometer nicht auf das IFC übertragen werden konnten. Anschließend erfolgte die Durchführung einer Studie mit neun Probanden, aus drei Gruppen: Gesunde, Probanden mit Allergischer Rhinitis und erfolgreich AIT-therapierte Probanden mit Allergischer Rhinitis. Aus peripherem Blut wurden Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isoliert und anschließend analog zur Durchflusszytometrie fluoreszenzmarkiert und gegatet. In der Bildergalerie des Zytometers wurden die positiv-gegateten Objekte optisch auf Plausibilität geprüft. Hierbei wurden Membranintegrität, Lokalisation der Färbung und Qualität des Fluoreszenzsignals zur Differenzierung zwischen echten Signalen und Artefakten herangezogen.

Ergebnisse: IL-10-positive Bregs und ihre untersuchten Subtypen stellten in allen Probandengruppen ca. 5% aller B-Zellen dar und konnten optisch validiert werden. Sie konnten in allen untersuchten Subgruppen an B-Zellen, ob Memory- oder Non-Memory, mit oder ohne exprimierten Aktivitätsmarker, nachgewiesen werden. Auffällig selten traten sie in allen Gruppen bei nicht-aktivierten Non-Memory-B-Zellen auf. FoxP3 konnte in allen Proben glaubhaft in ca. 0,1% aller Zellkerne von B-Zellen und 2% der IL-10⁺Bregs nachgewiesen und bildlich zur Darstellung gebracht werden. Auf Grund der geringen Größe der Stichprobe ließ sich kein signifikanter Unterschied der Breg-Subtypen zwischen den drei Probandengruppen nachweisen.

Schlussfolgerung: Die Imaging Flow Cytometry zeigte sich als valide Methode zur Darstellung und Untersuchung seltener Zelltypen, in diesem Fall Bregs. Diese Arbeit unterstützt durch den Nachweis der Existenz der unterschiedlichen Breg-Subtypen die in der PACIFIC-Studie aufgestellte Vermutung, dass FoxP3-exprimierende B-Zellen und FoxP3⁺IL-10⁺Bregs in der Aufdosierungsphase der spezifischen Immuntherapie eine Rolle spielen, während CD27⁺FoxP3⁺Memory B-Zellen in der späten Phase der AIT zum Toleranzerhalt bei erfolgreicher Therapie beitragen. FoxP3 wurde nur in einem kleinen Teil der IL-10⁺Bregs nachgewiesen, was nahe legt, dass die Steuerung der IL-10-Sekretion über einen anderen Mechanismus erfolgt bzw. FoxP3 einen anderen anti-inflammatorischen Prozess steuert. Insgesamt bestätigt das Vorkommen der untersuchten Bregs deren Rolle in der Homöostase des Immunsystems. Eine größer angelegte Stichprobe an Probanden, sollte zur Darstellung von Unterschieden zwischen Patientengruppen herangezogen werden. So ließe sich höchstwahrscheinlich ein konkreter therapeutischer oder diagnostischer Ansatzpunkt finden.

Summary

Background: Regulatory B cells (Bregs) are a heterogeneous group of cells with a CD19-positive phenotype and multiple anti-inflammatory mechanisms. In allergy, Bregs are supposed to induce allergen tolerance in healthy and successfully allergen-immuno-therapy (AIT) treated subjects. One of the known anti-inflammatory mechanisms is the excretion of Interleukin 10 (IL-10). Previously collected data suggest the presence of the regulatory T cell marker (Treg) forkhead box P3 (FoxP3) in Bregs. So far, the existence of this rare cell type has not been confirmed by imaging. Imaging Flow Cytometry (IFC) is a method for cell analysis that is a combination of Flow Cytometry and Fluorescent Microscopy. It is designed to simultaneously acquire both quantitative and morphological data from the same sample. This method is assumed to be especially helpful for detection of rare cell subsets.

Method: In this work, IFC was used to collect both morphological and quantitative data on different subtypes of Bregs. Previously established staining and staining protocols for Flow Cytometry could not be transferred to the use of IFC. That is why a new protocol has been elaborated in advance to further studies. Then, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of nine subjects (with allergic rhinitis to pollen with/without AIT, healthy controls) were analyzed with IFC to find and image different subtypes of Breg. Therefore cells were labeled with fluorescent-marked antibodies and gated as in Flow Cytometry. Additionally, every rare event was verified as plausible by optically checking the Image Gallery of the Imaging Flow Cytometer. Membrane integrity, localization and quality of fluorescent signals were used to differentiate between true signals and artefacts.

Results: IL-10+Bregs could be imaged with IFC in every PBMC sample and represented about 5% of all B cells. All analyzed subtypes, Memory or non-Memory and with or without the expression of the activity surface marker IgD, expressed IL-10. Even though the subtype of Non-memory low active B cells showed a remarkably smaller percentage of IL-10 expression. The evaluated data illustrate convincingly intranuclear FoxP3 in about 0.1% of all B cells and about 2% of all IL-10+Bregs. No statistically relevant difference in quantity of FoxP3+ B cells between patient subgroups could be detected within the small number of study subjects.

Conclusion: Concluding, the study showed that IFC can successfully be applied for rare event detection and imaging. The data confirm the existence of FoxP3 in B cells and IL-10+ Bregs, indicating its overarching role in homeostasis of the immune system. Besides, it supports the theory of the importance of these cells during dosing phase of AIT and the importance of CD27+FoxP3+Memory B cells in maintenance of tolerance during later phase of AIT as proclaimed in PACIFIC study. However, IL-10 might not be the only anti-inflammatory mechanism for FoxP3+ Bregs and IL-10 secretion might not be regulated only by FoxP3. Further studies with more subjects will demonstrate a possible quantitative difference between allergic and non-allergic, treated and non-treated subjects.

INHALT

1	Einleitung.....	6
1.1	Grundlagen.....	6
1.1.1	Kurze Übersicht über das menschlichen Immunsystem	6
1.1.2	Allergie.....	8
1.1.3	Allergenspezifische Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen .	10
1.1.4	Immunologische Zellanalytik.....	12
1.2	Regulatorische B-Lymphozyten (Bregs).....	13
1.2.1	B-Lymphozyten und ihre funktionelle Einteilung.....	13
1.2.2	Phänotypen und Vorkommen	15
1.2.3	Antiinflammatorische Wirkmechanismen.....	20
1.2.4	Stimulierende und inhibierende Signale	23
1.3	Image Stream Technik.....	25
1.3.1	Aufbau und Funktionsweise.....	25
1.3.2	Datenakquisition mittels INSPIRE™	27
1.3.3	Kompensation und Datenauswertung mittels IDEAS™	27
1.3.4	Übersicht über den Datenfluss.....	29
1.3.5	Vergleich von konventioneller Durchflusszytometrie mit Fluoreszenzzytometrie	30
2	Methodik.....	33
2.1	Protokolletablierung für die Nutzung des IFC	33
2.1.1	Probengewinnung und Zellselektion.....	33
2.1.2	Etablierung der Färbungen.....	34
2.1.3	FC-Rezeptorblock.....	36
2.1.4	Fixiermethoden	36
2.1.5	Erythrozytolyse.....	36
2.1.6	Stimulation	37
2.1.7	Trägerflüssigkeiten	37
2.1.8	Probeneinlesen.....	38
2.2	Studie zur Darstellung von Bregs in peripherenvenösem Blut mittels IFC.....	38
2.2.1	Studiendesign	39
2.2.2	Protokollanpassung für die Darstellung von Bregs	39
2.2.3	Gatingstrategien.....	41
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Protokolletablierung für die Nutzung des Imaging Flow Cytometer.....	48
3.2	Studie zur Darstellung von Bregs in peripherenvenösem Blut mittels IFC.....	51

4	Diskussion.....	64
4.1	Vor- und Nachteile von IFC.....	64
4.1.1	Technische Eigenschaften	64
4.1.2	Gerätebedienung.....	66
4.1.3	Anwendungsgebiete.....	67
4.2	FoxP3-positive Regulatorische B-Zellen in Allergie und AIT	68
4.2.1	Entstehungstheorien regulatorischer B-Zellen.....	68
4.2.2	Imaging Flow Cytometry Daten von Bregs im wissenschaftlichen Kontext	70
4.3	Ausblick.....	71
5	Literaturverzeichnis.....	73
6	Abbildungsverzeichnis.....	89
7	Tabellenverzeichnis	91
8	Abkürzungsverzeichnis	92
9	Danksagung	93
10	Anhang.....	94
10.1	Materialliste	94
10.2	Übersicht über bekannte regulatorische B-Zellen	95
10.3	Beispiel für Bildergalerie im INSPIRE®:.....	97
10.4	Image Stream Staining Anleitung für Bregs.....	97
10.5	Rohdaten der Breg Studie	99
10.6	Isotypkontrollen	100

1 EINLEITUNG

Das menschliche Immunsystem ist u.a. für die Bekämpfung von Krankheitserregern zuständig. Kommt es zu einer Dysregulation mit einer Entzündung bei Kontakt mit einem eigentlich apathogenen Antigen spricht man von Allergie (Biedermann, Heppt, Renz, & Röcken, 2016).

Eine Entzündungsreaktion wird durch pro-inflammatorische Zellen und humorale Faktoren aufrechterhalten und durch ihre anti-inflammatorischen Gegenspieler reguliert. B-Zellen sind vor allem als pro-inflammatorische Akteure mit Produktion von Antikörpern bekannt (J.-Y. Wang, 2020). Neuerer Bestandteil der Forschung ist die Subgruppe der regulatorischen B-Zellen (Bregs) (Atsushi Mizoguchi, Mizoguchi, Takedatsu, Blumberg, & Bhan, 2002). Beispielsweise wird den Interleukin-10-produzierenden Bregs eine Rolle bei erfolgreicher allergenspezifischen Immuntherapie von Allergikern zugesprochen (Ulrich M. Zissler et al., 2018).

Ein besseres Verständnis für anti-inflammatorische Prozesse kann möglicherweise zur Diagnostik, Behandlung oder Prävention von Allergie beitragen. Deshalb werden Subtypen von Bregs, sowie mögliche Transkriptionsfaktoren in dieser Arbeit untersucht. Bei den bereits beschriebenen Breg-Typen wurden zelluläre Untersuchungen v.a. mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (Tabelle 8). Hier sollen die Vorteile eines Imaging Flow Cytometers genutzt werden, um nicht nur statistische Daten zu erheben, sondern die seltene Zellpopulationen auch bildlich darzustellen.

1.1 GRUNDLAGEN

1.1.1 Kurze Übersicht über das menschlichen Immunsystem

Das menschliche Immunsystem wirkt durch das Zusammenspiel von Organen, Blutzellen, humoralen Faktoren und Botenstoffen (Zytokinen). Seine Aufgabe ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. Es wird in ein angeborenes (innates) und ein erlerntes (adaptives) Immunsystem eingeteilt. Das innate System ist hochkonserviert, reagiert schnell und eher unspezifisch auf Einflüsse von außen. Daran beteiligt sind weiße Blutzellen, wie neutrophile Granulozyten, natürliche Killer-Zellen, Monozyten sowie Makrophagen und kleinere Blutbestandteile, wie Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteine. Das adaptive System reagiert hochspezifisch und bildet ein Gedächtnis aus. Es braucht dafür mehrere Tage bis Wochen, um eine adäquate Antwort gegen die Strukturen von Pathogenen zu zeigen. Die erworbene Immunreaktion wird hauptsächlich durch Lymphozyten (B- und T-Zellen) ausgeführt. (Parkin & Cohen, 2001)

Strukturen, die vom Immunsystem erkannt werden heißen Antigene und können sowohl Proteine, Lipide, Zuckerketten oder Nukleinsäuren vom Äußeren oder Inneren von Zellen oder Erregern sein.

Das innate System erkennt über Rezeptoren übliche pathogene Strukturen auf bspw. Bakterien oder Hefen und kann über drei Mechanismen darauf reagieren: Opsonieren (Markieren), Endozytose und Antigenpräsentation, Zellaktivierung (Medzhitov & Janeway, 2000).

Zellen des adaptiven Immunsystems arbeiten eng zusammen für eine sehr spezifische Abwehr gegen ein bestimmtes Antigen. B-Zellen entstehen im Knochenmark und werden als reife, naive B-Zellen in die Peripherie ausgeschwemmt. Bindet der B-Zellrezeptor an ein neues Antigen, endozytiert und prozessiert die B-Zelle es und präsentiert es im Anschluss nach außen. T-Helferzellen ($CD4^+CD8^-$) erkennen das so präsentierte Antigen als fremd und regen die B-Zelle dazu an, zu Plasmazellen zu werden und Antikörper gegen dieses Antigen zu bilden. Gleichzeitig werden Gedächtniszellen (Memory-Zellen) gebildet. Wenn diese erneuten Kontakt zu dem gleichen Antigen, z.B. den gleichen Erreger, bekommen, können sie sich ohne Hilfe direkt in Plasmazellen umwandeln und Antikörper produzieren. (Biedermann et al., 2016)

T-Zellen werden in den peripheren lymphatischen Organen gebildet und unterlaufen positive und negative Selektionsschritte im Thymus. Sie können Antigene, die durch Majorhistocompatibility Complex (MHC) Moleküle von bestimmten Zellen nach außen präsentiert werden, erkennen. Sie entscheiden, ob Antigene körpereigen oder fremd sind. T-Helferzellen 1 (Th1-Zellen) erkennen fremdes Antigen und rekrutieren Fresszellen (Coffman & Carty, 1986; Del Prete, 1992). Th2-Zellen aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern (Del Prete et al., 1988). Zytotoxische T-Zellen ($CD4^-CD8^+$) führen zur Lyse des körperfremden Materials. Das innate und adaptive Immunsystem arbeiten bei der Markierung, Präsentation und Beseitigung von Erregern eng zusammen. (Parkin & Cohen, 2001)

Antikörper sind Proteine, die aus leichten (z.B. IgG 212 Aminosäuren) und schweren (z.B. IgG 450 Aminosäuren) Proteinketten bestehen, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Sie werden auch Immunglobuline (Ig) genannt. Sie besitzen konservierte und variable Anteile. Die hochvariablen Enden sind die Antigenbindungsstellen. Jeder B-Zellklon produziert genau eine Sorte Antikörper mit dem gleichen Epitop. Antikörper besitzen eine Scharnierregion. Die antigenbindenden Arme werden Fab-Fragmente, der konservierte Teil Fc-Fragment genannt.

Es gibt mehrere Antikörperklassen, die sich durch ihren Aufbau, ihren Wirkorten, der Phase der Immunreaktion an der sie beteiligt sind sowie ihre schweren Ketten unterscheiden: IgG sind Monomere im Blut, die u.a. in späten Phasen einer Krankheitsbekämpfung an der Neutralisation von Bakterien, Toxinen und Viren beteiligt sind. Sie opsonieren und können das Komplementsystem aktivieren. Sie sind noch Jahre nach Infektion oder Impfung im Blut nachweisbar. Eine für Allergie relevante Subklasse ist IgG4. Die Moleküle wirken als blockierende Antikörper und hemmen u.a. die Mastzelldegranulation (Davies & Sutton, 2015).

IgA liegen in Schleimhäuten und Körpersekreten als v.a. als Dimere vor und sorgen dort u.a. für eine mukosale Immunreaktion. Der hauptsächlich vorliegende Subtyp ist IgA1 (TOMASI, TAN, SOLOMON, & PRENDERGAST, 1965). Ein selektiver IgA-Mangel wird u.a. mit einem vermehrten Auftreten von Allergie und Autoimmunerkrankung v.a. des Gastrointestinal- und Respirationstrakts verbunden (Cinicola et al., 2022). Im Blut liegen sie v.a. als Monomere vor. Hier dominiert die Subklasse IgA1 (Steffen et al., 2020). Eine geringe Serumkonzentration IgA wird als Risikofaktor für einen schweren Verlauf von Allergie diskutiert (W.-J. Kim, Choi, Kim, Lee, & Kang, 2017).

IgM sind Pentamere, die in der Frühphase der spezifischen Immunreaktion nach Erstexposition gegen ein Antigen von B-Zellen sezerniert werden und im Blut zu finden sind. IgD und IgE sind Monomere, die häufig direkt an Zellen gebunden als Rezeptoren fungieren. IgD tritt dabei vor Allem in reiferen B-Zell-Stufen auf, während IgE auf Mastzellen gebunden bei der Parasitenabwehr benötigt wird. B-Zellen können unter bestimmten Bedingungen ihre Antikörperklasse wechseln. (Rassow, 2008; Y. Wang, Liu, Burrows, & Wang, 2020)

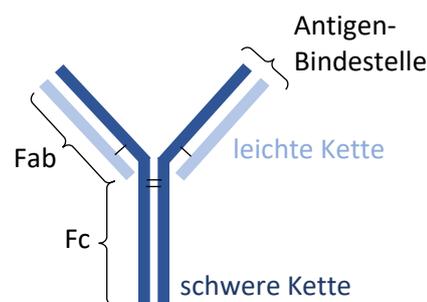


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörper

Die Kommunikation zwischen Zellen erfolgt unter anderem über direkte Zell-Zell-Kontakte und Zytokine. Adhäsionsmoleküle sind an der Zelloberfläche gebundene Moleküle, die über direkten Zell-Zell-Kontakt Signale übertragen können (APLIN, HOWE, & JULIANO, 1999). Zytokine sind Moleküle, die von Zellen sezerniert werden, um andere Zellen anzulocken, ihr Bildung oder Funktionalität zu beeinflussen (Oppenheim, 2018). Zu ihnen gehören u.a. Interleukine (IL), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Interferone (IFN).

1.1.2 Allergie

Allergische Reaktionen entstehen durch überschießende Immunantworten auf ein apathogenes Antigen (Allergen). Sie werden deshalb auch Überempfindlichkeits- oder Hypersensitivitätsreaktionen genannt. Nach Coombs und Gell werden die Reaktionen auf zellulärer Ebene in vier Typen eingeteilt: Typ I oder Soforttyp, Typ II oder zytotoxischer Typ, Typ III oder Immunkomplextyp, Typ IV oder verzögerter Typ (Biedermann et al., 2016).

Allergische Rhinitis, allergisches Asthma oder Urtikaria sowie die lebensbedrohliche systemische Allergiereaktion (Anaphylaxie) werden der Typ I Reaktion zugeordnet. Dabei kommt es zunächst zu einer Sensibilisierung. B-Zellen mit Antigenkontakt werden durch eine überschießende Th2 Aktivierung dazu angeregt, Immunglobulin E gegen dieses apathogene Antigen zu bilden. Monomeres IgE bindet anschließend über einen hochaffinen spezifischen Fc-Rezeptor (FcεRI) an Mastzellen und dient dort als Rezeptor. Die Bindung löst u.a. die vermehrte Expression von FcεRI sowie die gesteigerte Zytokinproduktion aus. Bei Kontakt der mastzellgebundenen IgE mit einem Allergen, kommt es zunächst zur Aggregation und Kreuzvernetzung von FcεRI (Blank, Huang, & Kawakami, 2021), was wiederum intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt und schließlich zur Degranulation der Mastzelle mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt. (Biedermann et al., 2016)

Der wichtigste Mediator ist Histamin. Es führt zu Juckreiz, Schleimbildung, Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Ödemen. Zusätzlich werden auch Leukotriene, TNF, Serotonin und Badykinin frei, die synergistisch zu Histamin wirken. Die Mediatoren führen im Verlauf zur anhaltenden Entzündung durch das Rekrutieren von eosinophilen Granulozyten. Dies wird auch Spätphase der allergischen Reaktion genannt und führt im Verlauf zur Chronifizierung der Entzündung mit Geweberemodellierung und Fibrose (Fattouh & Jordana, 2008; Samitas, Carter, Kariyawasam, & Xanthou, 2018). Die Neigung dazu, Allergien vom Soforttyp zu entwickeln, hängt u.a. von der Homöostase der T-Helferzellen ab. Hat ein Organismus vermehrt Kontakt zu bakteriellen Antigenen, werden bevorzugt Th1 gebildet.

Diese fördern u.a. durch INF-γ Freisetzung die Bildung von IgA und IgG. Bei vermehrtem Kontakt zu Parasiten, oder Hausstaubantigenen wird die Th2-Bildung begünstigt. Diese regen B-Zellen durch Sekretion von Interleukin 4, 5 und 13 zur IgE-Produktion an. Zudem locken diese Interleukine Mastzellen und andere Entzündungszellen an. Es wird vermutet, dass die verbesserte Hygiene zu weniger Kontakt mit bakteriellen Antigenen führt. Damit wird das T-Zellgleichgewicht hinzu einem Th2-Zell-Überschuss verschoben und das Entstehen von Allergien begünstigt. (Benndorf, 2005; Rassow, 2008)

Die Diagnose einer Soforttypallergie kann gestellt werden, wenn allergietypische Symptome bestehen und eine Sensibilisierung gegen das Allergen nachgewiesen werden kann. Zur Diagnostik werden üblicherweise Provokationstestungen, Haut-Pricktests sowie die Messung von antigenspezifischem- und gesamt-IgE durchgeführt. (Biedermann et al., 2016)

Die Therapie von Allergien lässt sich in lokal vs. systemisch sowie symptomatisch vs. kurativ unterscheiden. Zur Therapie der Typ I Reaktion mehr im folgenden Kapitel.

Die Allergische Rhinitis (AR) gehört zu den IgE vermittelten Allergien. In den USA und Europa sind geschätzt 20-30% der Erwachsenen und ca. 40% der Kinder betroffen (Meltzer, 2016). Typische Symptome, wie Schnupfen, Niesen, Juckreiz und Symptome einer Konjunktivitis werden begleitet von

reduziertem Schlaf mit Folgen, wie Tagesmüdigkeit und Leistungseinschränkungen in Schule oder Beruf (Hoyte & Nelson, 2018; Stuck et al., 2004). Allergene sind hier aerogen. AR lässt sich durch die Art des Allergens in saisonal sowie ganzjährig symptomatisch einteilen, wobei Studien zeigen, dass häufig eine Mischform besteht (Ciprandi et al., 2005). (Brožek et al., 2017)

Die ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma)-Leitlinie von 2019 (Klimek et al., 2019) teilt die allergische Rhinitis zudem nach Schwere der o.g. Symptomatik, ihrem Auftreten (intermittierend oder persistierend) sowie der Häufigkeit der Symptome (häufiger oder seltener als vier Mal pro Woche bzw. vier Wochen pro Episode) in eine milde und eine moderat bis schwere Verlaufsform ein.

1.1.3 Allergenspezifische Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen

Die Behandlung von Allergien des Soforttyps kann entweder durch symptomorientierte Pharmakotherapie oder kurativ über allergenspezifische Immuntherapie (AIT) erfolgen. Zu ersterem gehören entzündungshemmende Medikamente, wie Antihistaminika, Antileukotriene, Cortikosteroide oder monoklonale Antikörper gegen Entzündungsmediatoren.

Sie können zu einer Linderung der Symptomatik führen und lokal oder systemisch appliziert werden. Die AIT ist eine Methode, bei der durch therapeutische Administration mit dem Allergen eine langfristige Toleranz ihm gegenüber induziert werden soll. Die Hyposensibilisierung erfolgt über langsame Erhöhung der zugeführten Allergendosis. Bisher wurde diese Methode erfolgreich bei allergischer Rhinitis, allergischem Asthma, Allergien gegen Insektengift und einigen Nahrungsmittelallergien angewandt.

Es existieren mehrere Applikationsformen. Die subkutane (SCIT) und sublinguale (SLIT) Verabreichung von Allergendosen werden bereits routinemäßig bei AR, Asthma und Insektengiftallergien in der Klinik eingesetzt (Larenas-Linnemann et al., 2018).

Hierbei werden Allergenlösungen mit steigender Allergenmenge über eine Spritze unter die Haut gesetzt oder in einer Tablette eingearbeitet unter die Zunge gelegt. Beide Methoden sind nachgewiesenermaßen sowohl sicher, als auch effektiv (Y. Huang, Wang, Wang, Zhang, & Lou, 2019; Liu, Ng, & Wang, 2018; Passalacqua, Bagnasco, & Canonica, 2020). Zudem zeigte sich eine Kosteneffizienz gegenüber einer rein symptomatischen Therapie (Reinhold & Brüggjenjürgen, 2017). SCIT behandelte Patienten zeigten eine Verbesserung der Lebensqualität und eine langfristig reduzierte allergenspezifische Hypereagibilität der Atemwege (Dhimi et al., 2017). Nachteile der SCIT sind die lange Therapiedauer von drei Jahren mit wiederholten Injektionen. Dies kann durch eine SLIT vermieden werden. Die Applikation ist vereinfacht und kann zu Hause durchgeführt und z.B. von Kindern besser toleriert werden (Okubo & Izuhara, 2018). Nachteil ist die vermutlich etwas abgeschwächte Wirkung hinsichtlich der Symptomkontrolle gegenüber der SCIT (Reinhold & Brüggjenjürgen, 2017) bei Hinweisen für eine gleichwertige oder stärker messbare Wirkung auf

zellulärer Ebene (Bohle, 2014). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der orale, epikutanen und intralymphatische AIT. (Kucuksezer et al., 2020)

Die Toleranzinduktion durch AIT erfolgt auf zellulärer Ebene über die Modifikation der spezifischen B- und T-Zellantwort, die Reduktion der IgE-Produktion und der Mastzell- und Granulozytenaktivierung sowie der Migration der Entzündungszellen (Alvaro-Lozano et al., 2020). Eine zentrale Rolle spielen dabei regulatorische Zellen. Diese agieren über antiinflammatorische Botenstoffe, wie Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 35 (IL-35) und Transforming Growth Factor β (TGF- β) sowie membrangebundene Proteine (Durham & Shamji, 2023).

Regulatorische T-Zellen, die FoxP3 exprimieren (FoxP3⁺Treg), haben die höchste regulatorische Potenz und unterdrücken über IL-10-Sekretion die IgE-Produktion in B-Zellen (Lin, Freeman, & Nutman, 2018). Gleichzeitig fördern sie die Produktion von allergenspezifischen IgG4, welche dann mit IgE um die Bindungsstellen auf Mastzellen konkurrieren (Francis et al., 2008). An Mastzellen gebundenes IgG4 reagiert weniger sensibel und führt erst bei stärkerer Allergenkonzentration zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren.

Des Weiteren führt es zu einer direkten Basophilen- (Shamji et al., 2015) und Mastzellinhibition über das Querverlinken von Fc ϵ RI und Fc γ RIIb Rezeptoren (Zha et al., 2018). Weiterhin wurde die Blockierung der IgE-Funktion durch IgG4-Bindung beschrieben (Wachholz & Durham, 2004). Regulatorische B-Zellen agieren ebenfalls über die Produktion von toleranzfördernden Zytokinen, aber auch über die Verstärkung der Treg Antwort und die IgG4 Hochregulation. Es wird also vermutet, dass die hohe Exposition gegenüber Allergen während der AIT zur vermehrten Produktion von regulatorischen Zellen führt, wobei die FoxP3⁺Treg-Antwort abhängig vom Allergietyp ist (Stelmaszczyk-Emmel, Zawadzka-Krajewska, Głodkowska-Mrówka, & Demkow, 2015). Als Marker für das erfolgreiche Anschlagen einer AIT wurden bisher die Zunahme an Tregs und Bregs, die Ratio aus allergenspezifischem zu gesamt IgE und die IL-10-Zunahme vorgeschlagen (Aalberse, Platts-Mills, & Rispens, 2016; Akdis & Akdis, 2015; Fujimura et al., 2011; Jutel et al., 2016; Korczak-Kowalska et al., 2017; van de Veen & Akdis, 2016; U. M. Zissler, Esser-von Bieren, Jakwerth, Chaker, & Schmidt-Weber, 2016).

Im Rahmen der PACIFIC-Studie (EudraCT 2015-003545-25), einer Kohortenstudie, die die Immunantwort von Patienten über drei Jahre während der SCIT analysierte, wurden drei Phasen der AIT vorgeschlagen: up-dosing phase, conversion phase und tolerance-mounting. Dabei zeichnete sich die Aufdosierungsphase zunächst u.a. durch die Immunreaktion des Körpers auf das Allergen mit Zunahme der Th2-Antwort aus. Gleichzeitig zeigte sich ein Anstieg der IL-10-positiven regulatorische B-Zellen. Langfristig nahm über die drei Jahre die Th2 Antwort ab, während sich die Th1-Antwort auf einem höheren Niveau als vor der Therapie einpendelte. Zudem wurde postuliert, dass im Rahmen des

tolerance-mounting in der späten Phase der AIT das immunologische Gedächtnis ausgebildet wurde indem es zu einer Zunahme der Memory-B-Zellen (CD19⁺CD27⁺) kam. (Ulrich M. Zissler et al., 2018)

1.1.4 Immunologische Zellanalytik

Zellen und ihre Funktionen lassen sich auf unterschiedliche Art untersuchen. Um Zelltypen zu unterscheiden, können morphologische Aspekte, wie Größe, Form oder Granularität herangezogen werden. Dafür eignen sich verschiedene Mikroskopieformen. Andererseits führt die Untersuchung spezifischer Oberflächen-, oder interzelluläre Strukturen sowie genetischem Material zur weiteren Klassifikation von Zellen. Hierfür können u.a. immunologische Mechanismen genutzt werden.

In diesem Unterkapitel wird das Prinzip von Immunfärbungen erläutert. Sie werden genutzt, um Zellen anhand ihrer oberflächlichen und intrazellulären Strukturen voneinander zu unterscheiden. Außerdem hilft sie dabei Merkmale intra-/extrazellulär sowie intra-/extranuklear zu lokalisieren. Sie ist somit für quantitative und qualitative Untersuchung der Zellen von Bedeutung.

Der Immunfluoreszenzfarbstoff besteht, vereinfacht, aus einem Antikörper und einen Fluoreszenzfarbstoff, genannt Fluorochrom. Dabei wird der F_{a,b}-Teil des Antikörpers so gewählt, dass er möglichst spezifisch an die Struktur bindet, die angefärbt werden soll. Am F_c-Teil wird der Farbstoff chemisch gekoppelt (Abbildung 2).

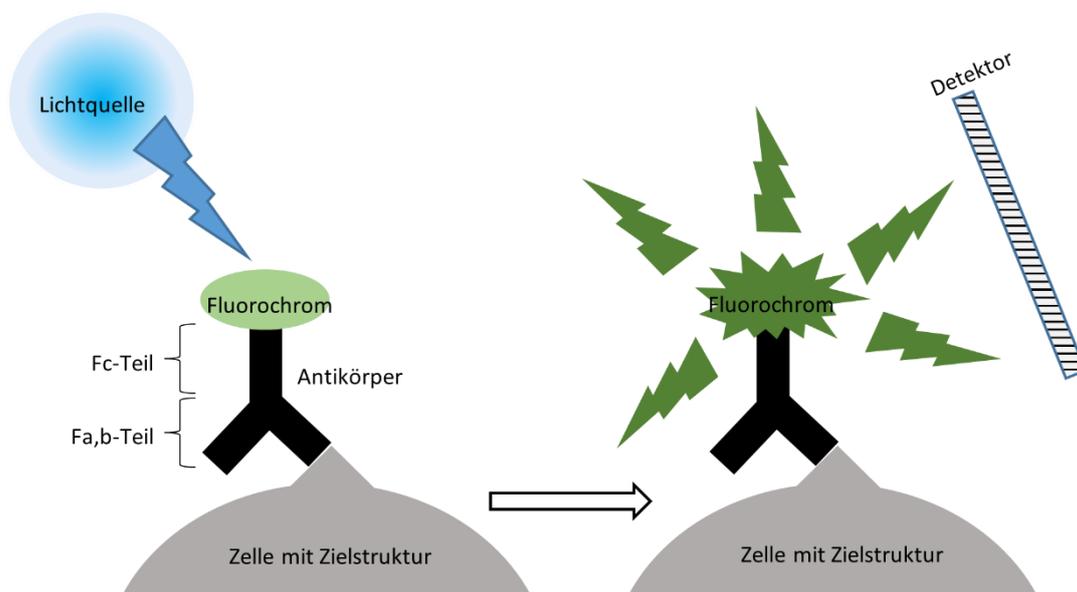


Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbung: Erregung eines antikörpergebundenen Fluorochroms durch Licht einer bestimmten Wellenlänge mit anschließender Emission von Licht einer bekannten Wellenlänge

Fluorochrome sind kleine Moleküle, größere Proteine oder Konjugate, die durch Licht eines bestimmten, bekannten Wellenlängenbereichs angeregt werden (sog. Exzitation). Danach strahlen sie

ihrerseits Licht einer spezifischen, bekannten Wellenlänge ab. So kann durch die Emission eines Farbstoffes auf das Vorhandensein und die Lokalisation einer Zielstruktur zurückgeschlossen werden. Dieses Verfahren machen sich z.B. Fluoreszenzmikroskope, Durchflusszytometer und Imaging Flow Cytometer zu Nutze. Es können auch mehrere Strukturen einer Zelle oder einer Probe mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt und gleichzeitig analysiert werden. Für intrazelluläre Färbungen wird die Zellwand zunächst chemisch permeabel gemacht, um Farbstoffe hineinzulassen, und anschließend wieder verschlossen. (Leif & Shapiro, 1986; Papandreou, 2013)

1.2 REGULATORISCHE B-LYMPHOZYTEN (BREGS)

1.2.1 B-Lymphozyten und ihre funktionelle Einteilung

B-Lymphozyten (B-Zellen, BZ) gehören zu den Immunzellen des menschlichen Organismus. Sie sind üblicherweise an der Abwehr von Erkrankungen und Erregern beteiligt, können bei Fehlfunktion oder Dysbalance im Immunsystem ebenso Krankheiten auslösen (Mauri & Bosma, 2012).

B-Zellen werden in der fetalen Leber sowie dem Knochenmark gebildet und reifen in mehreren Schritten von pre-pro B-Zellen zu reifen B-Zellen unterschiedlicher Subtypen heran. Ein Oberflächenmarker jeder Reifestufe dieser Zellreihe ist B220 (CD45R) und ab der zweiten Reifestufe CD19. (Y. Wang et al., 2020). B-Zellen können nach Aktivierung terminal zu Plasmazellen (CD138-positive Zellen) differenzieren und antigenspezifische, hochaffine Antikörper zum Markieren und Neutralisieren von Pathogenen produzieren (Ise & Kurosaki, 2020). Gleichzeitig können sog. Memory-B-Zellen (CD27-positive Zellen, CD27⁺) entstehen, die als immunologisches Gedächtnis fungieren und bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen zu einer schnellen, spezifischen Immunantwort führen (Moriyama, Adachi, Tonouchi, & Takahashi, 2020).

Funktionell lassen sich B-Lymphozyten in Effektor-B-Zellen (Beff) und regulatorische B-Zellen (Bregs) unterteilen (Matsushita, 2019). Weniger als zehn Prozent der B-Zellen besitzen eine regulatorische Funktion (Maravillas-Montero & Acevedo-Ochoa, 2017). Bregs stellen weniger als ein Prozent der peripheren Blutzellen dar (Iwata et al., 2011). Beffs nehmen eine proinflammatorische Rolle im Immunsystem ein. Sie wirken über Antikörperproduktion, Antigenpräsentation und Ausschüttung entzündungsfördernder Botenstoffe, wie die Interleukine (IL) 2, 4, 6, 12 und 17, Interferon γ (INF γ), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Harris et al., 2000; Li et al., 2015; Matsushita, 2019; Shen & Fillatreau, 2015).

Bregs sind im Gegensatz dazu antiinflammatorische Akteure, die über Sekretion von entzündungshemmenden Stoffen, wie IL-10, und direkten Zell-Zell-Kontakten zur Herabregulierung der Immunantwort führen (Kapitel 1.2). Regulatorische Zellen werden im Organismus gebraucht, um ein

Überschießen von entzündlichen Prozessen verhindern (Nathan & Ding, 2010) und Toleranz gegenüber potentiellen Antigenen und körpereigenen Antigenen zu induzieren (Sarvaria et al., 2016).

Im Mausmodell löste ein Fehlen von Bregs eine generalisierte chronische Inflammation aus (Fillatreau, Sweenie, McGeachy, Gray, & Anderton, 2002). Bei Krebserkrankungen kann hingegen eine überwiegende regulatorische Komponente zu Krankheitsprogression führen, da der Tumor vor dem Effektor-Immunsystem geschützt bleibt (Zhou et al., 2014). Für einen gesunden Organismus ist also eine Balance zwischen Pro- und Antiinflammation, also auch eine Balance zwischen antigenspezifischen Beff und Bregs, entscheidend (Berthelot et al., 2013).

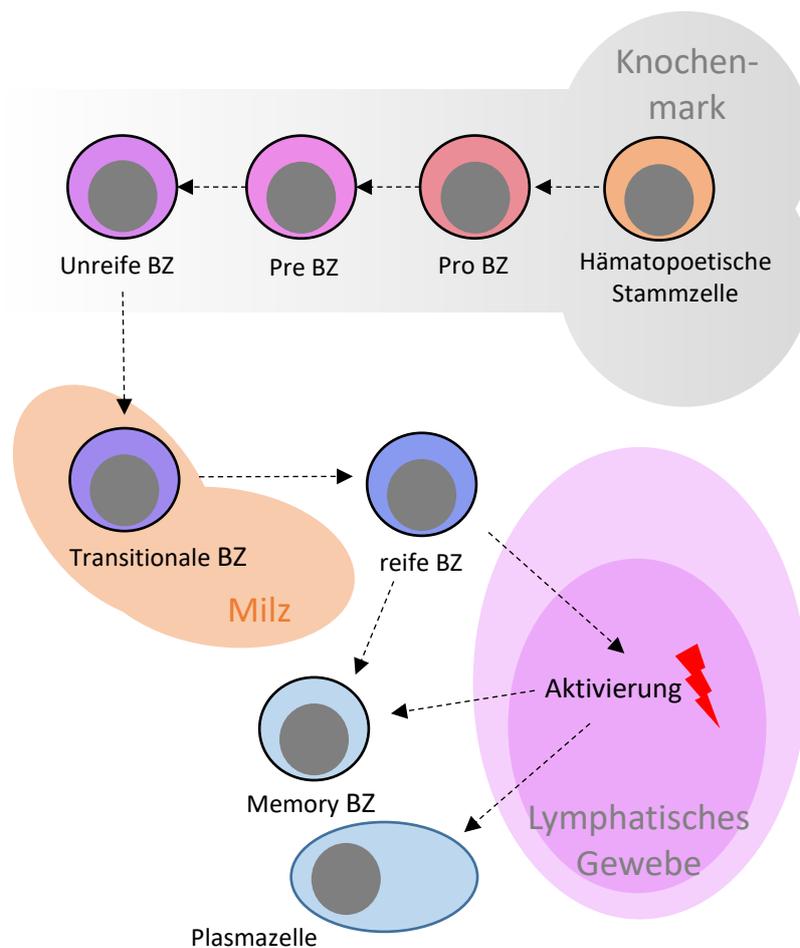


Abbildung 3: Reifung einer B-Zelle: B-Zellen (BZ) entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und reifen über mehrere Stufen zu unreifen B-Zellen heran, in der Milz entstehen unterschiedliche reife BZ-Formen, die in lymphatischen Gewebe durch Aktivierung zu Plasmazellen oder Memory-Zellen reifen. Modifiziert nach (Blomberg, Smith, & Lindvall, 2007; Coffre & Koralov, 2017) und <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/b-cells>, zuletzt geöffnet am 01.07.2022

Bei therapeutischem Eingriff in die B-Zell-Reihe ist dabei also auch zu bedenken, dass beide existieren. Im Mausmodell von Multipler Sklerose (MS) und Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) war die Verhinderung der Krankheitsprogression stark vom Timing der B-Zell-Unterdrückung abhängig (Haas et al., 2010; Matsushita, Yanaba, Bouaziz, Fujimoto, & Tedder, 2008). In früher Phase führte ein B-Zell-

Mangel zur Exazerbation der Erkrankungen, während in späten Krankheitsphasen ein B-Zellmangel zum Abschwächen der Krankheitsausprägung oder gar keinem Effekt führte.

1.2.2 Phänotypen und Vorkommen

1.2.2.1 Subtypen in der Literatur

Bregs können Zellmerkmale nahezu jeder bekannten B-Zellentwicklungsstufe annehmen. Sie stellen damit phänotypisch eine sehr heterogene Gruppe von Zellen dar (vgl. Kapitel 4.2.1). Beschrieben wurden u.a. B-Zellen mit regulatorischer Komponente mit Merkmalen von Gedächtniszellen (Memory-Zellen, CD27⁺ Zellen), Plasmazellen (CD138⁺ Zellen), Plasmablasten (CD27^{int}CD38⁺ oder CD27^{high}CD38^{high}), naiven B-Zellen, unreifen Vorstufen (immature cells, CD24^{high}CD38^{high}), Marginalzonen-Zellen (MZ), Marginalzonen Vorläuferzellen (MZP), B1 und B2-Zellen (Masson et al., 2015).

Ebenso heterogen sind die Namensgebungen und Charakterisierungen der beschriebenen Unterformen (Korcak-Kowalska et al., 2017). Die Nomenklatur erfolgt nur teilweise nach ihren Wirkmechanismen. Bspw. wurden einige IL-10-sezernierende Unterformen B10-Zellen genannt und IL-17 produzierende Zellen Br17. Eine andere Variante nummeriert Bregs durch. In diesem System waren beispielsweise Br1 Zellen IL-10 sezernierend und Br3 TGFβ sezernierend (Vadasz & Toubi, 2017). Bregs, die über verschiedene Mechanismen die Apoptose anderer Zellen auslösen können wurden teilweise „Killer Bregs“ genannt. Andere Namensgebungen wurden hinsichtlich ihres Vorkommens in Organen oder Krankheitsbilder getroffen, wie z.B. in Tumoren die tBregs. Wieder andere Subtypen wurden bisher noch gar nicht benannt.

Insgesamt wurden regulatorische B-Lymphozyten in Mäusen und Menschen untersucht. Dabei konnten sie aus unterschiedlichen Materialien gewonnen werden: Blut, Lymphknoten, Milz, Synovialflüssigkeit, Bronchialsekret, Tumoren, Metastasen, Prostata, Liquor etc.

Eine Auflistung bereits beschriebener Bregs, ihrer Wirkmechanismen, Namen, Zelltyp, Krankheitsbilder in deren Rahmen sie untersucht wurden und der dazugehörigen Quellen befindet sich im Anhang in Tabelle 8. Sie stellt eine Zusammenfassung und Ergänzung von Tabellen aus (Baba, Saito, & Kotetsu, 2020; Maravillas-Montero & Acevedo-Ochoa, 2017; Mauri & Blair, 2014; Ray & Dittel, 2017; Rosser & Mauri, 2015) dar.

1.2.2.2 Festlegung der Benennung

Im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Namen für die betrachteten Zellen verwendet:

Zellbenennung	Marker	Erklärung	Referenz
Breg (regulatorische B-Zelle)	CD19 ⁺ + Reg. Marker z.B. IL10 ⁺	Kombination aus dem B-Zelloberflächenantigen CD19 und einer anti-inflammatorischen (regulatorischen) Komponente, z.B. IL-10	(Matsushita, 2019).
Beff (Effektor-B-Zelle)	CD19 ⁺ - Reg. Marker	alle nicht-regulatorischen B-Zellen	
Memory B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺	Kombination von CD19 und CD27 auf der Oberfläche	(Korczak-Kowalska et al., 2017; Moriyama et al., 2020).
„Non-Memory“-Zellen	CD27 ⁻	CD27-negative Zellen, beinhalten u.a. naive B-Zellen und Plasmazellen	(Masson et al., 2015).
Aktivierte Breg	CD19 ⁺ IgD ⁺ + reg. Marker	Breg mit dem Oberflächenantigen IgD (Immunglobulin D), IgD markiert reife Zellstufen der B-Zellen und dient als Aktivitätsmarker der Bregs	(Mauri & Bosma, 2012; Y. Wang et al., 2020)

Tabelle 1: Benennung der Zellen in dieser Arbeit

1.2.2.3 Die Rolle von Bregs bei verschiedenen Erkrankungen

Bregs sind Spieler des Immunsystems. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass bei jedem immunologischen Prozess im Körper auch Bregs eine Rolle spielen. Sie wurden bereits in einigen Erkrankungen, bei denen Störungen im Immunsystem bekannt sind, untersucht. Einige Beispiele sollen im Folgenden vorgestellt werden, um ihre Relevanz in immunologischen Prozessen zu verdeutlichen.

Das klassische Beispiel für die Entstehung von Krankheit durch Dysbalance des Immunsystems sind die Autoimmunerkrankungen sowie Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Hierbei werden körpereigene Zellen und Strukturen vom eigenen Immunsystem als fremd eingestuft und angegriffen. Es entsteht eine Entzündung. In Erkrankungen, wie Multipler Sklerose, autoimmuner Enzephalomyelitis, systemischem Lupus Erythematodes (SLE) oder der rheumatoiden Arthritis wurden im Vergleich zu Gesunden geringere Zellmengen an Bregs Subtypen in bestimmten Geweben registriert (Lazibat, Rubinić Majdak, & Županić, 2018; Mohd Jaya, Garcia, Borràs, Chan, & Franquesa, 2019).

So mangelte es z.B. im SLE-Mausmodell den an SLE erkrankten Mäusen an einem Interleukin-10-produzierendem Breg Subtyp, den die gesunden Mäuse besaßen (Watanabe et al., 2010). Im Mausmodell des Autoimmunen Diabetes (Typ I), konnte die Infusion von aktivierten, regulatorischen FasL-Bregs in einem großen Teil der prädiabetischen Mäuse den Fortschritt der Krankheit aufhalten (Tian et al., 2001).

Das Fehlen von Bregs kann, nach dem gleichen Prinzip auch zu der Entstehung oder Erhalt von Allergien beitragen (siehe Kapitel 1.2.2.4).

In Mausmodellen von Schlaganfällen, konnte die Erhöhung der IL-10-positiven (IL-10⁺) Bregs im Gehirn zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion und zu einem besseren Überleben nach Schlaganfall führen (Bodhankar, Chen, Vandenbark, Murphy, & Offner, 2014).

Schon vor der Geburt spielt das Immunsystem eine entscheidende Rolle, damit das Kind im Körper der Mutter keine überschießende Immunreaktion gegen maternale Antigene aufbaut (Esteve-Solé et al., 2018). So wurden zum Beispiel sehr hohe Mengen an regulatorischen B-Zellen im Nabelschnurblut entdeckt (Sarvaria et al., 2016).

In der Transplantationsmedizin spielt diese Induktion von Toleranz durch Bregs ebenfalls eine entscheidende Rolle. Es wird vermutet, dass durch eine Induktion, oder Zuführung von regulatorischen B-Zellen die Graft-versus-Host Reaktion abgewendet und somit die Abstoßung transplantiert Organe verhindert werden kann. Zudem könnten nebenwirkungsreiche immunsupprimierende Medikamente dadurch eingespart werden. (Chesneau, Michel, Degauque, & Brouard, 2013; van der Net, Bushell, Wood, & Harden, 2016).

Die Herabregelung der Immunantwort auf Fremdes durch Bregs kann jedoch auch zur Krankheitsprogression führen. Krebszellen können körpereigene Bregs induzieren und stimulieren und sich dadurch vor dem Immunsystem verstecken (*Immune Escape*). Dieser Mechanismus wurde beispielsweise in radiologisch oder bioptisch gesichertem Lungenkrebs (Zhou et al., 2014) und Adenokarzinomen des Magens (W. W. Wang et al., 2015) untersucht. Man spricht von Cancer Immune Escape.

Bregs wurden auch in unterschiedlichen Infektionskrankheiten, wie der Infektion mit Listerien (Horikawa et al., 2013), Chlamydien (Moore-Connors et al., 2015) oder Salmonellen (Lino et al., 2018) untersucht. Hier verhinderte ein bestimmter Teil der Bregs oder regulatorischen Plasmazellen in der frühen Phase der Infektion eine schnelle Erregerabwehr und reduzierte die Immunantwort auf Impfversuche gegen diese Erreger. (Gutiérrez et al., 2019) untersuchten die Rolle von Bregs bei HIV Infektion und kamen zu dem Schluss, dass die Interaktion und Funktion von Bregs und Treg während der Infektion gestört sein muss.

Unabhängig davon, ob Bregs einen positiven oder negativen Effekt auf die Gesundheit eines Individuums ausübt, bieten sie in jedem Fall die Möglichkeit sie als diagnostischen Marker oder

therapeutischen Angriffspunkt zu nutzen. Es wurden bereits Projekte gestartet, die die in-vitro Herstellung von Bregs-Zellen vorantreiben sollen (Gallego-Valle, Pérez-Fernández, Correa-Rocha, & Pion, 2018).

1.2.2.4 Die Rolle von Bregs bei Allergie und spezifischer Allergenimmuntherapie (AIT)

Regulatorische B-Zellen wurden von Patienten mit unterschiedlichen allergischen Erkrankungen untersucht: Nahrungsmittelallergien (Noh & Noh, 2012), allergisches Asthma und allergische Rhinitis (Braza et al., 2015; Brosseau et al., 2018; Taitano et al., 2018), Kontakthypersensibilität oder Kontaktallergie (Fehres et al., 2019; H. S. Kim et al., 2019). Ähnlich, wie bei autoimmunen Prozessen, wurde auch hier beschrieben, dass bestimmte Breg-Subtypen bei Patienten mit schwerer Erkrankung deutlich reduziert vorlagen, weniger kompetent in ihren immunmodulatorischen Mechanismen waren oder diese herabgeregelt waren (Z. Wang & Tan, 2020). Ebenso lag bei Allergikern eine andere Verteilung von Breg- und Beff-Subtypen in den Kompartimenten des Körpers vor (Luo et al., 2018; Oliveria et al., 2018; Wiest et al., 2019). Die genaue Bedeutung der Verteilung der Breg bleibt noch zu klären.

Im Mausmodell konnten Mäuse mit allergischer Atemwegserkrankung durch Infektion mit Helminthen eine Entzündungslinderung erfahren. Hierbei wurden durch die Parasiteninfektion Bregs induziert, die dann die Allergie durch Toleranzentwicklung milderten (Amu et al., 2010; Gao et al., 2019). Einen Anstieg von Breg-Subtypen, v.a. IL-10⁺, konnte auch nach erfolgreicher Immuntherapie von Patienten mit allergischer Rhinitis beobachtet werden (Layhadi, Eguiluz-Gracia, & Shamji, 2019; Ulrich M. Zissler et al., 2018). IL-35 und IL-10 positive Bregs wurden deshalb beide bereits als Marker zur Effektivitätsmessung oder dem Ansprechen eines Patienten auf AIT vorgeschlagen. Es wurde beschrieben, dass die für die Toleranzinduktion notwendige IgG4 Produktion vom Vorhandensein IL-10-positiven Bregs abhängig sei (van de Veen et al., 2013; van de Veen, 2017).

Bisher unveröffentlichte Daten der PACIFIC-Studie deuten darauf hin, dass während der Aufdosierung der subkutanen AIT parallel und gleichsinnig zu den Th2-Zellen auch der Anteil FoxP3-positiver Zellen an B-Zellen im Blut zunimmt. Sie scheinen zum Ende der Aufdosierung ihren Höchstwert zu erreichen (Abbildung 4).

Mean +/- SEM

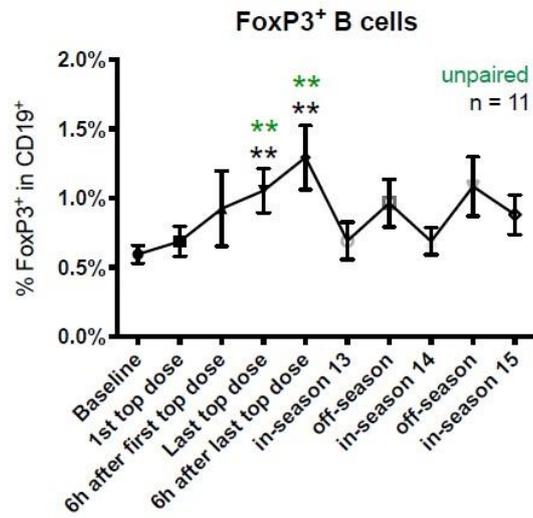


Abbildung 4: FoxP3⁺ B-Zellen über 3 Jahre AIT, unveröffentlichte PACIFIC Daten

Bei den IL-10-positiven regulatorische B-Zellen nahm über die Aufdosierungsphase ebenfalls der Anteil an FoxP3-positiven Zellen zu (Abbildung 5). Während der Anteil der Memory-B-Zellen an FoxP3-positiven B-zellen erst zum Ende der AIT anstieg (Abbildung 6).

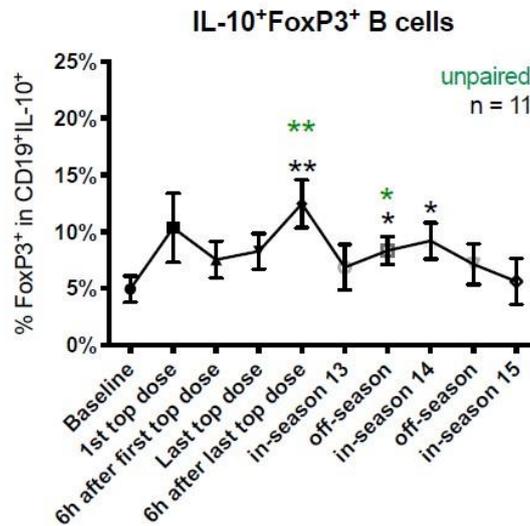


Abbildung 5: FoxP3⁺ IL-10⁺ regulatorische B-Zellen über 3 Jahre AIT, unveröffentlichte PACIFIC Daten

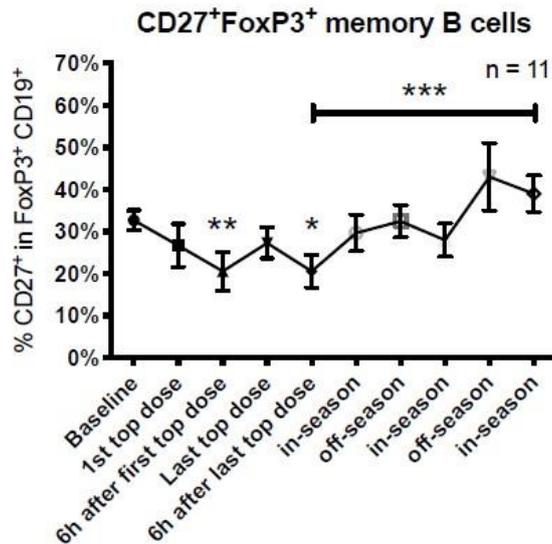


Abbildung 6: CD27⁺ FoxP3⁺ B-Zellen über 3 Jahre AIT, unveröffentlichte PACIFIC Daten

Aufgrund dieser Daten wird in der in Kapitel 2.2 beschriebenen Studie die Subgruppe der FoxP3-positiven B-Zellen weiter untersucht.

1.2.3 Antiinflammatorische Wirkmechanismen

Versuche an Mäusen konnten zeigen, dass ein Leben ohne regulatorische B-Zellen nicht möglich ist, da es zu einer chronischen Inflammation im Körper kommt (Fillatreau et al., 2002). Es sind bereits mehrere Wirkmechanismen von Bregs beschrieben worden, die hier zur Übersichtlichkeit in sekretorische und nicht-sekretorische Mechanismen unterteilt wurden. Das folgende Kapitel bietet eine Zusammenfassung. Breg-Subtypen können über nur einen oder mehrere Mechanismen gleichzeitig verfügen. In den meisten Studien wurden bisher jedoch nur isoliert einzelne Mechanismen untersucht.

1.2.3.1 Sekretorische Mechanismen

Folgende Grafik (Abbildung 7) vermittelt eine Übersicht über bereits beschriebene Botenstoffe, die von Bregs sezerniert werden können, und deren Auswirkung auf andere Immunzellen des Organismus. Schematisch sind sie an einer Zelle eingezeichnet, obwohl die einzelnen Wirkmechanismen an phänotypisch unterschiedlichen Bregs entdeckt wurden. Es wurde gezeigt, dass IL-10 sezernierende Bregs nie gleichzeitig auch IL-35 ausschütten (Shen et al., 2014), es sich dabei also um zwei verschiedenen Subtypen handelt. Einige Autoren teilen Bregs sogar nach den von ihnen sezernierten Botenstoffen ein (Baba et al., 2020).

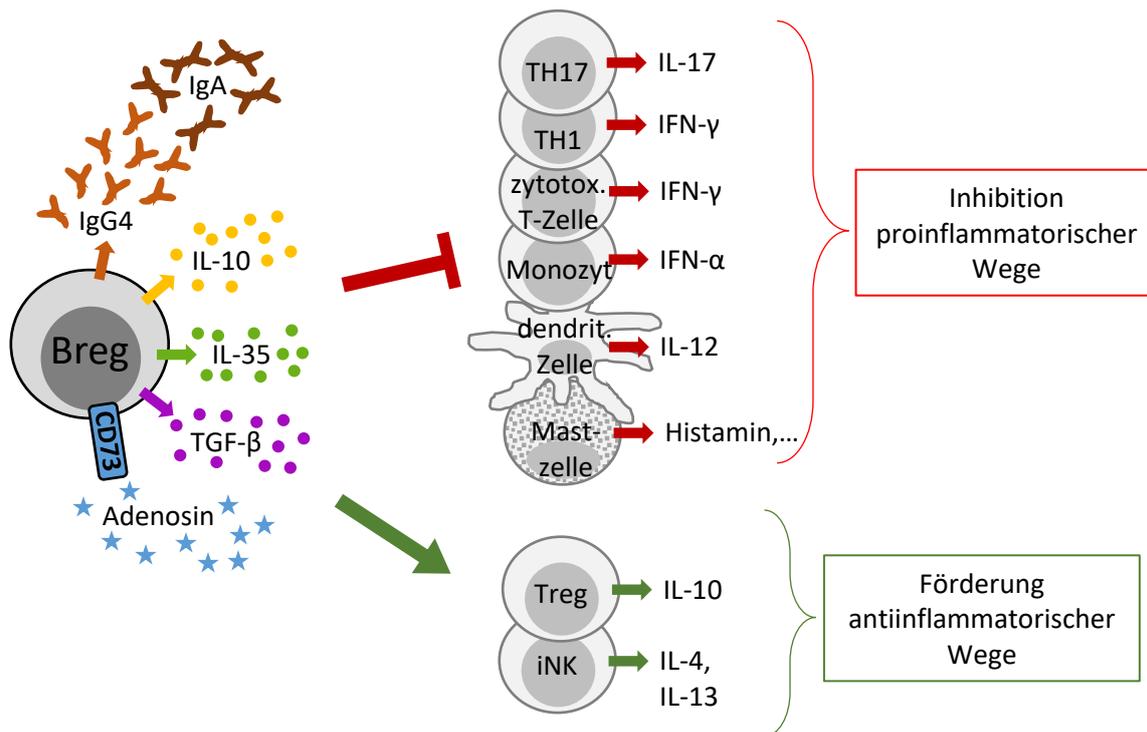


Abbildung 7: Sekretorische Wirkmechanismen von Bregs, Adaptation und Weiterentwicklung nach (Maravillas-Montero & Acevedo-Ochoa, 2017; Mauri & Blair, 2014)

Bisher ist bekannt, dass Bregs die Zytokine Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 35 (IL-35) sowie den Transforming Growth Factor β (TGF- β), das Nukleosid Adenosin und die Immunglobulin G4 (IgG4) sowie A (IgA) (Fehres et al., 2019) ausschütten können. Insgesamt kommt es dabei entweder zur Hemmung von Entzündungszellen oder zur Förderung von entzündungshemmenden Zellen und Signalwegen.

Besonderen Einfluss nehmen Bregs dabei auf T-Lymphozyten. Sie können nicht nur direkt die entzündungsfördernden T-Helferzellen (Th1, Th17, Th2) und zytotoxischen T-Zellen hemmen, sondern lenken die T-Zelldifferenzierung hin zu mehr regulatorisch T-Zellen (Treg), fördern die Effektivität und Wirkung von Treg und führen zur Konversion von Effektor-T-Zellen in regulatorische T-Zellen (Baba et al., 2020; Carter et al., 2011; Flores-Borja et al., 2013; D. Gray, Gray, & Barr, 2007; Korczak-Kowalska et al., 2017).

Für das Verständnis von Toleranzinduktion bei Allergie spielen aber auch die Wechselwirkungen zwischen Bregs und Mastzellen (H. S. Kim et al., 2015) sowie antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritische Zellen (H.-P. Zhang et al., 2013) eine Rolle.

1.2.3.2 Direkte Zell-Zell-Interaktionen

Bregs können auch durch Zellkontakt über Oberflächenproteine in Interaktion mit anderen Zellen treten. Das folgende Bild (Abbildung 8) gibt eine Übersicht über bereits gefundene Mechanismen.

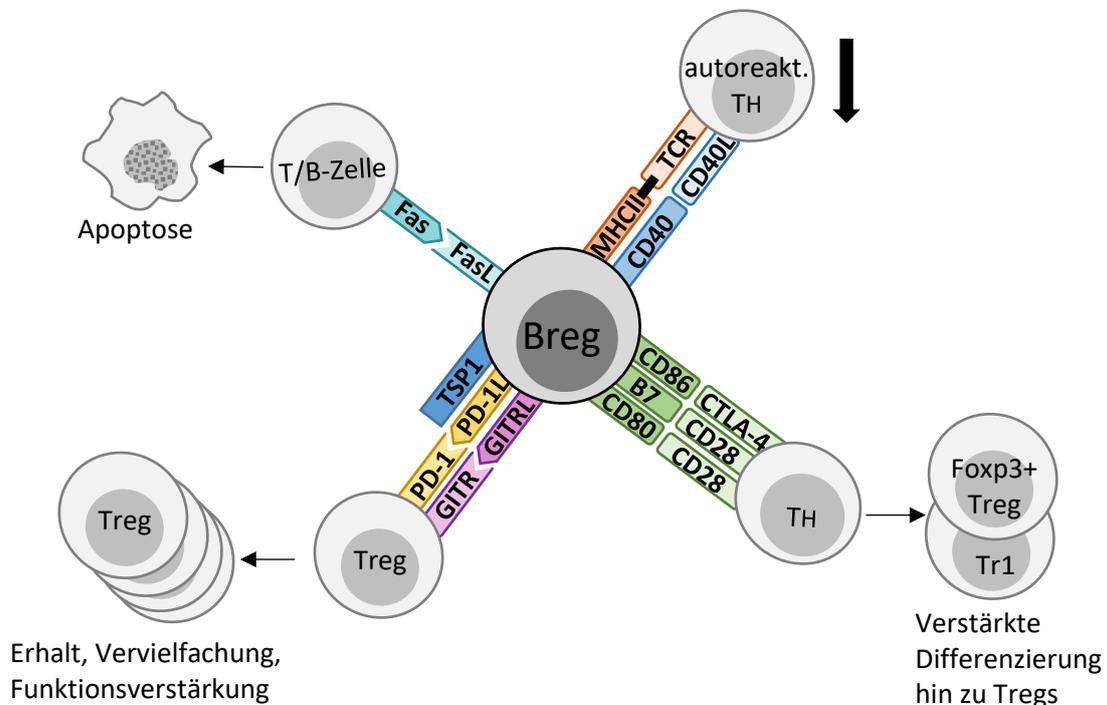


Abbildung 8: Zell-Zell-Interaktionen von Bregs, Bild erstellt mit Hilfe der Tabelle aus (Ray & Dittel, 2017)

Die Wirkung von Bregs über direkten Zell-Kontakt wurde bisher nur zu anderen Lymphozyten beschrieben. In einer Entzündungsreaktion konnten Bregs über den Fas-Liganden (FasL) direkt die Apoptose von B- oder T-Lymphozyten auslösen und dadurch die Entzündung eindämmen (Lundy & Fox, 2009). Über die Oberflächenproteine Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein Ligand (GITRL), Programmed Cell Death Protein 1 Ligand (PD-1L) und Thrombospondin 1 (TSP1) können Bregs den Erhalt, die Induktion und die Effizienz von regulatorischen T-Zellen fördern (Bodhankar, Galipeau, Vandenbark, & Offner, 2013; Ray et al., 2019; Ray, Basu, Williams, Salzman, & Dittel, 2012; H.-P. Zhang et al., 2013).

Zudem wird die Differenzierung von T-Helferzellen (Th) hin zu regulatorischen T-Zellen (FoxP3⁺Treg und Tr1) über die Oberflächenantigene CD86, CD80 und B7 gefördert (Gallego-Valle et al., 2018; Olkhanud et al., 2011). T-Helferzellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, werden über die Oberflächenproteine antigenpräsentierender Zellen (CD40 und MHC II) herabreguliert (Dasgupta, Dasgupta, & Bandyopadhyay, 2020).

1.2.4 Stimulierende und inhibierende Signale

Ebenso, wie Bregs auf andere Zellen stimulierend oder hemmend wirken können, werden sie selbst von den Zellen ihrer Umgebung in ihrer Aktivität und Bildung beeinflusst. Das Folgende Bild (Abbildung 9) zeigt einer Übersicht der vorbeschriebenen fördernden und hemmenden Signale, die auf eine Breg einwirken:

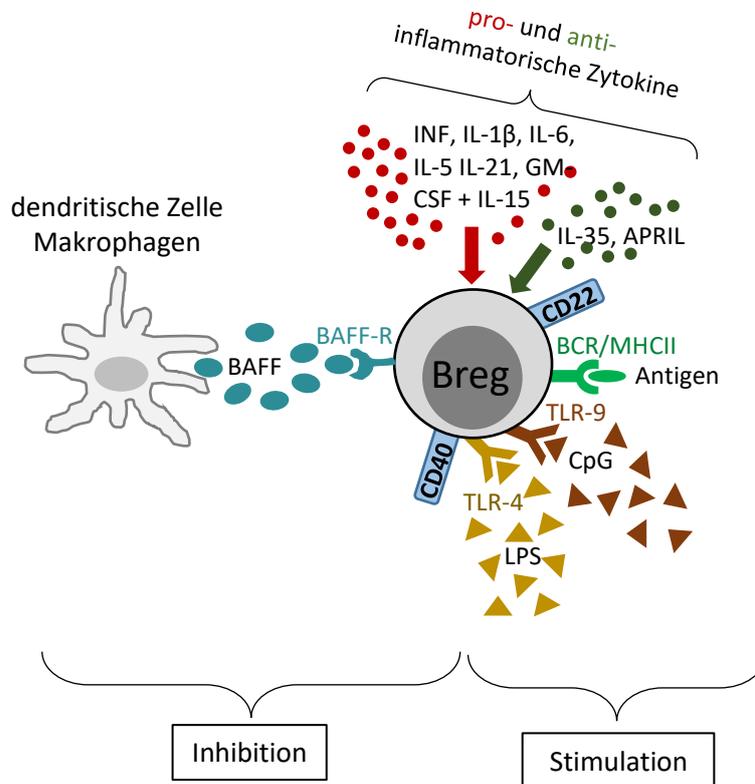


Abbildung 9: Stimulierende und Inhibierende Signale auf Bregs

Die Transmembranproteine von regulatorischen B-Zellen können, wie bei anderen Zellen, als Rezeptoren dienen. Bregs exprimieren u.a. den B-Zell-Rezeptor (BCR), der über einen gekoppelten Antikörper Antigene bindet. Dies führt zu einer Verstärkung der Breg-Antwort (Matsumoto et al., 2011).

Auch die Aktivierung vom antigenpräsentierenden Major Histocompatibility Complex II (MHCII) führt zu dieser Verstärkung (Yoshizaki et al., 2012). Toll-like-Rezeptoren (TLR) können auf B-Zellen gefunden werden und je nach Aktivierungsmuster lösen sie die Ausschüttung von bestimmten Zytokinen aus (Barr, Brown, Ryan, Zhao, & Gray, 2007). Bregs werden durch die Aktivierung von TLR-4 und TLR-9 mit bakteriellen Lipopolisaccheriden (LPS) und CpG stimuliert (Lampropoulou et al., 2008; Tian et al., 2001). Die Bindung an die Breg-Oberflächenantigene CD22 (Tsubata, 2019) und CD40 führen ebenfalls zur Modulation der B-Zellantwort. CD40 konnte dabei sowohl zur Stimulation, also auch Inhibition der regulatorischen Antwort führen (D. Gray et al., 2007; Matsumoto et al., 2014; Yoshizaki et al., 2012).

Anti-Inflammatorische Zytokine, wie Interleukin 35 (IL-35) (R.-X. Wang et al., 2014) und A Proliferation Inducing Ligand (APRIL) (Fehres et al., 2019) gehören ebenfalls zu möglichen Verstärkern der Breg-Antwort. Damit handelt es sich um ein selbstverstärkendes System von Anti-Inflammation.

Pro-inflammatorische Zytokine fördern ebenfalls die Funktion von regulatorischen B-Zellen. Bei einer hohen Konzentration kehrt sich jedoch die Wirkung um und Bregs werden gehemmt oder B-Effektorzellen stimuliert (Maravillas-Montero & Acevedo-Ochoa, 2017). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob es durch eine Überstimulation der Zellen zu einer Erschöpfung mit Funktionsverlust kommen kann (Mauri & Bosma, 2012). Beschriebene entzündungsfördernde Botenstoffe, die die Breg Antwort modulieren, sind IL-1 β , IL-6 (Rosser et al., 2014), IL-21 (Yoshizaki et al., 2012), Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Kombination mit Interleukin 15 (GM-CSF + IL-15) (Rafei et al., 2009), Typ I Interferone (Giordani et al., 2009) und von Mastzellen sezerniertes IL-5 (H. S. Kim et al., 2019).

Der B Cell Activating Factor (BAFF) verschiebt das Gleichgewicht zwischen Beff und Bregs in Richtung der Entzündung (M. Yang et al., 2012).

Zudem existieren noch nicht auf molekularer Ebene untersuchte Mechanismen, die einen Einfluss auf regulatorische B-Zellen nehmen können. Z.B. scheint das Mikrobiom einen großen Einfluss auf das Vorhandensein von Bregs auszuüben. Im Mausversuch konnte gezeigt werden, dass antibiotische Behandlung zu einer deutlichen Reduktion von Bregs in im peripheren Blut gegenüber unbehandelten Individuen führte (Miyagaki, Fujimoto, & Sato, 2015). Gleichwohl scheinen hormonelle Umstellungen, wie die Schwangerschaft und die Geburt Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Immunzellen und Breg-Subtypen zu haben (Martins, Lima, Nunes, & Borrego, 2017). Ein Vitamin D Mangel in der Schwangerschaft führte z.B. auch zu weniger regulatorischen Lymphozyten (Tregs und Bregs) und mehr proinflammatorischen Zytokinen in Neugeborenen und korrelierte mit einer Häufung von allergischen Atemwegserkrankungen bei diesen Kindern (F. Huang, Ju, Wang, & Li, 2020).

Im komplexen Zusammenspiel verschiedener Zellen im Immunsystem gehören die regulatorischen B-Zellen zu einem feinen Netz aus Verschaltungen aus regulierenden Botenstoffen und direkten Zell-Zell-Kontakten. Sie induzieren Toleranz gegenüber körpereigenen oder körperfremden Strukturen sowie Tumorzellen. Dadurch spielen sie bei der Verhinderung, Entstehung aber auch dem Erhalt von Krankheiten eine Rolle. Gleichzeitig sind sie als Marker oder für therapeutische Zwecke von wissenschaftlichem Interesse. In dieser Arbeit wird der IL-10-positive Subtyp (IL-10⁺Breg) mit einem möglichen Transkriptionsfaktor FoxP3 mittels Image Stream Technologie untersucht. Im folgenden Kapitel wird diese Methode beschrieben und erklärt.

1.3 IMAGE STREAM TECHNIK

In dieser Arbeit wird die Image Stream Technologie verwendet, um angefärbte Zellen quantitativ und qualitativ zu untersuchen. Die hierbei eingesetzten Geräte werden Imaging Flow Cytometers (IFC, bildgebende Durchflusszytometer) genannt. In diesem Kapitel werden zunächst Aufbau und Funktionsweise beschrieben. Im Folgenden werden technische Schritte erläutert, die für die Aufnahme und Auswertung der Daten notwendig sind. Die IFC werden in der Literatur häufig als Mischtechnologie von konventionellen Durchflusszytometern und Fluoreszenzmikroskopen beschrieben, weshalb sie an dieser Stelle miteinander verglichen wurden.

1.3.1 Aufbau und Funktionsweise

In dieser Arbeit wurde der ImageStream®X Mk. II der Marke AMNIS®, der Firma Millipore (jetzt Luminex) verwendet. Zur Bedienung des Gerätes wurde die AMNIS® Software INSPIRE™ genutzt. Mit ihrer Hilfe wird u.a. die Echtzeitdarstellung von Zellen und Histogrammen, Gerätekompensation und -einstellungen ermöglicht. Zur Daten- und Bildanalyse wurde die IDEAS™ Software von AMNIS® verwendet. Für die folgende Beschreibung des Geräts werden technische Daten und Bedienungsanleitungen der Firma verwendet, die auf ihrer Internetseite (<https://www.luminexcorp.com/imagestreamx-mk-ii/#overview>, zuletzt geöffnet am 31.01.22) einsehbar sind. Informationen, die aus anderen Quellen stammen werden gesondert gekennzeichnet. Das Grundprinzip der Durchflusszytometer besteht darin, dass in Suspension gebrachte, fluoreszenzmarkierte Zellen möglichst einzeln an Lichtquellen und Detektoren vorbei fließen. So lassen sich aufgenommene Signale genau einem Objekt (auch Ereignis, event) zuordnen. Objekte können außer Zellen auch Zelltrümmer oder Luftblasen sein. Durch Präzisionspumpen und eine in-line Luftkammer wird ein kontinuierlicher Fluss der Zellen im IFC erzeugt. Die Flusszelle ist so designed, dass die Zellen durch Scherkräfte an den Wänden in der Mitte der Kammer mit möglichst wenig Rotation zentriert werden. (Basiji, 2016). Dies wird auch hydrodynamische Fokussierung genannt. IFC besitzen mehrere unterschiedliche Lichtquellen. Es werden Laser unterschiedlicher Wellenlänge für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe angeboten. Diese determinieren letztendlich, welche Fluorochrome für Versuche verwendet werden können, weil sie durch Licht dieser Wellenlängen angeregt werden. Das Gerät, das für diese Arbeit verwendet wurde, besitzt drei Laser mit folgenden Wellenlängen: 405nm, 488nm, 642nm. Zusätzlich verfügt jedes Gerät über einen 785nm-Laser, der nicht für die Farbstoffanregung verwendet wird. Das von diesem Infrarotlaser erzeugte Licht wird als Parameter zur Quantifizierung der seitlichen Lichtstreuung (Side Scatter, SSC) durch die Zellen verwendet (Leif & Shapiro, 1986). Die bis jetzt beschriebenen Laser sind orthogonal zu den Detektionselementen angeordnet. Eine dritte, multispektrale Lichtquelle ist in Reihe mit den

Detektoren geschaltet wird (siehe Abbildung 10). Dies entspricht der Ausrichtung eines Durchlichtmikroskops. Es entstehen Hellfeldmikroskopiebilder (Brightfield Images).

Hinter den Lichtquellen und der Flusskammer befindet sich ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur. Damit können die Lichtsignale mit hoher Auflösung und Vergrößerung beobachtet werden. Der ImageStream®X Mk. II besitzt drei Vergrößerungsobjektive: 20x, 40x, 60x. Die Höhe von Auflösung und Vergrößerung korreliert dabei direkt mit der Einlesedauer einer Probe. Je größer ein Bild, also je größer die Vergrößerung oder die Zelle, umso geringer die Sensitivität zum Fluoreszenznachweis (Basiji, 2016).

Die Lichtdetektion erfolgt durch zwei Untereinheiten (Lichtkollektoren), weshalb das Licht hinter dem Objektiv zunächst durch einen Strahlteiler geleitet wird. Jede Lichtkollektoreinheit besteht aus einem Filterrad, einer multi-spektralen Dekompositionseinheit und einer hochauflösenden Kamera. Sie ermöglichen die gleichzeitige Aufnahme von gestreutem Licht, Brightfield- und mehreren Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Spektralbereiche pro Zelle. Jede Einheit erzeugt bis zu sechs Bilder, sodass bis zu 12 Bilder pro Zelle registriert werden.

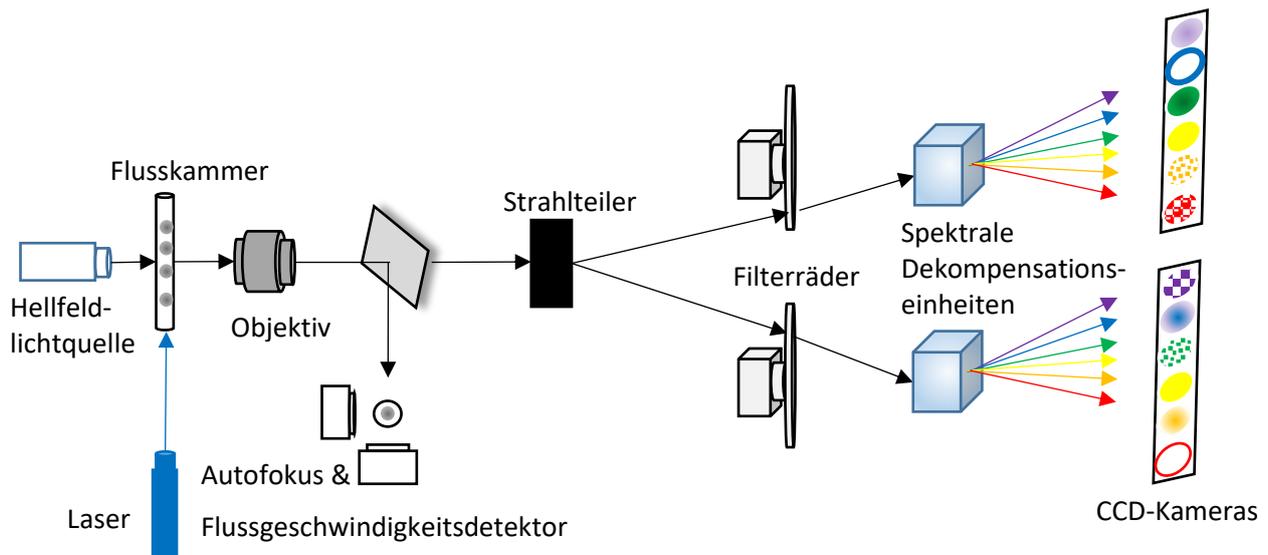


Abbildung 10: Aufbau eines ICF, vgl. www.luminexcorp.com

Das Licht verlässt die Dekompositionseinheit in sechs Wellenlängenbereiche getrennt, in unterschiedlichen Winkeln. So treffen sechs Bilder nebeneinander auf die Kamera. Diese besitzt 256 Pixelreihen und 768 Spalten. Die Image Stream Technologie verwendet Charge-Coupled-Device (CCD) Kameras, die mittels Time Delay Integration (TDI) ausgelesen werden. Diese nehmen bei kontinuierlichen Fluss und Wissen über die Höhe der Flussgeschwindigkeit Objekte auf, die sich auf einer Achse bewegen (Basiji, 2016).

Der ImageStream®X Mk. II besitzt einen Geschwindigkeitsdetektor und einen Autofokus. Genauere Informationen zur Funktionsweise können bei Basiji nachgelesen werden.

1.3.2 Datenakquisition mittels INSPIRE™

Die Bedienung des ImageStreamX® Mk.II erfolgt mit der Software INSPIRE™. Das Programm besitzt mehrere wichtige Grundfunktionen. Hierzu gehört die Betrachtung der aufgenommenen Teilbilder, die Voranalyse und Vorsortierung von Objekten sowie die Einstellung von Geräteparametern.

Die Nutzeroberfläche besteht aus drei Teilbereichen. Der erste Teil des Programms ist die Schaltfläche für die Gerätenutzung. Über sie lässt sich das Gerät starten, herunterfahren, reinigen und Probenaufnahmen koordinieren. Zudem sind die Auswahl des Objektivs und das Zuschalten von Lichtquellen (Brightfield, SSC, Farblaser) und die Einstellung ihrer Leistung in Milliwatt möglich. Side Scatter und Brightfield nehmen je einen Channel pro Kamera, also insgesamt vier Channel, ein. Die verbleibende Menge in Milliliter an Probenmaterial im Probengefäß wird kontinuierlich angezeigt.

Der zweite Bereich besteht aus einer Bildergalerie, in der die von den CCD-Kameras aufgenommenen Bilder in Echtzeit zu sehen sind. Alle Ereignisse, die durch die Flusskammer fließen, werden durchlaufend nummeriert und angezeigt (Anhang, Abbildung 69). Zu ihnen zählen außer einzelnen PBMCs auch Zelltrümmer, Luftblasen, nach Zellseparation verbliebene Granulozyten und aneinanderhaftende Zellen. Die zwölf erzeugten Bilder pro Objekt werden hier Channels genannt. Die Firma Luminex stellt auf Basis von Exzitations- und Emissionsspektren von Fluoreszenzfarbstoffen Tabellen für die Zuordnung von Farbstoffen zu Channels bereit. So kann durch geschickte Wahl der Fluorochrome ein Färbepanel mit passenden Emissionsspektren zusammengestellt werden.

Der dritte Teil der Programmoberfläche dient der Echtzeitanalyse (Gating) der Daten. Histogramme und Plots werden aus den Eigenschaften von Signalen erstellt. In den Diagrammen lassen sich einzelne Subpopulationen markieren, sog. Gaten. Gegatete Populationen können einzeln auf dem Bildschirm dargestellt und als Daten aufgenommen werden.

1.3.3 Kompensation und Datenauswertung mittels IDEAS™

Das Programm IDEAS™ wird zur Analyse der mit Hilfe von der CCD Kamera und INSPIRE™ aufgenommenen Daten verwendet. Es kann das Gating unterschiedlicher Zellpopulationen sowie die Kompensation von spektralen Überlagerungen durchführen.

Die Datenauswertung mit IDEAS™ erfolgt anhand morphologischer Unterschiede der eingelesenen Objekte. Das Programm nutzt hierfür Masken, die Tools zur Bilderkennung anhand von Pixelintensitäten darstellen. Masken werden vom Programm bereitgestellt oder können von Hand definiert werden (Dominical, Samsel, & McCoy, 2017). Vorgefertigte Masken erlauben die automatische Analyse von mehr als 85 morphologischen Merkmalen der Zelle, die sowohl Fluoreszenz- als auch durchlichtmikroskopische Bilder und SSC betreffen (Vorobjev & Barteneva, 2016). Bereits ohne Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen sind Aussagen über Größe, Granularität, Form und Textur möglich (Lippeveld et al., 2019). Die Analyse von Signalintensität und -verteilung in den Farbkanälen

(sog. Channels) erlaubt die Unterscheidung der Objekte anhand ihrer Strukturen und deren Lokalisation. Ähnlich wie bei INSPIRE™, können auf der Benutzeroberfläche eine Bildergalerie und eine Analysefläche nebeneinander angezeigt werden. Ein Objekt wird als Punkt im Plot direkt einem Bild zugeordnet. Es lassen sich Populationen von Zellen über die Erstellung von Histogrammen und Plots gated und damit definieren. Hieraus können Datensätze zur statistischen Auswertung erzeugt werden. Die Nutzung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe in der gleichen Probe macht eine Kompensation erforderlich, um spektrale Überlappung des emittierten Lichts auszugleichen. Diese Kompensation wird ebenfalls mit IDEAS™ durchgeführt, indem eine Kompensationsmatrix berechnet und auf die Rohdaten angewendet wird.

Farbstoffe sind bei mehrfarbigen Proben so zu wählen, dass sich die Emissionsmaxima gut voneinander unterscheiden lassen und ein Signal in unterschiedlichen Channels erzeugen. Bei den meisten Farbkombinationen existiert jedoch ein spektraler Überlappungsbereich (Abbildung 11) (Tung, Parks, Moore, Herzenberg, & Herzenberg, 2004). Er führt zum Strahlen eines Farbstoffs in benachbarte Channel (sog. Beamen) und dort zu einem falschpositiven Signal.

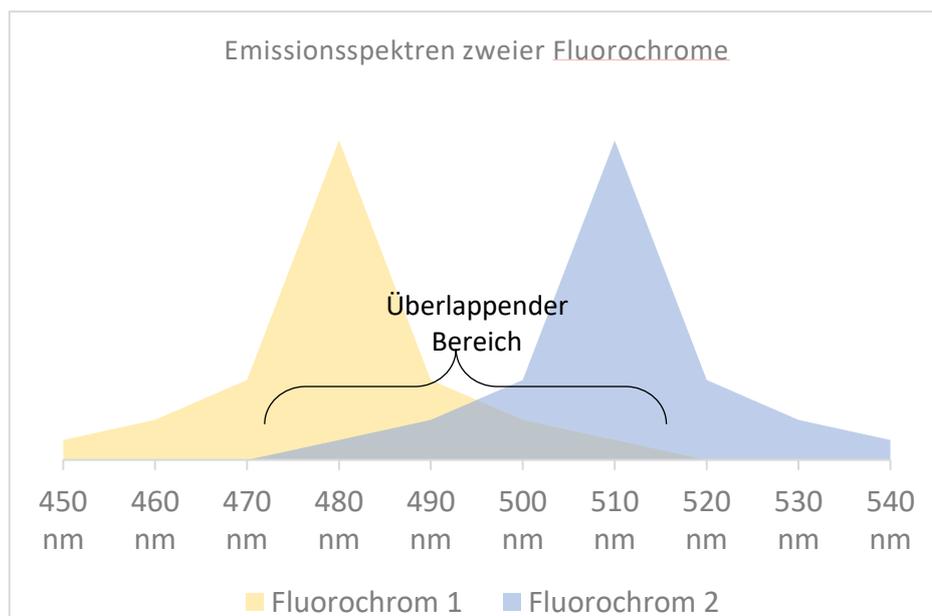


Abbildung 11: Beispiel für überlappende Emissionsspektren zweier Fluorochrome: Fluorochrom 1 und 2 emittieren im Bereich von ca. 470-520 nm beide und besitzen dort einen spektralen Überlappungsbereich, somit strahlt Fluorochrom 1 bei Anregung auch in den Kanal in dem die Emission von Fluorochrom 2 detektiert wird

Zur Detektion dieses Beamings werden speziell Einzelfärbungen aller Fluorochrome des Mehrfarbenpanels erzeugt und mit den gleichen Laserleistungen, wie bei der mehrfarbigen Probe, bestrahlt. Die Brightfield-Lichtquelle bleibt ausgeschaltet. Die daraus entstandenen Signale werden mit INSPIRE™ aufgenommen und die Einzeldaten im IDEAS™ zu einer Kompensationsmatrix zusammengesetzt. Sie enthält alle Werte zum Herausrechnen der Beamingfehler.

Einzelne unglaubliche Werte werden vom Programm rot markiert und lassen sich von Hand korrigieren. Regeln dazu lassen sich im Usermanual (www.luminexcorp.com) nachlesen. Eine einmal erstellte Matrix lässt sich für alle Proben, die die gleichen Farben, Farbe- und Probenverarbeitungsschritte besitzen, nutzen.

IDEAS™ ermöglicht weiterhin die Erstellung einer Vorlage für alle Auswertungsschritte (Template Files). Sie speichern alle im Analysebereich durchgeführten Gatingsschritte. So lässt sich die exakt gleiche Auswertung bei allen Proben einer Versuchsreihe durchführen.

1.3.4 Übersicht über den Datenfluss

In diesem Kapitel wird eine kurze Übersicht über die Gewinnung von Daten vom Einlesen der Proben bis hin zu ausgewerteten Datensätzen gegeben, vgl. (IDEAS™-Usermanual, www.luminexcorp.com).

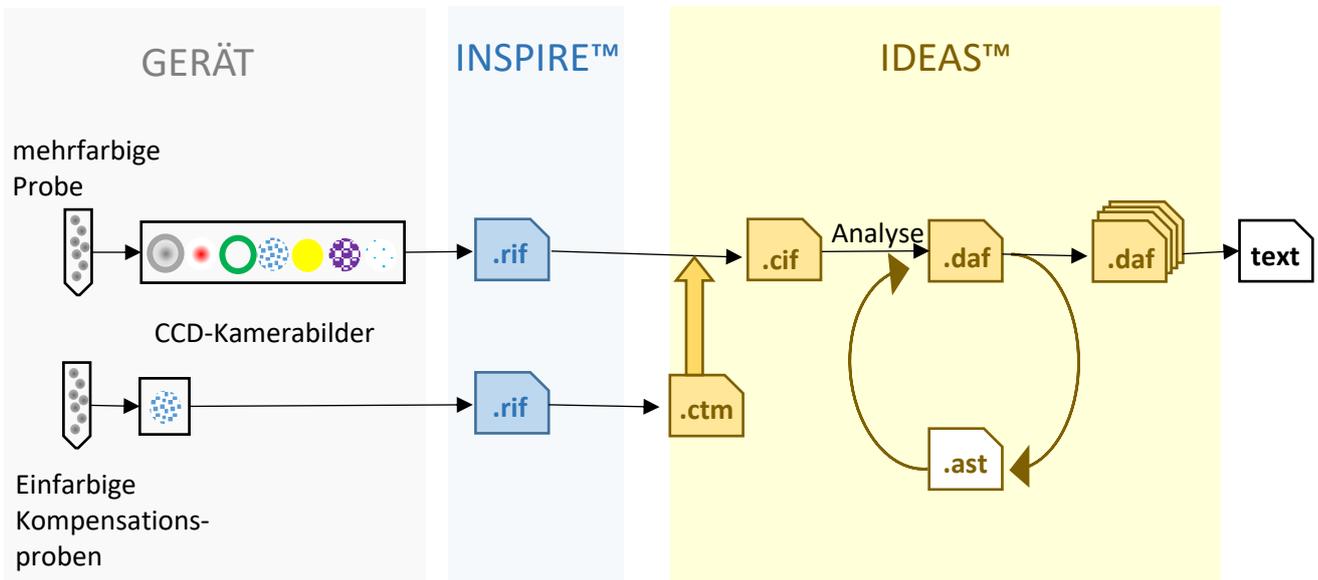


Abbildung 12: Workflow Daten (vgl. IDEAS™ Usermanual, www.luminexcorp.com)

Im INSPIRE™ entstehen aus den eingelesenen mehrgefärbten Zellproben und aus einzelgefärbten Kompensationsproben zunächst Rohdaten (Raw Image Files, *.rif File). Die Rohdaten aus den Einzelfärbungen werden im IDEAS™ zu einer Kompensationsmatrix (*.ctm File) verrechnet. Diese enthält nun alle Werte zur Korrektur falschpositiver Signale, die durch spektrale Überlappung entstanden sind (Kapitel 1.3.3).

Wird eine Kompensationsmatrix auf Rohdaten von Mehrfachfärbungen angewendet, entsteht ein kompensiertes File (Compensated Image File, *.cif File). Kompensierte Daten werden im IDEAS™ durchgaten, d.h. Auswahl gemäß vorgegebener Kriterien, von Populationen in Histogrammen oder Plots ausgewertet. Mit Beginn der Analyse eines kompensierten Files entsteht ein Analysefile (Data Analysis File, *.daf File), das alle Informationen zu Populationen und alle Grafiken speichert. Um die exakt gleiche Analyse für mehrere Proben durchführen zu können, gibt es die Option alle durchgeführten

Analyseschritte, also Grafiken und Populationsdefinitionen, als Vorlage (Template File, *.ast File) zu speichern. Dieses Template kann dann auf alle kompensierten Files angewendet werden.

Zum Ende der Analyse sind alle Proben, die auf die gleiche Weise gefärbt und ausgewertet wurden, als Analysefiles im IDEAS™ vorhanden. Zahlen zur Häufigkeit bestimmter Merkmale können als Textdatei exportiert und mit einem Programm, z.B. Excel, tabellarisch aufgelistet werden. Grafiken, Zellbilder und Bildkompositionen werden als Bilddateien (*.png File, *.jpeg File oder *.bmp File) exportiert.

1.3.5 Vergleich von konventioneller Durchflusszytometrie mit Fluoreszenzmikroskopie

Diese Arbeit setzt sich intensiv mit der Funktion sowie der Bedienung eines Imaging Flow Cytometers auseinander. In der Literatur sind bereits Vor- als auch Nachteile des IFCs beschrieben worden, die zum Teil bestätigt, aber auch ergänzt werden konnten. Häufig wird bei Imaging Flow Cytometern von einer Kombinationstechnologie aus Fluoreszenzmikroskopie und einem konventionellen Durchflusszytometer gesprochen (Qian & Montgomery, 2015). Da es Eigenschaften beider Methoden vereinen soll (Vorobjev & Barteneva, 2016), wird im Folgenden die konventionelle Durchflusszytometrie der Fluoreszenzmikroskopie gegenübergestellt. Im Diskussionsteil werden die sich daraus abgeleiteten und selbst erarbeiteten Vor- und Nachteile des IFC diskutiert. Zuletzt werden die daraus folgendenden Anwendungsgebiete dargestellt.

Konventionelles Durchflusszytometer

Das konventionelle Durchflusszytometer (Flow Cytometer, FC) wird im alltäglichen Sprachgebrauch hauptsächlich FACS-Gerät genannt. Die Abkürzung steht für **F**luorescence-**A**ctivated **C**ell **S**orting (Luttmann et al., 2014) und beschreibt damit genau seine Funktionsweise: Strukturen von Zellen oder Partikeln werden mit antikörper-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in Suspension gebracht. Diese wird dann in das FACS-Gerät eingespeist. Ereignisse fließen nun möglichst einzeln an Lasern mit bekannten Wellenlängen vorbei. Detektoren zeichnen reflektierte, gestreute oder emittierte Strahlung auf. Mit Hilfe einer Auswertungssoftware lassen sich die einzelnen Ereignisse dann nach ihren Eigenschaften und Fluoreszenzmarkierungen gaten. Damit werden Populationen voneinander unterschieden und es können quantitative Aussagen über die markierten Zellstrukturen getroffen werden.

Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden ebenfalls Zielstrukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Zellen oder Partikel werden mit einer Lichtquelle ausgesuchter Wellenlänge bestrahlt und die emittierten Strahlen durch ein Vergrößerungsobjektiv, einen Emissionsfilter und das Okular

betrachtet. Die entstandenen Bilder können auch als Fotografien der Zelle gespeichert oder bei zeitlich längeren Betrachtungen als Film festgehalten werden.

Modifiziert nach (Vorobjev & Barteneva, 2016) wurden Vor- und Nachteile der Geräte einander in einer Tabelle gegenübergestellt:

Eigenschaften	FACS	Fluoreszenzmikroskop
Probengröße	Große Mengen an Zellen können eingelesen werden, statistisch signifikante Aussagen können getroffen werden	Max. 100 Ereignisse beurteilbar
Zellstrukturen	Viele Marker können gleichzeitig eingesetzt werden, also mehrere Zellreihen und ihr Verhältnis zueinander können parallel untersucht werden	Max. 3-4 Marker gleichzeitig verwendbar, sonst spezielle Software oder Ausbildung notwendig
		Seltene Ereignisse und zeitliche Verläufe darstellbar
	Keine Information über die Lokalisation des Markers in der Zelle, Zell-Zell-Interaktionen, Anhängsel von Zellen, multiplen Ereignissen	Genaue Lokalisation von Strukturen innerhalb der Zelle, Zell-Zell-Interaktionen, Anhängsel von Zellen, multiplen Ereignissen darstellbar
Sensitivität	Niedrig, vergleichsweise starkes Signal wird benötigt	Hoch: auch schwache Signale werden detektiert
Signal	Nur positiv oder negativ und Intensitätsvarianten	Bild mit hoher Ortsauflösung Limitiert durch Bild-Segmentierung
	Keine optische Kontrolle des Signals möglich	Zellschäden und Ausbleichen des Farbstoffs durch lange Laserbelichtungszeit (Icha, Weber, Waters, & Norden, 2017)
Geräte- bedienung	Relativ schnell, extra Software zum Auswerten der Plots notwendig	Langsam und aufwendig, extra Software zum Auswerten und zusammensetzen der Bilder notwendig
	Etablierte, in der Forschung übliche Methode	Etablierte, in der Forschung übliche Methode

Tabelle 2: Gegenüberstellung von FACS und Fluoreszenzmikroskopie

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Durchflusszytometrie hauptsächlich quantitative und die Fluoreszenzmikroskopie qualitative Aussagen über interessierende Strukturen von Zellen machen können. Das IFC versucht beides zu vereinen. Es zählt die Fluoreszenzsignale im Fluss der Zellsuspension, wie ein konventionelles FC, und macht gleichzeitig Bildaufnahmen jeder Zelle und seiner Fluoreszenzsignale. Die dadurch entstehenden Vor- und Nachteile werden später diskutiert (s. Seite 64).

2 METHODIK

2.1 PROTOKOLLETABLIERUNG FÜR DIE NUTZUNG DES IFC

Erste Versuche zeigten, dass etablierte durchflusszytometrische (FACS) Färbeprotokolle nicht auf das Imaging Flow Cytometer übertragbar waren. Deshalb war die Etablierung eines neuen Aufbereitungs- und Zellfärbeprotokolls notwendig. Dieses Kapitel beschreibt das Vorgehen zur Erstellung eines Protokolls zur Nutzung eines Imaging Flow Cytometers (IFC). Es werden die Schritte von der Probengewinnung, über die Testung von Farbstoffen und Fixiermethoden bis zum Einlesen einer Zellsuspension in das Gerät beschrieben.

2.1.1 Probengewinnung und Zellselektion

In dieser Arbeit sollten im Blut zirkulierende Immunzellen untersucht werden. Blut ist im Vergleich zu anderen Proben leicht gewinnbares und zellreiches Material. Als Probenmaterial wurden deshalb Blutspenden von gesunden Probanden genutzt. Dafür wurde zunächst von einem Probanden mit einer krankenhausbliche grüne Flügelkanüle (Größe: 21 Gauge) aus einer peripheren Vene Blut abgenommen.

Im nächsten Schritt wurden die Blutbestandteile durch Zentrifugieren aufgeteilt. So konnten von den PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) die Erythrozyten und der Großteil der Granulozyten abgetrennt werden. Letztere scheiden dadurch als Störgrößen für spätere Messungen aus (Luttmann et al., 2014). Für die Zellseparation konnten zwei Verfahren genutzt werden, die die unterschiedliche Zelldichte der Blutbestandteile ausnutzte, um sie voneinander zu trennen. Dabei wurde Blut über ein hochdichtes Medium geschichtet und anschließend zentrifugiert (Chen et al., 2020). Zelltrümmer, Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten mit einer höheren Dichte als das Medium setzen sich am Boden des Probengefäßes ab, während PBMC, die eine geringere Dichte besitzen, oberhalb des Mediums verblieben (Luttmann et al., 2014) s. 56-59 vgl. Abbildung 13.

Vergleich zweier PBMC-Separationsmethoden

Im Rahmen der Arbeit wurden eine manuelle Methode, bei der Blut und Ficoll mit Pipette von Hand übereinander geschichtet wurden, und eine Methode mit vorpräparierten Zellisoliationsröhrchen, Cell Preparation Tubes (auch CPT) von BD Biosciences, verwendet. Bei letzteren handelt es sich um Vacutainer, in die direkt die Blutentnahme erfolgt. Die Vermischung von Blut und Ficoll wird dabei durch ein Polyesterharz verhindert (Chen et al., 2020). Die PBMC-Proben wurden hinsichtlich Ausbeute, Reinheit und Lebensfähigkeit der Zellen untersucht.

Im Anschluss an die Isolierung von PBMC aus peripherenvenösem Blut erfolgte stets eine Ermittlung der Zellanzahl in Suspension. Diese erfolgte über Zellzählung in einer Neubauerzählkammer. Die Menge an Zellen in Suspension war entscheidend, um Reagenzien, wie z.B. Farben, entsprechend der vom Hersteller geforderten Zellsuspensionskonzentrationen einsetzen zu können.

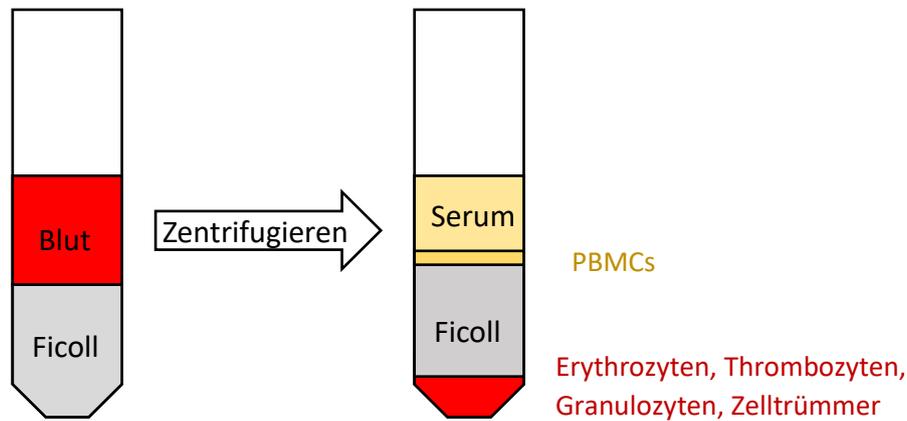


Abbildung 13: manuelle Ficollseparation, vgl. (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, 2014)

2.1.2 Etablierung der Färbungen

Im Kapitel 1.1.4 wurden bereits die Grundlagen zu Fluoreszenzfärbungen erklärt. Fluorophore besitzen unterschiedliche Molekülgrößen und Signalstärken, was bei der Auswahl des Farbstoffes für ein Merkmal einer Zelle eine Rolle spielt. Zellstrukturen, die nur in geringer Konzentration vorliegen, benötigen einen hellen Farbstoff, um überhaupt detektiert zu werden. Intrazelluläre Merkmale können nicht immer von Farbstoffen großer Molekülmasse oder ungünstiger Verteilung molekularer Ladungen dargestellt werden, weil diese die Zellmembran nicht überwinden können.

Die vom Hersteller angegebene Helligkeit eines Fluorophors für FACS Geräte konnte nicht direkt auf das verwendete Imaging Flow Cytometer übertragen werden. Die Etablierung der Farbstoffe erfolgte deshalb einzeln und mit bekannten, gebräuchlichen FACS Farbstoffen. Zuerst wurden Farben für extrazelluläre Merkmale getestet, dann für die Detektion von toten Zellen und zuletzt für intrazelluläre Farben. Eine Färbung wurde als glaubhaft eingestuft, wenn sich die angefärbten Strukturen im Fluoreszenzbild an der Stelle befanden, wo sie erwartet wurden und, wenn der erwartete Anteil der Zellen das gefärbte Merkmal aufwies.

Etablierung extrazellulärer Färbungen

Die folgenden Farbstoffe wurden für extrazelluläre Färbungen untersucht: APC-Cy7, AF488, FITC-viobright, PE, PE-Cy7, BV605, BV711, BV421, PerCP-Cy5.5. Zum Vergleich ihrer Färbequalität wurden in jeder Versuchsreihe parallel mehrere unterschiedliche Einzelfärbungen des gleichen

Oberflächenmerkmals durchgeführt. Dabei wurden die Vorschläge des Herstellers zu Farbstoffkonzentration und Färbedauer eingehalten. Färbungen wurden in mindestens zwei Tests durchgeführt, um die Zuverlässigkeit des Signals zu überprüfen.

Bei den ersten Färbungen wurde außerdem der Färbeerfolg kontrolliert und eine Einschätzung der Spezifität der Färbungen durchgeführt. Dafür wurden zwei Testreihen mit identischen Fluoreszenzmarkern gefärbt. Die eine Reihe bestand aus PBMC, die andere aus vorsortierten Zellen, die alle das Merkmal aufwiesen, welches angefärbt werden sollte. Zum Aussortieren dieser Zellen wurde die manuelle MACS® (Magnetic Cell Selection) Technologie der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Bei einer validen Färbung gab es bei den vorselektierten Reihen in annähernd 100% der Zellen ein Fluoreszenzsignal, während in der PBMC Probe nur ein vorher erwarteter Prozentsatz das Merkmal aufwies.

Markierung apoptotischer Zellen

Zum Zeitpunkt der Färbung bereits tote Zellen wurden ebenfalls markiert, um sie bei der Analyse von Datensätzen aussortieren zu können. Folgende Farbstoffe wurden miteinander verglichen: DAPI, ZombieRed™, Fixable Viability Stain 520, Aqua Live/Dead®.

Zur Überprüfung des Färbeerfolgs wurden, wie oben, zwei Zellreihen nebeneinander identisch gefärbt. Die eine bestand hier aus einer unveränderten PBMC Probe, in der anderen Reihe wurden 50% der Zellen mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DSMO) getötet und unter 50% vitale Zellen gemischt. Eine valide Färbung zeigte in der PBMC Probenreihe ca. 1% apoptotische Zellen und in der Kontrollreihe ca. 50%.

Etablierung intrazellulärer Färbungen

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden auf ihre Eignung zur Darstellung seltener intrazellulärer Merkmale und Botenstoffe untersucht: APC, AF647, PE, BV786, PE-Dazzle und PE-CF594. Wie bei den vorherigen Färbeversuchen wurde darauf geachtet, dass Farbstoffe parallel an gleichen Merkmalen verglichen wurden. Die Zellmembranen wurden permeabilisiert, damit die Farbstoffe ins Zellinnere gelangen konnten.

Mehrfarbige Panels

Für die Etablierung eines mehrfarbigen Panels wurde in mehreren Schritten die Anzahl der gleichzeitigen Färbungen pro Probe erhöht.

Die Bestimmung der optimalen Färbekonzentrationen der validierten Fluorophore für ein Merkmal, die Entscheidung über den Cutoff-Wert für die Definition eines positiven Signals sowie die Auswahl der Kombination an Farbstoffen wird in Kapitel 2.2 anhand der konkreten Fragestellung erläutert.

2.1.3 FC-Rezeptorblock

Binden Immunfarbstoffe an F_c-Rezeptoren von Leukozyten, entsteht unspezifische Fluoreszenz. Um dies zu verhindern, wurde ein sog. F_c-Block durchgeführt. Hierbei werden PBMC-Suspensionen noch vor dem ersten Färben mit dem Reagenz (z.B. TruStain von BD Biosciences) gemischt, das diese Bindungsstellen für nachfolgende Färbungen besetzt. Ebenso wird berichtet, dass auch Inkubation in Serum diesen Effekt haben soll. Beides beeinflusst nicht die nachfolgende Färbequalität (Andersen, Al-Karradi, Kragstrup, & Hokland, 2016). Unspezifische Fluoreszenz, durch nicht-gebundene Antikörper, wird durch mehrfaches Waschen der Proben in frischen Pufferlösungen verhindert (Sack, Trnok, & Rothe, 2006).

2.1.4 Fixiermethoden

Vor der Durchführung intrazellulärer Färbungen werden die Zellen chemisch fixiert. Hierbei können Färbungen von Oberflächenantigenen in kovalente und daher chemisch stabilere Bindungen überführt werden. So können möglichst viele Zellmerkmale konserviert werden, selbst wenn die Zellmembranen zeitgleich zum Einlassen der intrazellulären Farbstoffe perforiert wurden. Hierfür stehen mehrere Reagenzien und Fixierlösungen mehrerer Firmen zu Auswahl (Matsuda et al., 2011). Die Qualität der Fixierung unterscheidet sich hinsichtlich der gewählten Methode (Arnold et al., 1996; Su et al., 2004), vergangener Zeit bis zur Fixierung und der Länge der Fixierung (Gruber, Moennig, Hewicker-Trautwein, & Trautwein, 1994; Pikkarainen, Martikainen, & Alafuzoff, 2010). Zellstrukturen werden, u.a. durch kovalente Bindungen, erhalten und können so später angefärbt werden (FRAENKEL-CONRAT & OLCOTT, 1948; Ostasiewicz, Zielinska, Mann, & Wiśniewski, 2010).

Testung unterschiedlicher Fixiermethoden

Es wurden folgende Fixier- und Permeabilisierungsmethoden an vorher erfolgreich getesteten einzel- und mehrfachgefärbten Proben untersucht: Methanol, Paraformaldehydlösung (PFA, 4%), die Kombination aus Methanol und Paraformaldehyd, FoxP3/Transkriptionsfaktor-Fixierungskit von eBiosciences™ und Cytotfix/Cytoperm™ von BD Biosciences.

2.1.5 Erythrozytolyse

Bei den ersten Versuchen mit Einlesen der Proben ins IFC fielen im INSPIRE® große Mengen an Debris auf, die eine gute Auswertung erschwerte. Dies betraf besonders die Genauigkeit bei der Ermittlung einzelner Leukozyten (Singlets) aus Dotplots.

Erythrozytolyse zur Verringerung des Debris

Wir vermuteten als Ursache für den Debris kleinste verbliebene Restmengen von Erythrozyten in der PBMC Zellsuspension. Deshalb wurde dem Färbeprotokoll ein weiterer Schritt mit einer Lyse von Erythrozyten mit dem Kit der Firma Fa. DAKO (easy Lyse Reagent, REF S2364, Lot 20057454) hinzugefügt. Dabei handelt es sich um ein osmotisches Verfahren, bei dem ein Ionen- und Wassereinstrom in die roten Blutkörperchen (Wittels, Hubert, Musch, & Goldstein, 2000) zum Schwellen (Guizouarn & Motais, 1999) und Platzen führt (Chernyshev et al., 2008).

2.1.6 Stimulation

Liegt ein Merkmal im Inneren einer Zelle oder ihrem Zellkern und ist es nur in geringer Konzentration vorhanden, können mitunter nur sehr schwache Färbesignale detektiert werden. Eine Stimulation der Zelle kann diese seltene Merkmalsausprägung verstärken.

Vergleich von Färbungen seltener Signale bei stimulierten mit unstimulierten Proben

Es wurden zwei unterschiedliche Medien für die Stimulation von Lymphozyten verwendet. Dabei erfolgte vor jeder Färbung eine vierstündige Inkubation der Zellen im Medium und nach Fixierung und Fluoreszenzfärbung ein Vergleich der inkubierten Medien mit nicht inkubierten gleichgefärbten Proben. Die beiden verwendeten Medien enthielten Blutserum, welches mit seiner komplexen Zusammensetzung aus Elektrolyten, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren etc. zur Stimulation der Zellen und Verstärkung der Zellsignale führt. Zudem waren den Medien antibiotisch-antimykotische Reagenzien zur Verhinderung der Keimbesiedlung und Glutamin als essentielle Aminosäure, die in Zellen zu großen Mengen verstoffwechselt werden, hinzugefügt. (Schmitz, 2011). Der Unterschied zwischen den Medien bestand darin, dass das eine mit humanem Serum, das andere mit FCS (Fetal Calf Serum) hergestellt wurde.

2.1.7 Trägerflüssigkeiten

Als Trägerflüssigkeit für Färbungen, Lagerung, Waschen und Einlesen der Proben werden Pufferlösungen verwendet. Sie sind isotonisch zum Zellplasma und stabilisieren somit die Zellmembran in Suspension. Alle verwendeten Pufferlösungen enthalten u.a. PBS (Phosphat-Buffered Saline).

Für die extrazellulären Färbe- und Waschschrte wird als Trägerflüssigkeit hauptsächlich der sog. FACS Puffer verwendet. Er enthält zusätzlich FCS (Fetal Calf Serum) und Natriumazid, die unspezifische Antikörperbindung, Antikörperablösung oder Ausbleichen des Farbstoffs während der Färbung verhindern und bakterielles Wachstum kontrollieren (<https://www.bosterbio.com/newsletter-archive/20170512-ingredients-facs-buffer>, zuletzt geöffnet am 31.01.22).

Für intrazelluläre Färbungen werden Permeabilisierungspuffer der Fixierkits von BD und eBiosciences und der verwendet. Die Trägerlösung für das Einlesen der Proben ist PBS.

2.1.8 Probeneinlesen

Das Einlesen der Proben erfolgte in einer Zellsuspension bestehend aus PBMC und PBS in einem 1,5ml Eppendorfgefäß.

Bestimmung der idealen Probenkonzentration beim Einlesen in das IFC

Es wurden mehrere Zellkonzentrationen und Flüssigkeitsvolumina beim Einlesen ausprobiert und hinsichtlich Einlesedauer und -qualität beurteilt.

2.2 STUDIE ZUR DARSTELLUNG VON BREGS IN PERIPHERVENÖSEM BLUT MITTELS IFC

In einer Studie (Teil von PACIFIC, EudraCT 2015-003545-25) mit neun Probanden wurden die Erkenntnisse zur Nutzung des Imaging Flow Cytometers genutzt um regulatorische B-Zellen und ihren potentiellen Transkriptionsfaktor FoxP3 quantitativ und qualitativ zu untersuchen. Regulatorischen B-Zellen sind als Zellen mit einem B-Zell-Merkmal plus mindestens einer regulatorischen Komponente definiert (Kapitel 1.2). In der Studie wurde als B-Zellmarker das Oberflächenprotein CD19 und als regulatorisches Element Interleukin 10 (IL-10) verwendet. Ziele der Studie waren:

1. Verifikation des Nutzens der IFC Technologie zur Darstellung selten vorkommender Zellsubgruppen
2. Visualisierung und Quantifizierung von IL-10-positiven regulatorischen B-Zellen (IL10⁺Bregs), IL-10-positiven Memory-Bregs und deren Aktivität
3. Nachweis von Treg-Transkriptionsfaktor FoxP3 in Subtypen von IL-10-positiven regulatorischen B-Zellen (IL10⁺Bregs) und B-Zellen im Allgemeinen
4. Detektion von Unterschieden in der Häufigkeit von regulatorischen B-Zell-Subtypen zwischen Patienten mit allergischer Rhinitis mit und ohne Allergenimmuntherapie sowie ohne Allergie

Zunächst wird das Studiendesign beschrieben, anschließend die Protokollanpassung für die Nutzung des IFC zur Darstellung von Bregs und die Durchführung der Versuche. Zuletzt werden die Gatingstrategien aufgezeigt.

2.2.1 Studiendesign

Die Studie wurde mit insgesamt neun Probanden durchgeführt, die in drei Untergruppen eingeteilt wurden:

1. Probanden mit allergischer Rhinitis auf Pflanzenpollen, die bisher ausschließlich symptomatische Therapie erhielten (AR)
2. Probanden mit allergischer Rhinitis auf Pflanzenpollen, die zusätzlich eine spezifische Allergenimmuntherapie gegen ihre Allergene erhielten (AR+AIT)
3. Probanden ohne allergische Rhinitis (Healthy Control, HC)

Einschlusskriterien für die Studie waren: Alter zwischen 20 und 40 Jahren, Nichtraucher, keine systemischen internistischen Erkrankungen und keine Einnahme von systemischen immunsuppressiven Medikamenten oder antiallergischen Medikamente innerhalb der letzten 48 Stunden. Probanden wurden zur Gruppe mit allergischer Rhinitis gezählt, wenn sie anamnestisch passende Symptome aufwiesen sowie die dazugehörige Sensibilisierung mittels Pricktestung und dem Vorhandensein von spezifischem IgE nachgewiesen wurde. Probanden aus der AR+AIT Gruppe hatte eine zu ihrer Anamnese und Testung passende AIT abgeschlossen und eine subjektive Beschwerdebesserung dadurch erfahren. Probanden der Kontrollgruppe waren sowohl anamnestisch beschwerdefrei als auch in Prick und IgE Testung unauffällig.

Die Probanden wurden zunächst aufgeklärt und füllten einen Fragebogen zu allergischen Symptomen aus. Anschließend erfolgten eine Haut-Pricktestung sowie die Entnahme von ca. 40 ml Blut für die immunologische Zelluntersuchung und die Bestimmung von gesamt und spezifischem IgE aus dem Serum. Im Anschluss erfolgte die Aufarbeitung, Färbung und das Einlesen der Proben in ein IFC. Pro Probe wurden zwischen 20-60 Millionen PBMC gewonnen, wovon aus technischen Gründen je eine Million in einem IFC File aufgenommen wurden.

Die Auswertung und Präsentation der Daten erfolgte mit Hilfe von INSPIRE, Excel und Origin.

2.2.2 Protokollanpassung für die Darstellung von Bregs

Aus den Erkenntnissen aus Kapitel 2.1 ließ sich ein Protokoll für die Darstellung der regulatorischen B-Zellen erstellen (Anhang, Kapitel 10.4). Hierfür wurden zuerst die Färbungen, dann Probenverarbeitung und Geräteeinstellungen angepasst.

In Kapitel 1.2 wurde erläutert, welche Marker zur Darstellung der regulatorischen B-Zellen ausgewählt wurden. Oberflächliche Marker sind hier CD19, CD27 und IgD. Die Strukturen zur Darstellung toter Zellen, das Zytokin IL-10 und der Transkriptionsfaktor FoxP3 befinden sich intrazellulär.

Ziel bei der Farbstoffauswahl war es, sechs Farbstoffe zu finden, die Signale in unterschiedlichen Channels des IFC erzeugen. Außerdem mussten die Farbstoffe, die vom gleichen Laser angeregt

wurden bei der identischen Laserleistung ausgeglichene Signalstärken zeigen. Kein Farbstoff sollte die anderen überstrahlen und damit zu großen Beamingfehlern in benachbarten Channels führen.

Etablierung des Färbepanels für regulatorische B-Zellen

Mit dem Wissen über gut funktionierende Färbungen aus Kapitel 2.1.2 wurde zunächst eine Zweierkombination von extrazellulären Farben ausprobiert und anschließend die Anzahl an Färbungen in einer Probe nach und nach gesteigert. Kam es zu starken spektralen Überlappungen, wurden Farbstoffe durch andere ersetzt.

Nachdem die Farbstoffkombination feststand, wurden die Farbstoffmengen bei besonders bei stark ausgeprägten Merkmalen mit hellen Signalen reduziert und bei seltenen Merkmalen mit geringeren Signalstärken die Farbstoffkonzentration bei der Färbung erhöht. Dieser Vorgang wurde so lange durchgeführt, bis ausgeglichene Signale in allen sechs Channels detektierbar waren.

Isotypkontrollen

Zur Erkennung von unspezifischer Eigenfluoreszenz des Antikörpers, zur sicheren Unterscheidung von schwachen Signalen mit Eigenfluoreszenz (<https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-guide-isotype-controls.html>, zuletzt abgerufen am 31.01.22) und zur Bestimmung von Cutoff-Signalintensitäten für die Definition positiver Signale wurden Isotypkontrollen der ausgewählten Farbstoffe durchgeführt. Dafür wurden jeweils Einzelfärbungen mit Farbstoffen und mit der jeweiligen Isotypkontrolle durchgeführt. Letztere stellt einen identischen Fluoreszenzfarbstoff und identischen Antikörperklon, ohne spezifische Bindungsstelle auf der Zelle, dar. Das Histogramm aus der Signalintensität und der Auftrittshäufigkeit eines Farbstoffes und seines Pendanten wurden übereinandergelegt. So konnte das echte vom Eigenfluoreszenzsignal unterschieden und das Positivsignal definiert werden. Eine optische Kontrolle der festgelegten Grenzwerte für positive Signale erfolgte einmalig im IDEAS™. Anschließend wurden die Grenzwerte für alle anderen Proben übernommen.

Probenverarbeitung und Geräteeinstellungen

Nach Etablierung der Färbungen wurden auch die Probenverarbeitung und Geräteeinstellungen für die Aufnahme von regulatorischen B-Zellen angepasst. Dabei wurden der zeitliche Ablauf, die Probenmenge, Objektiv des IFC, Wahl der Stimulations- und Fixiermedien sowie Art des Gatings für das ausgewählte Panel optimiert.

2.2.3 Gatingstrategien

In diesem Kapitel werden alle Gatingsschritte zur Darstellung der Subtypen von regulatorischen B-Zellen gezeigt. Gesucht wurden folgende Subtypen:

- CD19⁺ IL10⁺ FoxP3⁺
- CD19⁺ FoxP3⁺
- CD19⁺ CD27⁺ IL10⁺ FoxP3⁺
- CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺ IL10⁺ FoxP3⁺
- CD19⁺ CD27⁻ IgD⁻ IL10⁺ FoxP3⁺

B-Zellen (CD19-positiv / CD19⁺) wurden in Memory- (CD27-positiv / CD27⁺) sowie Non-Memory- (CD27-negativ / CD27⁻) Zellen eingeteilt. In beiden Gruppen wurden regulatorische (IL-10-positiv / IL-10⁺) Zellen betrachtet. FoxP3, als regulatorischer T-Zellmarker wurde sowohl in allen B-Zellen (CD19⁺), als auch in Bregs (CD19⁺IL-10⁺) Zellen und ihren Untergruppen untersucht.

Regulatorische B-Zellen und FoxP3-Bregs wurden zudem auf ihre Aktivität bzw. Reife der B-Zellstufe (IgD-positiv oder negativ / IgD⁺ oder IgD⁻) untersucht. In Non-Memory-Bregs (CD27-negativen Bregs) wurden besonders unreife/niedrigaktive Zellen (CD19⁺CD27⁻IgD⁻) betrachtet, während bei den Memory-Bregs die reifen/aktivierten Zellen (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) gesondert untersucht wurden. Eine Übersicht bietet Abbildung 14.

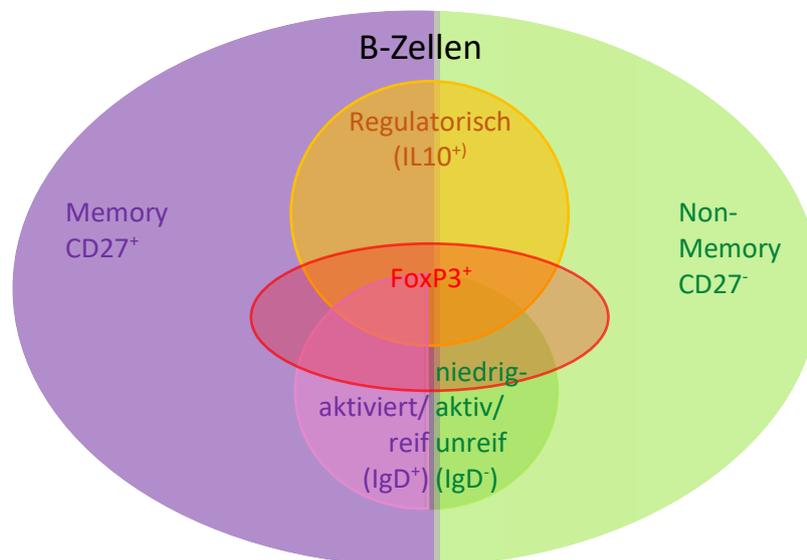


Abbildung 14: Übersicht der gegateten B-Zellen

Abbildung 15 zeigt das Vorgehen beim Gaten. Während des Einlesens ins IFC wurden nur Einzelereignisse (Singlets), die sich im Fokus befanden aufgenommen. Im Anschluss wurde die Datenmenge auf ca. ein Zehntel reduziert. Dafür wurde zunächst eine grobe Auswahl an lebenden B-Zellen in neuen Raw Image Files gespeichert. Dabei wurden toten Zellen, Luftblasen, Granulozyten und CD19-negative Zellen ausgegated. Die verkleinerten *.rif Files bestehend aus vorwiegend B-Zellen

wurden in einem weiteren Schritt erneut, diesmal fein nach Lymphozyten und lebendigen Zellen gegatet. Die Definition der oben genannten Zellreihen erfolgte im Anschluss.

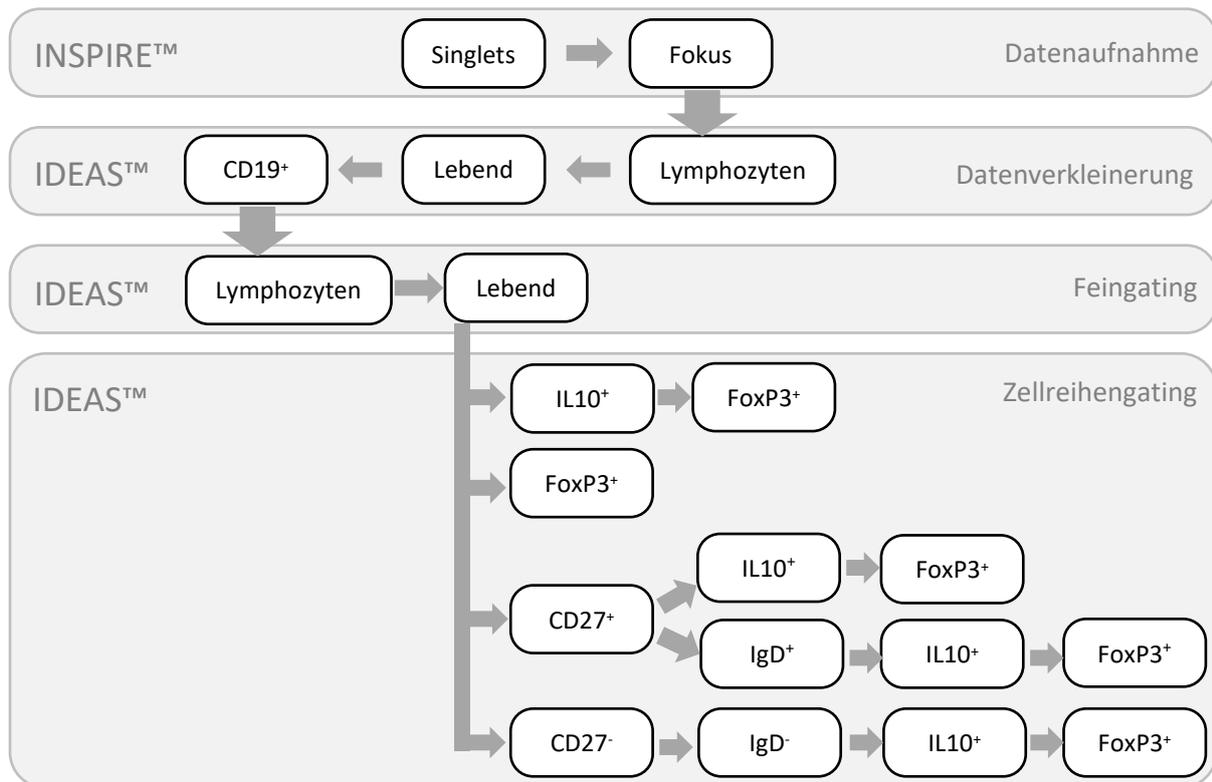


Abbildung 15: Gatingstrategie für Breg-Suche

2.2.3.1 Gating Entscheidungen

Zum Gaten wurden aus den erhobenen Daten Histogramme und Dotplots erstellt, in denen anschließend Populationen ausgewählt werden konnten (entspricht gating). In Histogrammen wurde die betrachtete Eigenschaft der Bilder über die Häufigkeit des Ereignisses aufgetragen und Grenzwerte festgelegt, in denen eine Population als positiv gilt.

In Dotplots wurde über der x-Achse die Eigenschaft Area (Anzahl an Pixeln in μm^2 , korreliert mit der Größe eines Objekts) und über der y-Achse die zu betrachtende Eigenschaft, z.B. die Signalintensität, aufgetragen. Populationen wurden hier umrandet, um als positiv markiert zu werden. Hilfe bei der Unterscheidung von schlecht abgrenzbaren Populationen bot der mittels Isotypkontrollen bestimmte Cutoffwert für positive Signalintensitäten, die Häufigkeitsverteilung (Abbildung 16) der Merkmale sowie die optische Kontrolle der Fluoreszenzbilder in der Bildergalerie der Ereignisse im Grenzbereich.

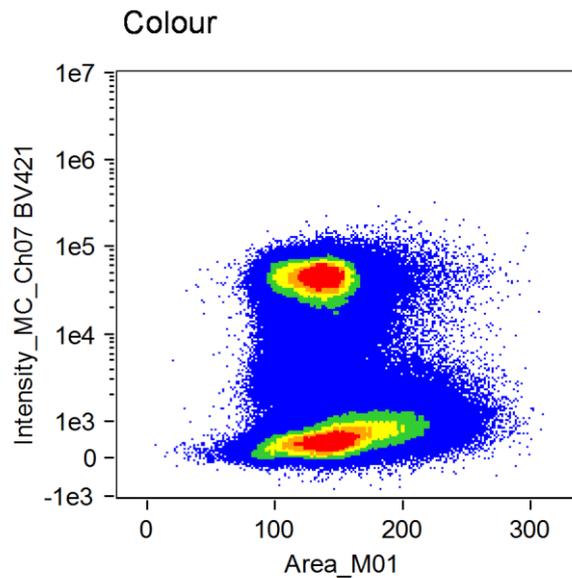


Abbildung 16: Beispiel für Häufigkeitsverteilung von Merkmalen im Dotplot, die Farben markieren die Punktdichte

2.2.3.2 INSPIRE™ Datenaufnahme

Zur Erkennung von Singlets wurde ein Dotplot aus den beiden Eigenschaften Area (Anzahl an Pixeln in μm^2 , korreliert mit der Größe eines Objekts) und Aspect Ratio (Quotient aus längstem Durchmesser und kürzestem Durchmesser der Fläche des Objekts) erzeugt (Abbildung 17). Die Population der Singlets zeichnet sich durch einen Aspect Ratio Wert um 1 aus. Von Zelltrümmern und Luftblasen (Debris) lässt es sich durch einen höheren Area-Wert differenzieren.

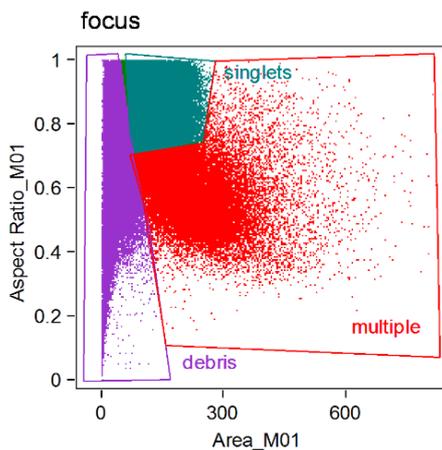


Abbildung 17: Singlegating

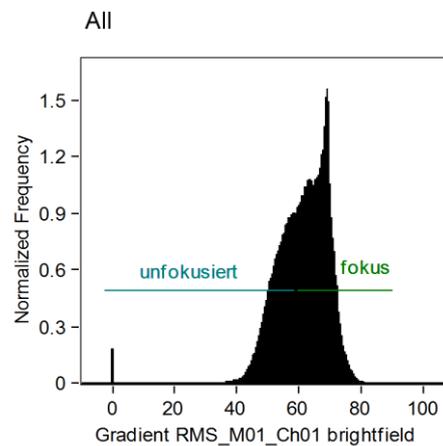


Abbildung 18: Fokusgating

Fokussierte Zellen wurden über Gradient RMS (entspricht Bildschärfe) des Brightfieldchannel in einem Histogramm gegatet (Abbildung 18).

2.2.3.3 IDEAS

2.2.3.3.1 IDEAS™ Datenverkleinerung

Granulozyten und Luftblasen besitzen einem hohen Anteil an schwarzen Bildanteilen im Brightfield-Bild und deswegen niedrige Intensitätswerte in diesem Channel. Sie werden über einen Dotplot mit X-Achse bestehend aus dem Merkmal Area und Y-Achse bestehend aus Brightfield-Intensity (integrierte Signalintensität über das Brightfield-Bild) von Lymphozyten unterschieden (Abbildung 19).

Die gegateten Lymphozyten werden im Dotplot aus Area und Intensity Ch08 (integrierte Signalintensität im Channel 8) dargestellt, um tote von lebendigen Zellen zu unterscheiden. Nur tote Zellen wurden über den Farbstoff Aqua Life/Dead® angefärbt und zeigen intrazelluläre Signale über dem Cutoff Wert im Channel 8 (Abbildung 20).

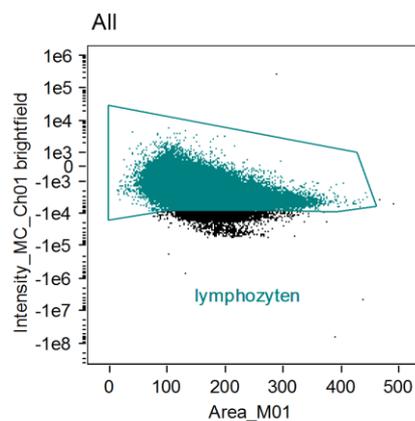


Abbildung 19: Lymphozytengating

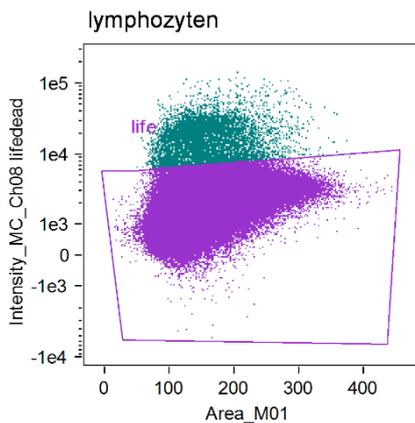


Abbildung 20: Life-Gating

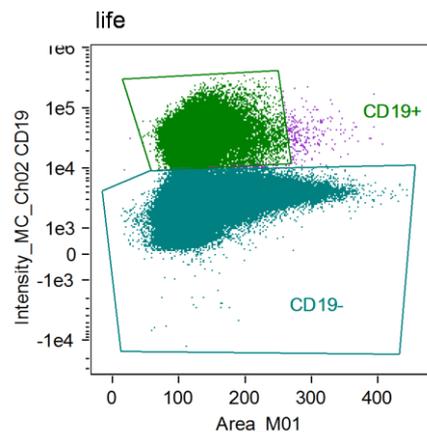


Abbildung 21: B-Zellgating

Zur weiteren Datenreduktion wurden im letzten Schritt CD19⁺ Zellen (B-Zellen) über die Intensity Ch02 aus allen lebendigen Lymphozyten gated (Abbildung 21). Aus den Daten der so gateden lebenden B-Lymphozyten wurden neue *.rif Files erzeugt.

2.2.3.3.2 IDEAS™ Feines Gating

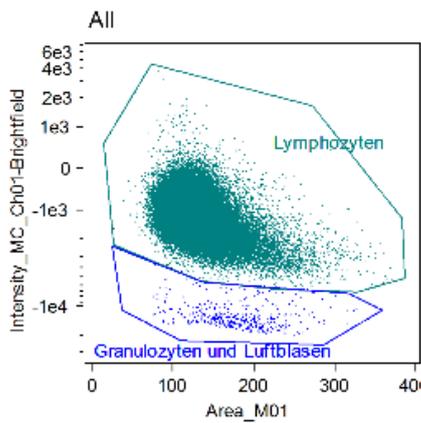


Abbildung 22: feines Lymphozytengating

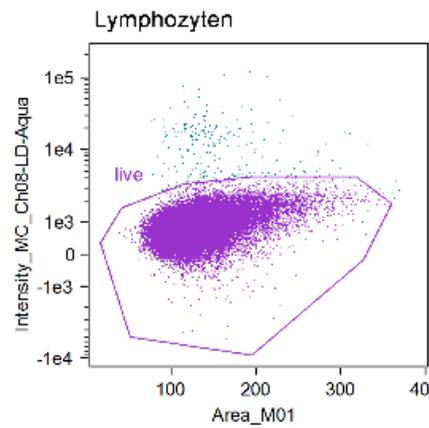


Abbildung 23: feines Life-Gating

Die Schritte zum Lymphozyten- und Life-Gating wurden wiederholt, da nun eine feinere Abgrenzung der Populationen möglich war (Abbildung 22 und Abbildung 23).

2.2.3.3.3 IDEAS™ Zellreihengating

Lebende B-Lymphozyten wurden über die Channelintensität der jeweiligen Färbungen über die Zellgröße (Area) in einem Dotplot dargestellt und gegatet (Abbildung 24 bis Abbildung 35) Es wurden die in Kapitel 2.2.239 bestimmten Cutoff-Werte zur Definition eines positiven Signals verwendet.

CD19⁺IL10⁺FoxP3⁺

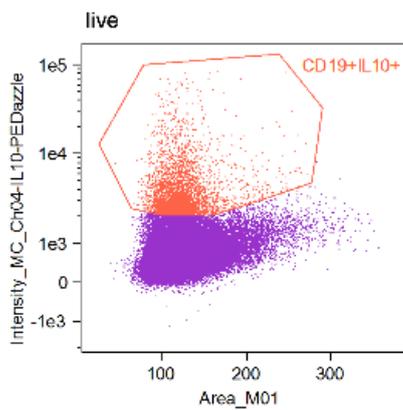


Abbildung 24: IL10+ Gating von CD19+ Zellen

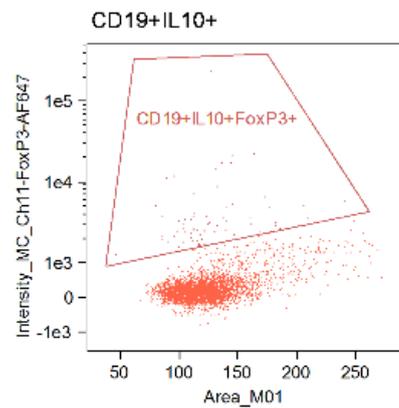


Abbildung 25: FoxP3+ Gating von CD19+IL10+ Zellen

CD19⁺FoxP3⁺

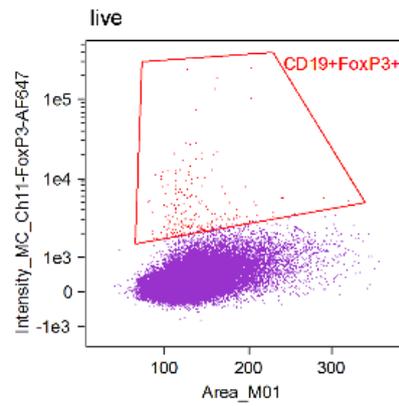


Abbildung 26: FoxP3⁺ Gating von CD19⁺ Zellen

CD19⁺CD27^{+/-}

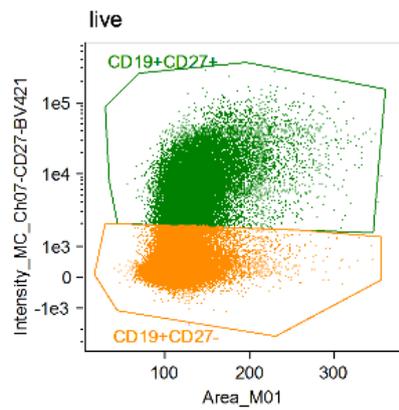


Abbildung 27: CD27^{+/-} Gating von CD19⁺ Zellen

CD19⁺CD27⁺IL10⁺FoxP3⁺

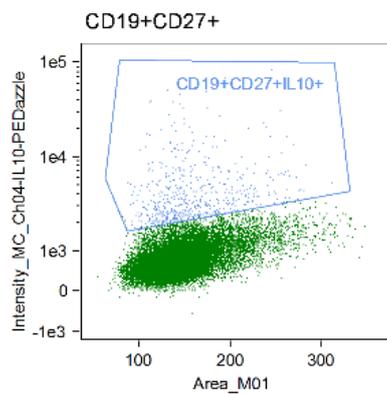


Abbildung 28: IL10⁺ Gating von CD19⁺CD27⁺ Zellen

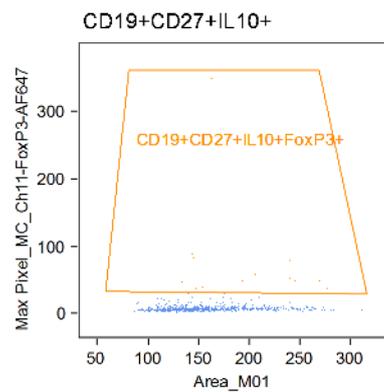


Abbildung 29: FoxP3⁺ Gating von CD19⁺CD27⁺IL10⁺ Zellen

CD19⁺CD27⁺IgD⁺IL10⁺FoxP3⁺

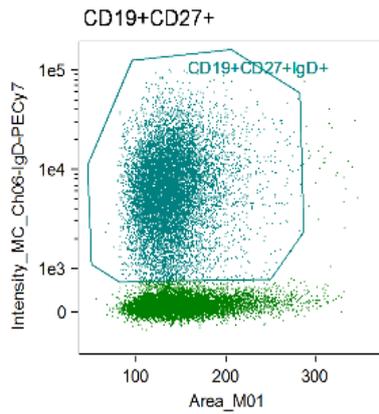


Abbildung 30: IgD⁺ Gating von CD19⁺CD27⁺ Zellen

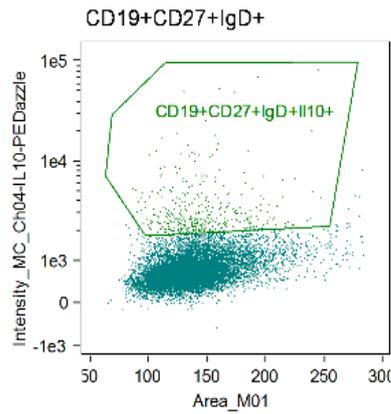


Abbildung 31: IL10⁺ Gating von CD19⁺CD27⁺IgD⁺ Zellen

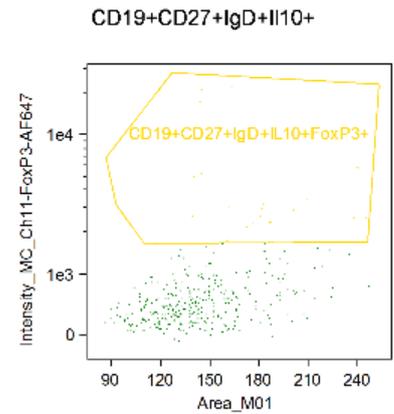


Abbildung 32: FoxP3⁺ Gating von CD19⁺CD27⁺IgD⁺IL10⁺ Zellen

CD19⁺CD27⁻IgD⁻IL10⁺FoxP3⁺

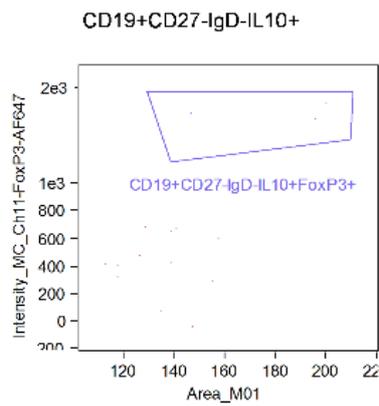


Abbildung 33: IgD⁻ Gating von CD19⁺CD27⁻ Zellen

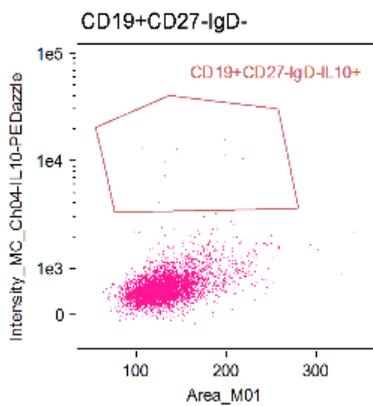


Abbildung 34: IL10⁺ Gating von CD19⁺CD27⁻IgD⁻ Zellen

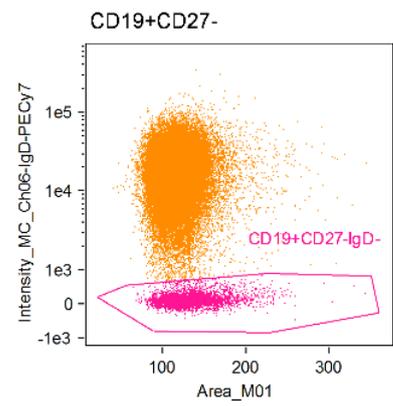


Abbildung 35: FoxP3⁺ Gating von CD19⁺CD27⁻IgD⁻IL10⁺ Zellen

3 ERGEBNISSE

3.1 PROTOKOLLETABLIERUNG FÜR DIE NUTZUNG DES IMAGING FLOW CYTOMETER

Vergleich zweier PBMC-Separationsmethoden

Der Vergleich der PBMC-Ausbeute zwischen Experimenten mit Ficoll- und CPT- Separation (Abbildung 36) wurde auf Grund der fehlenden Normalverteilung der Werte mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht (DATAtab Team (2022). DATAtab: Online Statistics Calculator. DATAtab e.U. Graz, Austria. URL <https://datatab.net>, zuletzt geöffnet am 24.11.22). Die Nullhypothese „Es besteht kein Unterschied in der Rangfolgesumme der PBMC-Ausbeute pro Milliliter Vollblut zwischen Ficoll und CPT-Methode“ konnte bei einem z-Wert von 0,78, einem p-Wert von 0,43 und vorher festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 nicht verworfen werden.

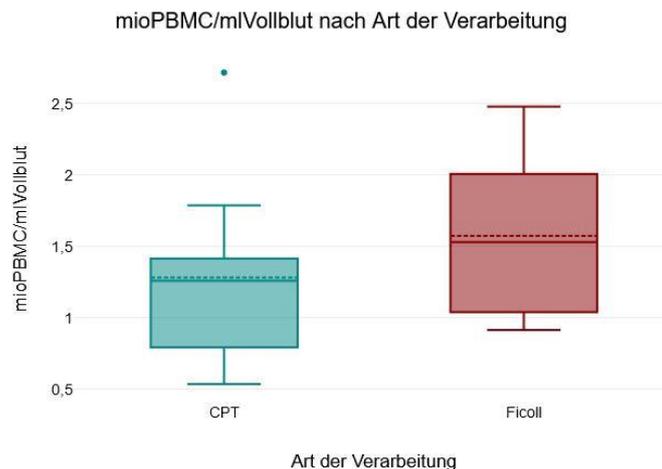


Abbildung 36: Vergleich der Ausbeute von PBMC nach Zellseparation mittels CPT- oder Ficoll-Methode, p-Wert 0,43 bei Signifikanzniveau von 0,05 und unterschiedlichen Probanden

Es konnten subjektiv weder hinsichtlich Ausbeute, Reinheit oder Lebensfähigkeit der PBMC Proben Unterschiede zwischen der manuellen Ficoll-Schichtung und den CPT-Tubes festgestellt werden. Das entspricht Ergebnissen von (Corkum et al., 2015). Wie die Autoren ebenfalls beschreiben, ist die CPT Methode jedoch mit geringerem Arbeitsaufwand, schnellerer und einfacherer Zellverarbeitung verbunden. Deshalb wurden in der im Kapitel 2.2 beschriebenen Studie nur noch CPT-Tubes verwendet.

Etablierung extrazellulärer Färbungen

BV421, PE, PE-Cy7 und FITC-viobright zeigten ausreichend detektierbare, glaubhafte und reproduzierbare extrazelluläre Signale (z.B. Abbildung 37).

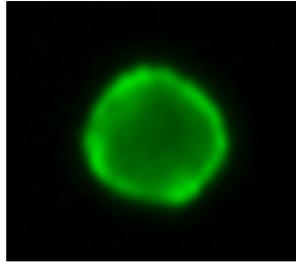


Abbildung 37: Beispiel für gelungene extrazelluläre Färbung mit FITC-viobright

Mit APC-Cy7 und BV605 konnten, im Vergleich zu den vorher genannten Farben, schwächere Fluoreszenzsignale aufgenommen werden. Dafür waren maximale Laserstärken notwendig. AF488, BV711 und PerCP-Cy5.5 zeigten im Vergleich zu den anderen Farbstoffen nicht reproduzierbare oder nicht auswertbare extrazelluläre Färbesignale.

Markierung apoptotischer Zellen

DAPI und ZombieRed™ führte bei Verwendung des Herstellerprotokolls zu sehr starken Signalen, so dass die Laser bei minimaler Intensität verwendet wurden. Sie erzeugten viel Signalstreuung in andere Kanäle. Versuche in geringerer Färbekonzentration wurden nicht wiederholt. DAPI führte im einmaligen Versuch zu insgesamt mehr Zerstörung vorher vitaler Zellen. Mit dem Fixable Viability Stain 520 konnten keine glaubhaften Ergebnisse erzielt werden. Aqua Live/Dead® zeigte die reproduzierbarsten Ergebnisse bei mittleren bis hohen Laserstärken mit nur wenig Beaming in einen Nachbarkanäle.

Etablierung intrazellulärer Färbungen

APC und PE zeigten glaubhafte intrazelluläre Signale, die aber im Verhältnis zu den anderen Fluorophoren für die gleichen Merkmale deutlich schwächer ausgeprägt waren. AF647, PE-Dazzle und PE-CF594 zeigten stärkere und reproduzierbare Signale. Beim Konjugatfarbstoff BV786 wurden helle und glaubhafte Fluoreszenzsignale aufgenommen. Wurden die Proben jedoch nach dem Färben erst mit Zeitverzögerung analysiert, zerfiel der Farbstoff in seine beiden Komponenten und zeigte Signale in den beiden Channel, in denen seine zwei Komponenten Fluoreszenzsignale abgeben.

Mehrfarbige Panels

Es konnten maximal sechs Fluorophore gleichzeitig genutzt werden, weil sonst die echten Signale nicht mehr gut genug vom Strahlen der anderen Farbstoffe in benachbarte Channels unterschieden werden konnten. Das heißt die Kompensation war bei mehr als sechs Farbstoffen nicht sauber durchführbar.

Die Intensität eines Signals war über mehrere Versuche stärker, wenn am Tag der Färbung auch das Einlesen in das IFC stattfand. Dies bestätigt auch die Arbeit von (Markey & Gartlan, 2019). Eine genaue Quantifizierung der Signalstärkenunterschiede erfolgte jedoch in dieser Arbeit nicht.

Testung unterschiedlicher Fixiermethoden

Bei allen Fixiermethoden änderte sich die Qualität der extrazellulären Färbungen im Vergleich zu unfixierten Proben. Meist zeigte sich ein optisch bereits im Einleseprogramm erkennbar abgeschwächtes Signal nach Fixierung. Mit Methanol und PFA wurden keine einheitlichen Ergebnisse erzielt und die Farbsignale wurden jeweils unterschiedlich abgeschwächt. So war z.B. das Fluoreszenzsignal von BV421 fast genauso intensiv, wie von unfixierten Zellen, jedoch das Signal von PE-gefärbten Zellen kaum mehr erfassbar. Durch Fixierung mit PFA starb ein Teil der Zellen und in der Auswertung wurden mehr Zelltrümmer als bei allen anderen Methoden aufgenommen. Die Fixierkits von BD und eBiosciences lieferten, für jede Farbe gleich und nur leicht abgeschwächte Signale. Es trat keine Zellyse ein und die Färbungen wurden durch sie zuverlässig erfolgreich durchgeführt.

Erythrolyse zur Verringerung des Debris

Die Erythrozytolyse konnte erfolgreich den Debris verringern und führte zu einer erleichterten Definition der Leukozytenpopulation in INSPIRE®, der Aufnahmesoftware des ImageStream Mk. II.

Vergleich von Färbungen seltener Signale bei stimulierten mit unstimulierten Proben

Beide Proben, die mit Medium stimuliert wurden, zeigten vergleichbar hellere Signale zu den unstimulierten Proben. Beide Mediumsproben zeigten im Plot besser abgrenzbare Populationen für intrazelluläre Signale und in Fluoreszenzaufnahmen realistischere Verteilungsmuster der intrazellulären Signale. Botenstoffe waren intrazellulär mit Kernaussparung und Transkriptionsfaktoren intranuklear lokalisiert. Zwischen den mit FCS und humanem Serum stimulierten Proben waren optisch im Einzelversuch keine Unterschiede erkennbar.

Bestimmung der idealen Probenkonzentration beim Einlesen in das IFC

Je geringer die Konzentration und je höher des Flüssigkeitsvolumen beim Einlesen, umso länger dauerte das Einlesen einer Probe. Bei größeren Volumina lagerte sich ein Großteil der Zellen am Boden des Gefäßes ab und wurden nicht in das Gerät eingesogen. Es wurde eine Konzentration von ca. 3 mio Zellen/50 µl bei einer Flüssigkeitsmenge von 50-250µl als optimal ermittelt. Im letzten Schritt bewährte sich zudem die Filtration der Zellsuspension durch einen 30 µm Filter und das Vortexen der Probe kurz vor Einlesen.

Zusammenfassend ergibt sich für die Nutzung des IFC Folgendes:

- Panel von maximal sechs Farben, beste Signale bei Färben und Einlesen am selben Tag
- für extrazelluläre Färbungen: BV421, PE-Cy7 und FITC-viobright
- für apoptotische Zellen: Aqua Live/Dead
- für intrazelluläre Färbungen: AF647, PE-Dazzle und PE-CF594, Verstärkung von Signalen bei vorheriger Stimulation in Serum (human/FCS)
- bei Blutproben zusätzliche Erythrozytolyse

Daraus wurde das in Kapitel 3.2 beschriebene Panel etabliert.

3.2 STUDIE ZUR DARSTELLUNG VON BREGS IN PERIPHERVENÖSEM BLUT MITTELS IFC

Etablierung des Färbepanels für regulatorische B-Zellen

Folgende Kombination an Farbstoffen wurde ausgewählt:

Beobachtungskanal	Farbstoff	Merkmal
Channel 1&9		Brightfield Bilder
Channel 2	viobright-FITC	CD19
Channel 4	PE-Dazzle	IL10
Channel 6	PE-Cy7	IgD
Channel 7	BV421	CD27
Channel 8	Aqua	Life/Dead
Channel 11	AF647	FoxP3

Tabelle 3: Färbepanel in dieser Arbeit

Die Farbstofftabelle im Anhang (Tabelle 6) zeigt die ausgewählten Farbstoffkonzentrationen.

Isotypkontrollen

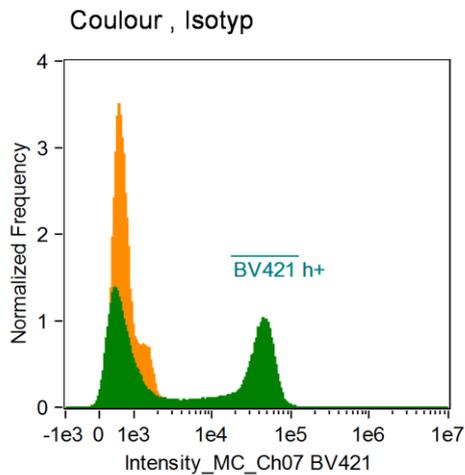


Abbildung 38: Isotypkontrolle eines extrazellulären Merkmals

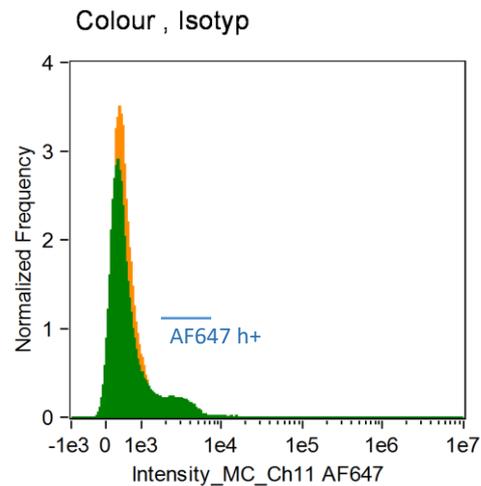


Abbildung 39: Isotypkontrolle eines intrazellulären Merkmals

In den zwei Histogrammen (Abbildung 38 und Abbildung 39) stellt die orangene Kurve die Signalintensität der Isotypkontrolle und die grüne Kurve die Signalintensitäten des dazugehörigen Farbstoffes dar. Die Y-Achse quantifiziert die Signalintensität als „Normalized Frequency“, mit der Einheit „Zyklen pro Probe“ (engl. cycles per sample), die aus dem Quotienten der Frequenzen „Zyklen pro Sekunde“ und „Proben pro Sekunde“ berechnet wird (Carlson, 1992). Der erste Gipfel beschreibt die unspezifische Fluoreszenz des Farbstoffes und ist bei Farbstoff und Kontrolle an gleicher Stelle zu finden. Der zweite Gipfel der grünen Kurve beschreibt die Signalintensität durch spezifische Bindung. Der als positives Fluoreszenzsignal bewertete Bereich wurde manuell ausgewählt und mit der blauen Linie markiert. Die Kurven aller anderen verwendeten Fluoreszenzfarben befinden sich im Anhang (Abbildung 70, Abbildung 71, Abbildung 72).

Für die Anfärbung von toten Zellen mittels Aqua Life/Dead® existierte zur Zeit dieser Arbeit keine Isotypkontrolle. Im Intensitätshistogramm lässt sich das positive Signal deutlich vom negativen unterscheiden. Die Validierung der Färbung erfolgte, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, über Kontrollfärbungen mit abgetöteten Zellen.

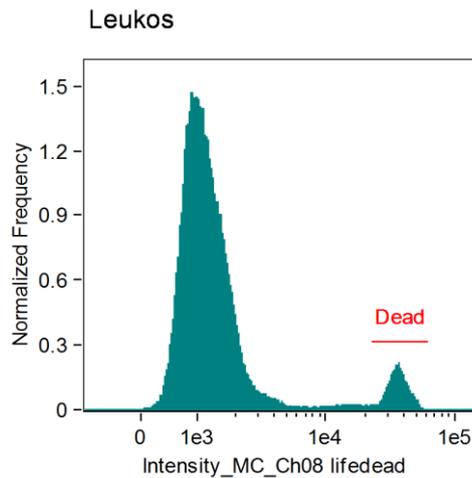


Abbildung 40: Intensitätshistogramm der Aqua Life/Dead® Färbung

Probenverarbeitung und Geräteeinstellungen

Aus zeitlichen Gründen wurden alle Schritte von der Probenentnahme bis zum Einlesen innerhalb von zwei Tagen durchgeführt. Die extrazellulären Färbungen erzeugten dadurch geringfügig schwächere Signale. Die Signale blieben auswertbar.

Die Anzahl der einlesbaren Objekte ist gerätebedingt auf eine Million begrenzt, weshalb von der eingelesenen PBMC-Probe nur fokussierte Einzelzellen (Singlets) aufgenommen wurden. Als Probenmaterial wurde dafür eine Menge von 32ml Blut pro Proband ermittelt. In der Zellzählung ergab dies eine Menge an PBMC zwischen 21 und 58 Millionen und bei einem B-Zellanteil von minimal 5,7 Prozent eine Mindestmenge an 57.000 analysierbaren B-Zellen pro Probe.

Zur Aufnahme der B-Zellen wurde das 40x Objektiv verwendet. Es stellt einen Kompromiss zwischen ausreichend hoher Auflösung und zeitlich begrenzter Einlesedauer dar. Bei diesem Objektiv beträgt die numerische Apertur 0,75. Jeder Pixel entspricht bei Nutzung des 40x Objektivs einem Quadrat mit einer Seitenlänge von 0,5 µm.

Zur Stimulation von B-Zellen eignete sich besonders die Inkubation im Medium mit humanem Serum. Es zeigte die stärkeren und glaubhafteren Färbesignale und führte zur besseren Identifizierung von regulatorischen B-Zellen.

Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen für intrazelluläre Färbungen wurden auf Grund von Ergebnissen aus Kapitel 2.1.4 die Kits von BD und eBiosciences zum Vergleich ausgewählt. Beide lieferten gute Färbeergebnisse. Das FoxP3 Transcriptionfactor Staining Kit von eBiosciences zeigte für die intrazellulären Färbungen geringfügig stärkere Signale und wurde deshalb für die Studie ausgewählt.

Bei der Analyse im IDEAS™ wurde das Gating manuell anhand von automatisch bereitgestellten Features durchgeführt. In vor dieser Arbeit publizierten Studien zeigte sich, dass bis zu diesem

Zeitpunkt durch Deep Machine Learning kein besseres Auswertungsergebnis als bei manueller eingestellten Features erreicht wird (Lippeveld et al., 2019).

Studienziele

Bezogen auf die in Kapitel 2.2 definierten Studienziele konnte ein Imaging Flow Cytometer erfolgreich zur Darstellung und zum Nachweis seltener Zelltypen angewendet werden. Eine morphologische Betrachtung kann mit der quantitativen Auswertung kombiniert werden.

IL-10-positive Bregs, Memory-Bregs, sowie ihr Aktivitätsmarker IgD wurden in allen Blutproben glaubhaft nachgewiesen und zur Darstellung gebracht. Transkriptionsfaktor FoxP3 wurde bei jedem Patienten in einem Teil der B-Zellen nachgewiesen sowie in einigen Bregs. Die Rohdaten der Studie sind in Tabelle 9 im Anhang einsehbar. In Folgendem sind die Fluoreszenzsignale der untersuchten Merkmale (Abbildung 41) und im Anschluss (Abbildung 42 - Abbildung 53) die Beispiele von Zellbildern untersuchter Zelltypen abgebildet. Dort ist je ein Brightfield-Bild, die Fluoreszenzaufnahmen derselben Zelle sowie ein overlay-Bild der Fluoreszenzaufnahmen zu sehen.

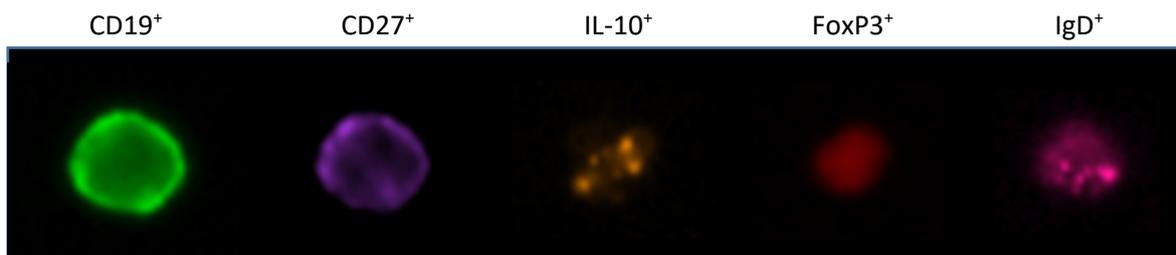


Abbildung 41: Beispiele für Fluoreszenzsignale von untersuchten Merkmalen CD19 (grün), CD27 (violett), IL-10 (orange), FoxP3 (rot), IgD (magenta)

Die Oberflächenmerkmale CD19 und CD27 ließen sich membranständig und gleichmäßig über die Zelle verteilt darstellen. Das membranständige Immunglobulin IgD sowie das intrazellulär aufzufindende Zytokin IL-10 waren im Fluoreszenzbild stets inhomogen über die Zelle verteilt.

Der Transkriptionsmarker FoxP3 konnte intrazellulär dargestellt und in Überlagerung mit dem Durchlichtmikroskopiebild dem Zellkern zugeordnet werden.

Memory vs. Non-Memory-B-Zellen



Abbildung 42: Memory-B-Zelle (CD19⁺CD27⁺, grün und violett)



Abbildung 43: Non-Memory-B-Zelle (CD19⁺CD27⁻, grün und kein violett)



Abbildung 44: reife/aktivierte Memory-B-Zelle (CD19⁺CD27⁺IgD⁺, grün, violett und magenta)



Abbildung 45: unreife/niedrigaktive Non-Memory-B-Zelle (CD19⁺CD27⁻IgD⁻, grün ohne violett und magenta)

Bilder regulatorischer B-Zellen



Abbildung 46: IL-10-positive regulatorische B-Zelle (CD19⁺IL-10⁺, grün und orange)



Abbildung 47: IL-10-positive Memory-Breg (CD19⁺CD27⁺IL-10⁺, grün, violett und orange)



Abbildung 48: IL-10-positive aktivierte Memory-Breg ($CD19^+CD27^+IgD^+IL-10^+$, grün, violett, magenta und orange)



Abbildung 49: IL-10-positive niedrigaktive Non-Memory-Breg ($CD19^+CD27^-IgD^-IL-10^+$, grün und orange ohne violett und magenta)

Bilder FoxP3-positiver Breg



Abbildung 50: FoxP3-positive B-Zelle ($CD19^+FoxP3^+$, grün und rot)



Abbildung 51: FoxP3-positive Breg ($CD19^+IL10^+FoxP3^+$, grün, orange und rot)

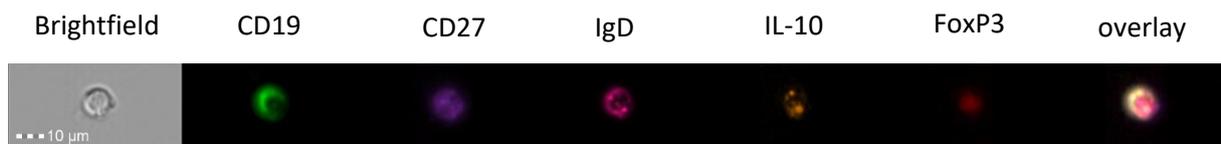


Abbildung 52: FoxP3-positive aktivierte Memory-Breg ($CD19^+CD27^+IgD^+IL-10^+FoxP3^+$, grün, violett, magenta, orange und rot)



Abbildung 53: FoxP3-positive niedrigaktive Non-Memory-Breg ($CD19^+CD27^-IgD^-IL-10^+FoxP3^+$, grün, orange und rot ohne violett und magenta)

Probandengruppe	HC	AR	AR+AIT
Einzelwerte	72083	136439	97889
	4801	62540	74658
	83251	57170	
	56644		
Mittelwert	54195	85383	86274
Standardfehler	17344	25575	11617

Tabelle 4: Bezugswerte B-Zellen: absolute Anzahl der aufgenommenen B-Zellen pro Proband, nach Probandengruppe sortiert

In Folgendem wird die quantitative Auswertung der Daten mit Hilfe von Grafiken gezeigt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert über die Probandengruppe, sowie meist die Standardabweichung. Die Anzahl an B-Zellen pro Proband für Gesunde (Healthy Control, HC), Probanden mit Allergischer Rhinitis (AR) und Allergischer Rhinitis mit spezifischer Allergenimmunotherapie (AR+AIT) sind in Tabelle 4 aufgelistet und Abbildung 54 dargestellt.

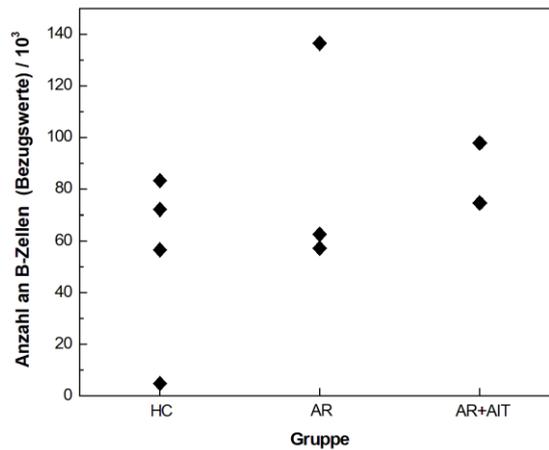


Abbildung 54: Anzahl an B-Zellen pro 1000 jedes Probanden, entsprechend den Bezugswerte aus Tabelle 4, nach Probandengruppe sortiert

Der durchschnittliche Anteil von Memory-Zellen an B-Zellen betrug in allen Gruppen zwischen 40-50 % (Abbildung 55 und Abbildung 56). Bei geringfügig kleinerem Memory-Zellanteil in der Gruppe der gesunden Probanden ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektieren.

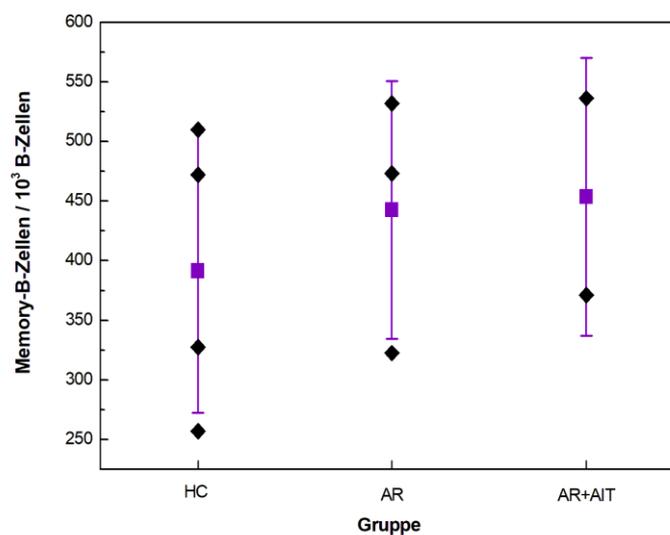


Abbildung 55: Anteil der Memory-Zellen pro 1000 B-Zellen, schwarze Rauten: Einzelwerte, violett: Mittelwert und Standardabweichung einer Probandengruppe

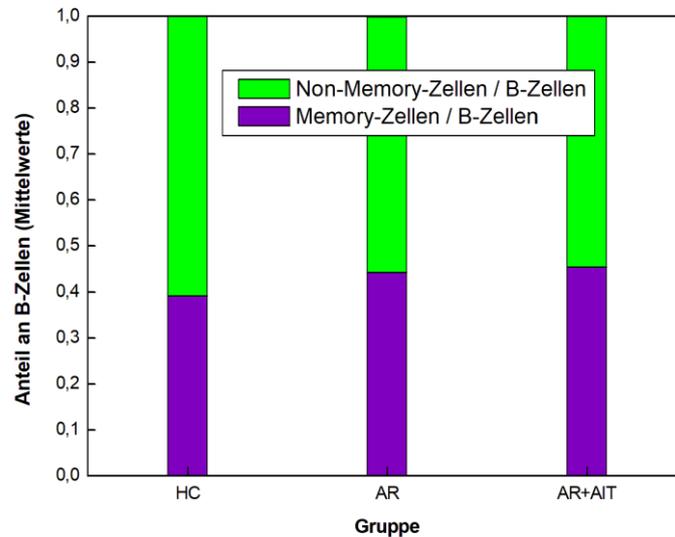


Abbildung 56: Anteile an Memory- und Non-Memory-Zellen an allen B-Zellen

B-Zellen ließen sich zusätzlich in IgD-positive und negative Zellen einteilen (Abbildung 57). Über alle Probanden war unter den Non-Memory-Zellen der Anteil an unreifen Vorstufen weniger als 10%. Während von den Memory-B-Zellen zwischen 30-50% kein IgD auf der Oberfläche präsentierten. Im Durchschnitt zeigten AIT-behandelte Probanden den größten Anteil an IgD-positiven Memory-Zellen.

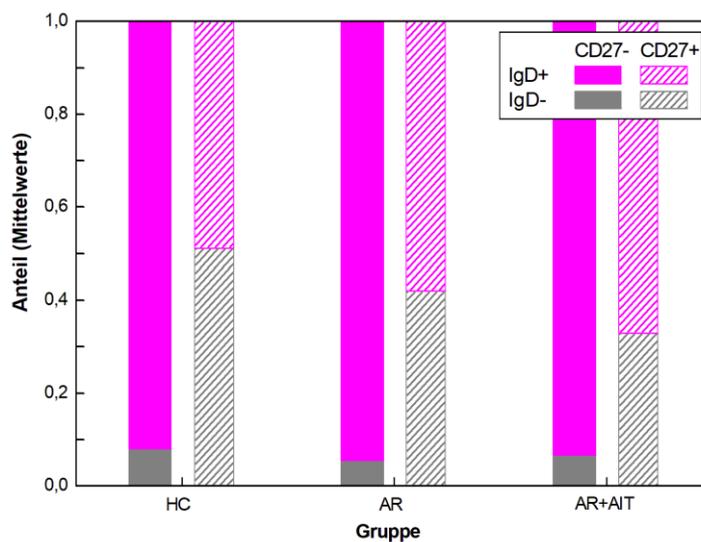


Abbildung 57: Anteil an IgD-positiven und negativen Zellen in Memory und Non-Memory-Zellen

Über alle Gruppen stellten die IL-10-positiven regulatorischen Zellen (Bregs) einen durchschnittlichen Anteil von 4,5-5-5% an allen B-Zellen dar (Abbildung 58). Zwischen den Gruppen zeigte sich kein Unterschied im Anteil der Bregs.

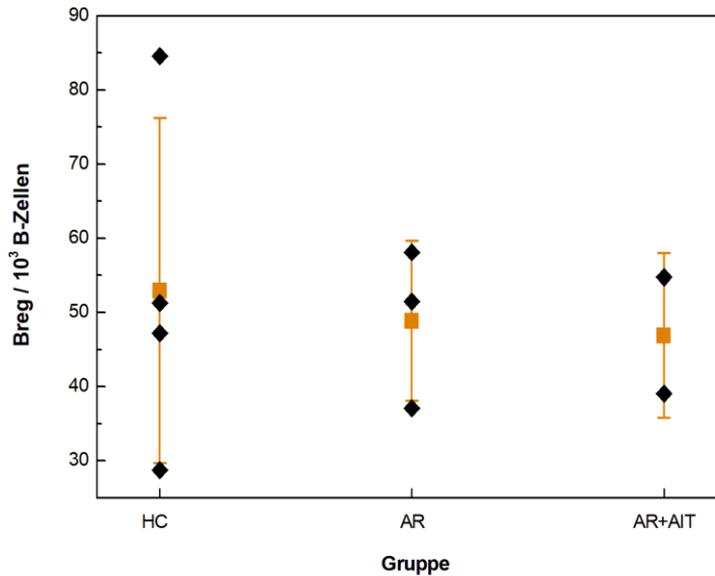


Abbildung 58: Anteil von IL-10-Bregs pro 1000 B-Zellen, schwarze Rauten: Einzelwerte, orange: Mittelwert und Standardabweichung innerhalb einer Probandengruppe

IL-10-Bregs waren in allen untersuchten Untergruppen der B-Zellen nachweisbar (Abbildung 59). In Memory-B-Zellen betrug ihr Anteil durchschnittlich 3-4%. In IgD-positiven Memory-B-Zellen betrug ihr Anteil 3,5-6%. In IgD-negativen Non-Memory-Zellen betrug der Bregs-Anteil in allen Gruppen weniger als 1%. In allen Gruppen lag der durchschnittliche Anteil an Bregs in Memory-Zellen unter dem Anteil der Bregs in allen B-Zellen.

Der Breg-Anteil in IgD-positiven Memory war stets höher als der in Memory-B-Zellen. Alle oben genannten Ergebnisse zeigen eine Tendenz, jedoch auf Grund der niedrigen Sample-Anzahl keine Signifikanz. Lediglich der Anteil an Bregs in unreifen Non-Memory-Zellen hebt sich deutlich von allen anderen gemessenen Breg-Anteilen ab.

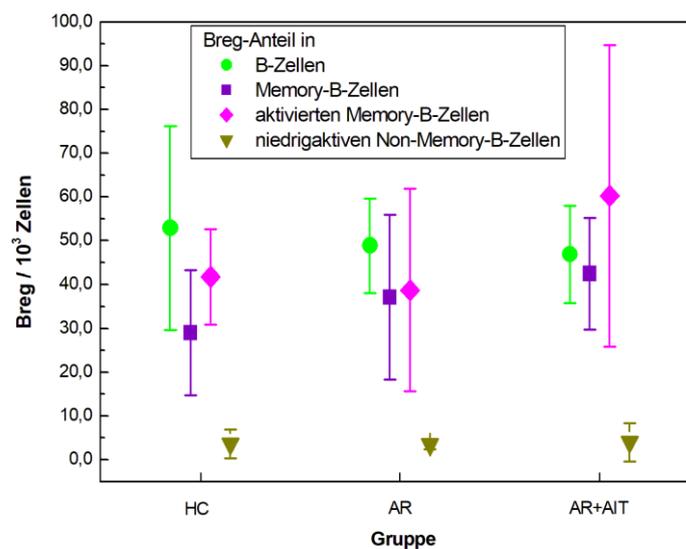


Abbildung 59: Breg-Anteil in unterschiedlichen B-Zell-Gruppen, mit Mittelwert und Standardabweichung

IL-10-positive regulatorische B-Zellen können den vier oben genannten Gruppen an B-Zellen mit den zwei unterschiedlichen Merkmalen zugeordnet werden: Memory/Non-Memory-Zellen (CD27^{+/−}) und IgD^{+/−} (Abbildung 60 bis Abbildung 62). Dabei gehören über allen Probandengruppen Bregs zu mehr als der Hälfte zu den reifen Non-Memory-B-Zellen (CD27[−]IgD⁺) bzw. waren aktivierte Non-Memory-Bregs. Der zweitgrößte Anteil bestand aus aktivierten Memory-Bregs. Bis zu 10% der IL-10-Bregs gehörten zur Gruppe der niedrigaktiven Memory-Bregs.

Unter einem Prozent der Bregs gehörten zu unreifen B-Zellen bzw. waren niedrigaktive Non-Memory-Bregs. Insgesamt entsprechen die Verteilungen in der Gruppen in Bregs ungefähr denen in B-Zellen (Abbildung 56).

Abbildung 60 - Abbildung 62 zeigen, dass der Anteil an aktivierten Non-Memory-Zellen zugunsten der aktivierten Memory-Zellen bei Allergikern im Vergleich zu gesunden Probanden abnahm. In der Gruppe der Probanden mit allergischer Rhinitis war mit 10% der Anteil an niedrigaktiven Memory-Bregs am höchsten, während er in der immuntherapierten Gruppe mit 2,3% Abstand am niedrigsten war.

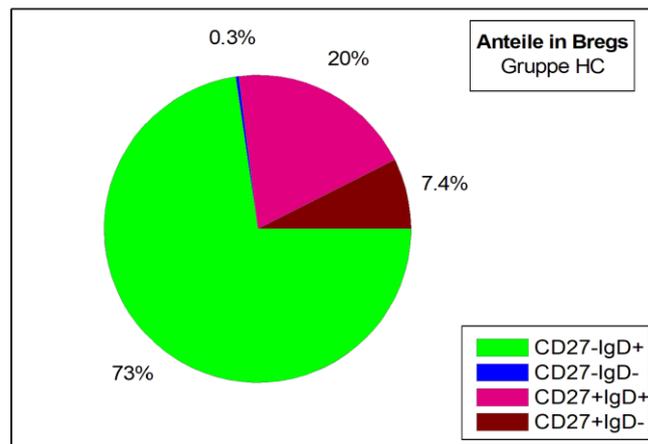


Abbildung 60: Anteile Breg in Gruppe HC, Mittelwerte

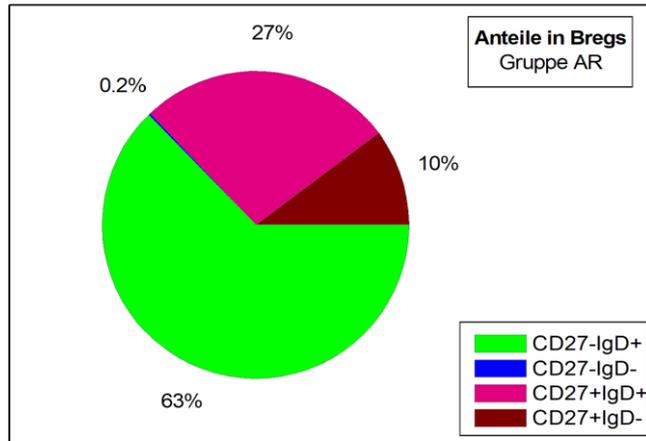


Abbildung 61: Anteile in Bregs in Gruppe AR, Mittelwerte

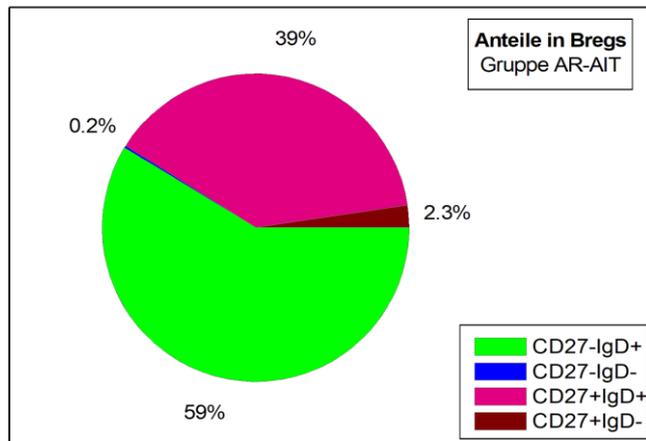


Abbildung 62: Anteile in Bregs in Gruppe AR+AIT, Mittelwerte

Der Treg-Marker FoxP3 ließ sich in B-Zellen aller Probanden nachweisen (Abbildung 63). Der Anteil an FoxP3-positiven B-Zellen betrug über alle Gruppen durchschnittlich 0,06-0,14%. Zwischen den Gruppen ließen sich keine relevanten Unterschiede feststellen.

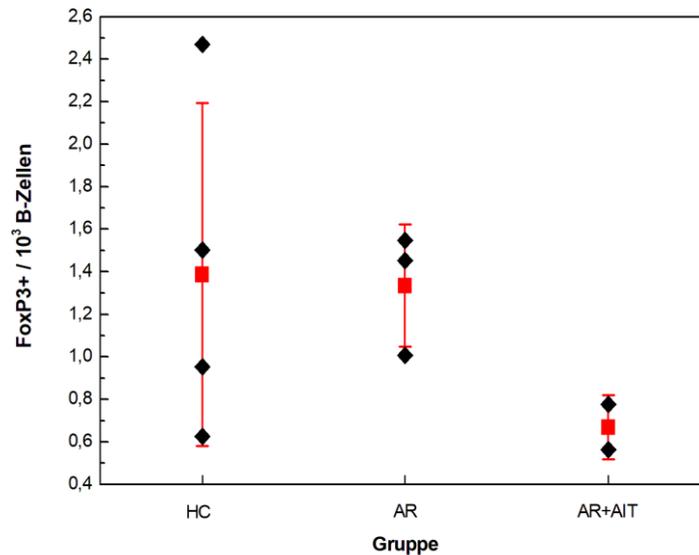


Abbildung 63: Anteil von FoxP3+ an 1000 B-Zellen, schwarze Rauten: Einzelwerte, rot: Mittelwert mit Standardabweichung einer Probandengruppe

In Abbildung 64 sind die Anteile von FoxP3-positiven Zellen an den unterschiedlichen Breg-Subtypen dargestellt. Durchschnittlich lag der Anteil an FoxP3-Zellen an Bregs bei ca. 2% in allen Gruppen. FoxP3 ließ sich in Memory-Bregs zu weniger als einem Prozent nachweisen. Der Anteil in IgD⁺Memory-Bregs lag in allen Probandengruppen bei ungefähr drei Prozent. In unreifen/niedrigaktiven Non-Memory-Breg konnte weder in den Gesunden, noch in den AIT-behandelten Allergikern FoxP3 nachgewiesen werden. Jedoch stellten die FoxP3-positiven Zellen in der Gruppe der Allergiker ohne AIT ca. 25% aller IgD-negativen-Non-Memory-Breg dar.

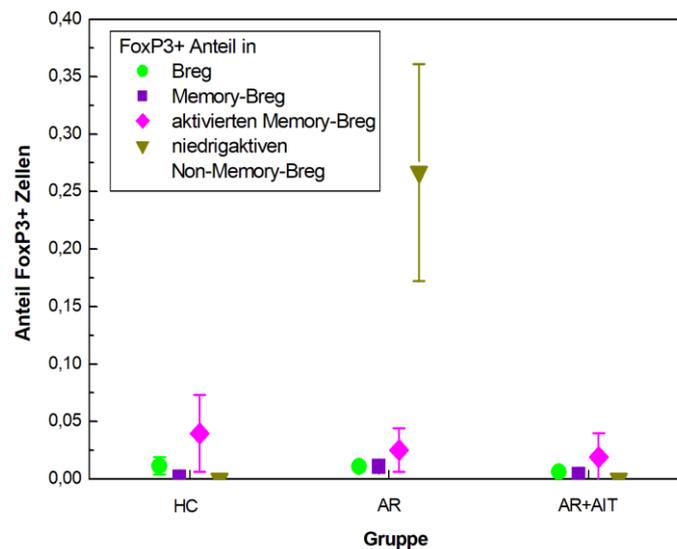


Abbildung 64: FoxP3⁺ Anteil an Zellen in unterschiedlichen Breg-Subtypen

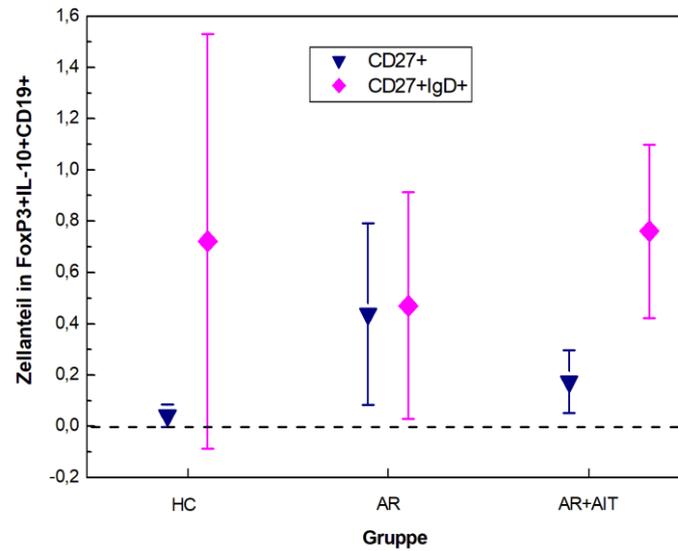


Abbildung 65: Anteil von CD27⁺ und CD27⁺IgD⁺ an FoxP3⁺IL-10⁺ Bregs

Abbildung 65 zeigt den Anteil der CD27⁺ und CD27⁺IgD⁺ Zellen an den FoxP3⁺IL-10⁺Bregs. Aus den Mittelwerten lässt sich die Tendenz hoher Memory-Breg-Anteile bei Gesunden und AIT-therapierten Patienten erkennen. Wohingegen sich die IgD⁺ Memory-Bregs invers dazu verhalten scheinen. Die Daten sind jedoch wenig verlässlich, da wegen der geringen Probandenzahlen die Standardabweichung gleich groß, wie der berechnete Mittelwert ist.

4 DISKUSSION

4.1 VOR- UND NACHTEILE VON IFC

Im ersten Abschnitt sollen nun die technischen Eigenschaften des ICF diskutiert werden, während im zweiten weiter auf die Vor- und Nachteile der Gerätebedienung eingegangen wird.

4.1.1 Technische Eigenschaften

Bereits 2010 beschrieben *Kim et al.* die Vorteile der Vorstufe des Image Flow Cytometers. Entgegen dem konventionellen FC war es möglich auch morphologische Aussagen über Zellen zu treffen. Das Image Cytometer, auch IC, war damals in Forscherkreisen eine noch eher unbekannte Methode der Zelluntersuchung. Es bestand aus einer Zählkammer in der sich die Zellsuspension mit den gefärbten Zellen befand. Eine geringe Zählkammertiefe und eine große Verdünnung der Suspension sorgten dafür, dass Zellen nicht übereinander lagen. Mit Hilfe einer CCD Kamera, verschiedenen Anregungslasern, Optik, Detektoren und einer Auswertungssoftware konnte in 1-3 Minuten mehrere tausend Zellen gezählt und erste morphologische Aussagen getroffen werden. Bis 2010 war es nur möglich, lebende von apoptotischen Zellen zu unterscheiden und einige wenige zusätzliche Fluoreszenzmarkierungen hinzuzufügen. *Kim et al.* beschrieben das IC als die perfekte Lösung für die eingeschränkte Nutzbarkeit von Durchflusszytometern und Fluoreszenzmikroskopen. Es konnte in kurzer Zeit automatisiert Zellen mit bestimmten morphologischen Eigenschaften zählen und aufnehmen. Zudem konnten auch adhärente Zellen untersucht und sowohl mit Markern Zellstrukturen lokalisiert, als auch DNA quantifiziert werden. Image Cytometer integrierten bereits quantitative und qualitative Information über eine Zelle. (J. S. Kim, Hur, Hwang, Chung, & Chang, 2010)

Das IFC als großer Bruder dieser Geräte besitzt zusätzlich durch den kontinuierlichen Zellfluss die Möglichkeit noch größere Mengen an Zellen zu analysieren (Zuba-Surma, Kucia, Abdel-Latif, Lillard, & Ratajczak, 2007). Dabei fließen bis zu 5000 Objekte/s an der Kamera vorbei (Basiji, Ortyń, Liang, Venkatachalam, & Morrissey, 2007) und werden zeitgleich gegatet. Der AMNIS® ImageStream Mk. II kann in einer Datei bis zu einer Million Objekte aufnehmen Die Kombination von den technischen Aspekten des IFC mit seiner Analysesoftware erlaubt auch seltene Ereignisse (Rare Events) statistisch signifikant darzustellen (Ogle et al., 2016) (Samsel et al., 2013). Dafür reichen 10-25 Zellen einer seltenen Subpopulation bereits aus (Graaf et al., 2011).

Die Laser des IFC bestrahlen die Objekte und ihre Farbstoffe für weniger als eine Sekunde. Dadurch unterscheidet es sich vom Fluoreszenzmikroskop, welches längere Laserbelichtungszeiten der Fluorochrome durchführt. Je länger die Belichtungszeit, umso höher die Wahrscheinlichkeit des

Ausbleichens der Farbstoffe oder der Degeneration von Zellstrukturen und so verfälschten Signalen. (Hoebe et al., 2007)

Als Kombination von Durchflusszytometer und Mikroskop vereint das IFC ebenfalls die technischen Nachteile beider Methoden. Es kann weder so schnell und eine so hohe Anzahl von Ereignissen aufnehmen wie das FC, noch lassen sich die Aufnahmen der Zellen so gut aufgelöst und sensitiv darstellen wie im Mikroskop. Es können weniger Fluorochrome gleichzeitig verwendet werden, als beim FACS. Somit reduzieren sich das Färbepanel und die Möglichkeit, verschiedene Populationen gleichzeitig darzustellen.

Als weiteren Nachteil gegenüber dem FC gilt der Verlust von ca. 20-50% der Ereignisse, die an den Detektoren vorbeifließen. Hierfür verantwortlich ist der Umstand, dass üblicherweise schlecht fokussierte Objekte ausgegattet werden und für die Analyse verloren gehen. (F. Zhang et al., 2019) Dies ist besonders von Nachteil, wenn eine seltene Zellgruppe untersucht wird oder nur wenig Zellmaterial zur Verfügung steht.

Die technischen Daten der drei beschriebenen Methoden werden in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Sie sind aus eigenen Erfahrungswerten sowie Daten von (Vorobjev & Barteneva, 2016) und (Basiji, 2016) zusammengefasst:

Eigenschaft	IFC	FACS	Fluoreszenz- mikroskop
Detektion von Ereignissen	bis 1 Mio	mehrere Mio	10-100
Objekte/s	5000	100 000	
Detektion von Fluorochrom-Molekülen	20-100	20-100	einzelne
Auflösung	0,3 µm	/	0,2 µm
Anzahl an verwendeten Fluorochromen	ca. 6	8-12 empfohlen (Flores-Montero et al., 2019), mehr möglich	3-4

Tabelle 5: Technische Daten der Methoden

4.1.2 Gerätebedienung

Die Erfahrungen, die in dieser Arbeit mit der Bedienung des ImageStream®X Mk. II gemacht wurden bestätigen die von anderen Autoren erwähnte Benutzerfreundlichkeit der IFC (Doan et al., 2018). Dies bezieht sich auf folgende Eigenschaften:

Probenvorbereitung: Es mussten keine speziellen Materialien für die Probenvorbereitung besorgt werden. Die Färbung der Proben wird mit laborüblichen Fluoreszenzfarbstoffen für FACS Geräte durchgeführt. Auch bekannte Trägerlösungen und Fixiermethoden aus Mikroskopie oder Durchflusszytometrie können verwendet werden. Es werden keine besonderen Probengefäße zum Einlesen der Proben benötigt, sondern, je nach Gerät, laborübliche 1,5ml Eppendorf-Gefäße oder 96well-Platten (www.luminexcorp.com). Allerdings wurden alle Färbungen und Probenverarbeitungsmethoden an die Nutzung mit dem IFC angepasst. Beispielsweise konnten in dieser Arbeit, anders als bei (Vorobjev & Barteneva, 2016), etablierte Färbeprotokolle und Farbpanel für Flow Cytometer nicht direkt auf Proben im IFC angewendet werden. Kapitel 2.1 beschreibt das genaue Vorgehen bei der Etablierung eines Protokolls für Färbung und Analyse von Blutzellen mittels IFC.

Schutzmechanismen: Das Trockenlaufen des Geräts wird durch Gerätewarnungen verhindert. Auf einer Anzeige auf der Programmoberfläche kann das verbleibende Probenvolumen und die voraussichtliche Einlesedauer ablesen werden. Warnungen werden angezeigt, wenn die minimale Flüssigkeitsmenge von 5µl unterschritten wird oder eine Spülflüssigkeit des Geräts leer ist.

Kontrolle und Übersicht beim Probeneinlesen: Die Oberfläche der INSPIRE™ Software zeigt in Echtzeit nebeneinander Geräteparameter und Bilder von Objekten mit ihren Signalen an. Der Färbeerfolg sowie der Effekt einer Änderung der Geräteeinstellungen, wie z.B. der Laserintensität, werden sofort optisch überprüfbar. Anders als bei der Nutzung des FC, sind die Signale also nicht nur abstrakt und indirekt in Plots sichtbar.

Überprüfbarkeit der Färbesignale: Die direkte Zuordnung der Bilder von Objekten zu Punkten in Signalintensitätsplots erleichtert die Identifikation von echtpositiven Signalen. Bei der Entscheidung zur Auswahl von Populationen in Plots können falschpositive und falschnegative Signale erkannt werden. Ein Beispiel bildet das Ausgaten toter Zellen, um nur lebendige Zellen in einer Population einzuschließen. Dafür können visuell apoptotische Zellen von Zellen mit angehängtem Vesikeln voller apoptotischem Material unterschieden werden. Das Ausgaten von Falschpositiven toten Zellen wird verhindert (Rieger, Hall, Le Luong, Schang, & Barreda, 2010).

Automatisierte Gerätereinigung: Beim Abschalten des ImageStream® Mk. II erfolgt ein automatischer Waschprozess. Das Gerät führt alle Reinigungsschritte selbstständig durch. Damit unterscheidet es sich von den meisten konventionellen FACS Geräten.

Einmalige Kompensationsfärbungen: IDEAS™ vereinfacht die Kompensation von Reihenversuchen im Vergleich zu konventionellen Flow Cytometer. Eine einmalig erstellte Kompensationsmatrix kann für alle Proben verwendet werden, die unter gleichen Bedingungen aufbereitet und mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt wurden. Es muss nicht, wie beim FACS, für jede Probe eine eigene Kompensation durchgeführt, sondern allenfalls die Werte in der Matrix leicht angepasst werden. Ebenso ist die Erstellung der Kompensationsmatrix zeitlich nicht an das Probeneinlesen gebunden. Sie kann zu einem beliebigen Zeitpunkt davor oder danach durchgeführt werden. Die ermöglicht auch eine Analyse frischerer Proben.

Der größte Nachteil bei der Bedienung des Gerätes besteht darin, dass es zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht als Standardmethode im Labor und für klinischen Fragestellungen verwendet wurde. Dadurch mangelt es an standardisierten Workflows und Erfahrungswerten zu gut funktionierenden Färbepanels. Es wird eine aufwändige Etablierungsphase für neue Fragestellungen notwendig, vgl. (Gopakumar, Jagannadh, Gorthi, & Subrahmanyam, 2016). Ein Hauptinhalt dieser Arbeit war deshalb die Etablierung gut funktionierender Färbungen und Zellverarbeitungsschritte für IFC.

Durch die große Datenmenge, die pro aufgenommenem Ereignis gespeichert wird, entstehen große Mengen an Rohdaten (Han, Gu, Zhang, & Lo, 2016). Bei einer Million aufgenommenen Zellen waren die Raw Image Files durchschnittlich 24 GB groß. Beim hier verwendeten Auswertungscomputer (Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2620 v3 @ 2,40 GHz, RAM 16 GB) dauerte das Öffnen eines *.rif Files im IDEAS™ ca. anderthalb bis zwei Stunden.

4.1.3 Anwendungsgebiete

Die Firma AMNIS® beschreibt bereits eine große Reihe an Anwendungsmöglichkeiten. So kann z.B. Zellinteraktion, Mitose, Internalisierung, Co-Lokalisation von Zellbestandteilen, Zellformveränderung oder Chemotaxis untersucht werden. (Imaging Flow Cytometer Broschüre, www.luminexcorp.com)

In der Vergangenheit nutzten Forschergruppen bereits die oben genannten Vorteile des IFC aus, um etablierte, aber aufwändige Methoden zur Untersuchung von Zellmerkmalen zu vereinfachen oder Prozesse zu beschleunigen. Beispielsweise wurden Protokolle für die Darstellung von Mikronukleoli (Rodrigues, 2018), Megakaryozyten (Niswander, McGrath, Kennedy, & Palis, 2014) oder Lungenepithel (Jenner, Chong, Walker, & Green, 2018) erarbeitet. Zudem nutzten die Arbeitsgruppen aus, dass das IFC die Suche und Darstellung seltener Zellen erleichtert (Samsel et al., 2013), mehr Informationen

gleichzeitig durch eine Untersuchung zu erheben sind (Markey & Gartlan, 2019) und eine genauere, akkuratere Auswahl von positiven Signalen ermöglicht, wie bei der Detektion von Mikropartikeln (Erdbrügger et al., 2014) oder Mikrovesikeln (Mastoridis et al., 2018).

Aber auch in der klinischen Anwendung wurden bereits Vorschläge für den Einsatz von IFC gemacht. Hier ist v.a. die Erkennung sehr seltener Ereignisse von Bedeutung. So könnte bspw. die hämatologische Streuung eines Tumors schon früh erkannt (López-Riquelme et al., 2013) oder die minimale Resterkrankung eines chemotherapierten Leukämiepatienten genau bestimmt werden (Barteneva, Fasler-Kan, & Vorobjev, 2012). Insgesamt könnte es dazu beitragen, invasive diagnostische Maßnahmen, durch eine einfache Blutentnahme, sog. Liquid Biopsy, auszutauschen (Friedrich, 2017). Das IFC eröffnet eine neue Perspektive für personalisierte Medizin, jedoch bleibt bis jetzt noch die Bestätigung des klinischen Nutzens in der breiten Anwendung aus (Doan et al., 2018).

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich bestätigen, dass die Kombination quantitativer und qualitativer Daten im IFC zum Ziel führt, auch sehr seltene Zelltypen valide darstellen und untersuchen zu können. Es konnten erfolgreich als Methode zur Bestätigung bisher angezweifelter FACS Analysen genutzt werden. Auf Grund fehlender etablierter Workflows und damit verbundenem größeren Arbeitsaufwand lässt sie sich aber weiterhin nicht als Standarduntersuchungsmethode empfehlen.

4.2 FOXP3-POSITIVE REGULATORISCHE B-ZELLEN IN ALLERGIE UND AIT

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich mittels oben genannter IFC Technologie die Subpopulationen der Transkriptionsfaktor FoxP3-exprimierenden B-Zellen und IL-10⁺Bregs untersucht werden. Bisher ist jedoch noch nicht geklärt, wie regulatorische B-Zellen entstehen. Im Folgenden werden deshalb zwei bestehende Entstehungstheorien diskutiert und mit eigenen Ergebnissen untermauert. Im Anschluss werden die Studienergebnisse aus Kapitel 3.2 diskutiert und mit den bisher unveröffentlichten PACIFIC Studiendaten in den wissenschaftlichen Kontext gestellt.

4.2.1 Entstehungstheorien regulatorischer B-Zellen

Wie im Kapitel 1.2.1 beschrieben, lassen sich Bregs durch ihre Oberflächenproteine definitiv den B-Lymphozyten zuordnen. In der Literatur werden zwei mögliche Entstehungstheorien diskutiert (Rosser & Mauri, 2015), die im Folgenden ausgeführt werden sollen.

Eine mögliche Theorie beschreibt den Ursprung regulatorischer B-Zellen aus einer eigenen Zellreihe. Diese Zelllinie liefere dann ab einer bestimmten B-Zell-Reifestufe parallel zu den nicht-regulatorischen (Beff) Entwicklungsstufen und besäße somit eigene Transkriptionsfaktoren und Zellmarker. Diese Theorie wurde schon früh etabliert, als man IL-10 als Markerprotein für Bregs vorschlug (He et al., 2014). Inzwischen ist bekannt, dass IL-10 nur einer von vielen tolerogenen Mechanismen ist, über die Bregs wirken können (siehe Kapitel 1.2.3).

Die Existenz einer separaten T-Zelllinie mit gemeinsamen Transkriptionsfaktor FoxP3 bei regulatorischen T-Zellen bestärkt die Vermutung. Einige Forschungsgruppen hoffen auf die Übertragbarkeit dieses Prinzips und suchen nach dem Äquivalent in der B-Zellreihe (Baba et al., 2020). Bisher konnte bereits in Mäusen der in vielen Bregs gemeinsame Oberflächenmarker CD9 nachgewiesen werden und es wird vermutet, dass es einen vergleichbaren Marker auch im Menschen gibt (Sun et al., 2015). Problematisch bei der Suche nach einem einheitlichen Oberflächenmarker bleibt die Tatsache, dass Oberflächenproteine je nach Immunstimulation hoch- oder herunterreguliert werden (Rosser & Mauri, 2015). Deshalb, und für den Hinweis auf eine gemeinsame Zelllinie schlagen (Ding et al., 2011) einen Transkriptionsfaktor, TIM-1, als möglichen humanen Breg-Marker vor. Dieser deckt jedoch nur IL-10-positive Bregs ab und davon auch nur 70%. Ein weiterer Vorschlag ist der Acyl-Rezeptor als Marker für IL-10⁺Bregs (Piper et al., 2019). Der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor FoxP3 lässt sich nur in einem kleinen Teil der IL-10⁺ Bregs nachweisen, scheint also nicht als universeller Marker für diese Zellen zu gelten. Es besteht die Möglichkeit, dass FoxP3-positive B-Zellen eine eigene Breg-Reihe darstellen, aber über andere, bzw. wechselnde antiinflammatorische Mechanismen verfügt.

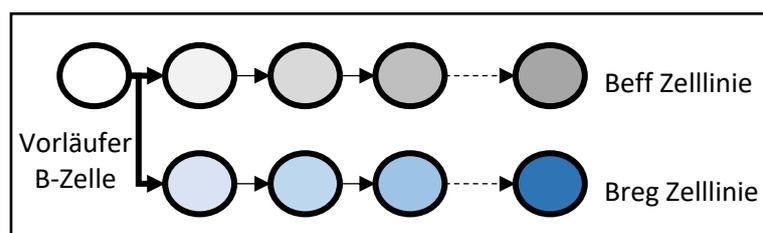


Abbildung 66: Entwicklung der Bregs in separater Zellreihe aus Vorläufer B-Zelle

Die zweite Theorie geht von einer reaktiven Umwandlung von Beffs jeden Entwicklungsstadiums in Bregs und eventuell sogar zurück aus, je nach immunologischen Stimulus aus der Umwelt (Matsumoto et al., 2014; Ray & Dittel, 2017). Unterstützt wird diese Hypothese davon, dass es viele unterschiedliche beschriebene Phänotypen mit vielen unterschiedlichen Wirkmechanismen gibt (Kapitel 1.2.3). Die bereits entdeckten Stimuli, die die Differenzierung von Bregs fördern, kommen ebenfalls von ganz vielen unterschiedlichen Zelltypen, die sich in unterschiedlichen Geweben befinden. Bregs wurden an

vielen Orten im Körper (Milz, Lymphknoten, Darm etc.) gefunden und können auch erst außerhalb der Milz ihre Funktion erhalten. (Rosser & Mauri, 2015)

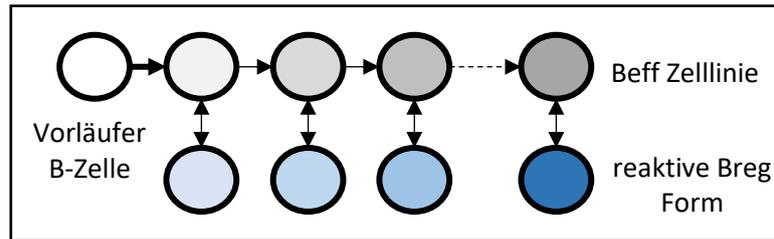


Abbildung 67: Entwicklung von Bregs aus einzelnen Beff

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützen eher die zweite Theorie. IL-10-positive regulatorische B-Zellen sind in den vier untersuchten Gruppen an Zellen aufzufinden (CD27^{+/-} und IgD^{+/-}). Dabei ähnelte die Verteilung der Bregs auf die vier Gruppen, derjenigen aller B-Zellen auf die vier Gruppen. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Umwandlung von Beff zu Bregs in jedem Entwicklungsstadium unter den richtigen äußeren Stimuli geschehen kann.

Insgesamt stellt sich die Frage, ob beide Entstehungstheorien gemeinsam den wahren Entstehungsmechanismus von B-Zellen beschreiben, da die Definition von regulatorischen B-Zellen sehr weit gefasst ist: jede Zelle, die eine regulatorische Komponente sowie ein B-Zellmerkmal aufweist. Die Vermutung liegt nahe, dass regulatorische B-Zellen an den Orten entstehen, wo B-Zellen den richtigen Stimulus erhalten und daraus mehrere Zellreihen entstehen, die sich weiter entwickeln können.

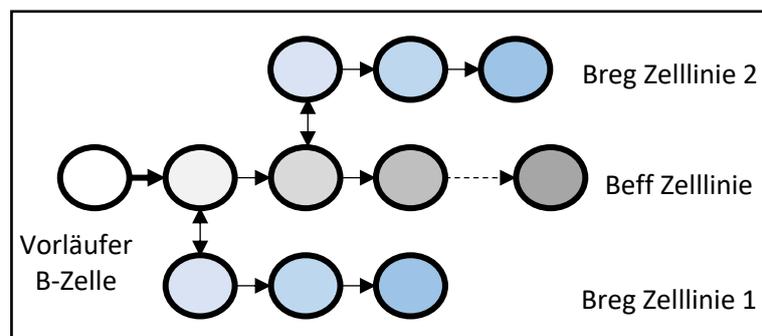


Abbildung 68: Vorschlag für kombinierten Entstehungsmechanismus von Bregs

4.2.2 Imaging Flow Cytometry Daten von Bregs im wissenschaftlichen Kontext

Im Rahmen der Studie wurde die Subpopulation regulatorischer Bregs im Rahmen der Allergie gegen unterschiedliche Pollen analysiert. Dabei ließ sich zwischen den Probandengruppen auf Grund der geringen Probandenzahl kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Breg-Subgruppen feststellen. Zudem kann möglicherweise im Blut, das systemisch fließt, kein Effekt nachgewiesen werden der sich lokal - in den Atemwegen - abspielt. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, spielen

Bregs im gesamten Immunsystem eine Rolle, was viele mögliche Confounder mit sich bringt und vorhandene quantitative Aussage verschleiert.

Durch den Nachweis von FoxP3⁺ Bregs und B-Zellen konnten jedoch die statistischen Ergebnisse aus der PACIFIC Studie mittels IFC bestätigt werden. Damit und mit den eigenen Daten können folgende Aussagen getroffen und Vermutungen angestellt werden:

Regulatorische FoxP3-exprimierende B-Zellen und FoxP3⁺IL-10⁺Bregs spielen in der Aufdosierungsphase der spezifischen Immuntherapie eine Rolle. Möglicherweise stellen sie die Gegenregulation zur inflammatorischen Reaktion der Th2-Antwort des Körpers auf den Stimulus (das Allergen) dar.

Es wird postuliert, dass CD27⁺FoxP3⁺Memory B-Zellen in der späten Phase der AIT zum Toleranzerhalt bei erfolgreicher Therapie beitragen. Analog zu den oben beschriebenen Entstehungstheorien besteht die Möglichkeit, dass es zu einer Konversion der frühen Breg-Formen in Memory-Formen kommt.

Der durchschnittliche Anteil der FoxP3-positiven Zellen war in den IL-10⁺Bregs größer als in allen B-Zellen. Dennoch stellten sie jeweils nur einen kleinen Teil. Die Vermutung liegt nahe, dass FoxP3 in B-Zellen nicht maßgeblich zur Steuerung der IL-10-Produktion beiträgt. Vielmehr muss es über andere regulatorische Komponenten entscheiden.

Eine kleine Untergruppe, die CD27⁺IgD⁺ Bregs mit Expression von FoxP3 und Produktion von IL-10, ist in Patienten mit symptomatischer allergischer Rhinitis vermehrt aufgetreten. Sollte es sich dabei nicht um einen statistischen Fehler handeln, könnte es sich dabei tatsächlich um nicht-aktivierte „schlafende“ Bregs handeln, die einen Therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnten. Alternativ ist auch eine allergieerhaltende Funktion dieser Zellen denkbar.

In dieser Arbeit ließ sich die Existenz von Bregs in allen Individuen bestätigen, obwohl sich derzeit kein konkreter therapeutischer oder diagnostischer Ansatzpunkt in der Allergologie ableiten lässt. Diese Arbeit bestätigt, dass regulatorische B-Zellen physiologisch vorkommen und ihre Erforschung zu unserem weiteren Verständnis von Toleranz und Entzündung im Körper beitragen wird.

4.3 AUSBLICK

Wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, gibt es eine Reihe an Ideen zur klinischen Nutzung des IFC.

Das IFC erwies sich als eine gute Technik um weitere seltene Zelltypen mit ihren Oberflächenantigenen und intrazellulären Strukturen zu suchen und zu beschreiben. Dazu gehört die Suche nach dem Mechanismus mit dem FoxP3 in B-Zellen wirkt.

Weiterhin stellt gilt es die inaktiven Bregs Typen in Pollenallergikern weiter zu untersuchen und als mögliche Therapietargets zu evaluieren.

Zudem können Proben aus den Atemwegen, dem Ort an dem Allergie sich abspielt, zu genaueren Breg-Klassifizierungen führen und uns Aufschluss über ihr Wirkprinzip geben. Bisherige Versuche, Sputum als Probenmaterial in ein Imaging Flow Cytometer einzulesen, führten nicht zu Ergebnissen. Als Grund kommt eine zu geringe Zellzahl mit anschließender geringer Zellkonzentration im Probengefäß in Frage. Der Verlust an Ereignissen beim Einlesen kann laut (F. Zhang et al., 2019) jedoch minimiert werden, indem bei Aufnahme noch nicht nach Fokus gefogtet wird.

Mit der Etablierung des Farbpanels für die neuartige Imaging Flow Cytometry, die Vorteile von Mikroskopie und konventioneller Durchflusszytometrie vereint, wurde in dieser Arbeit ein Werkzeug bereitgestellt, um regulatorische Zellen genauer zu untersuchen. Damit können nun größer angelegte Studien mit statistisch signifikanten Ergebnissen an regulatorischen B-Zellen durchgeführt werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

References

- Aalberse, R. C., Platts-Mills, T. A., & Rispens, T. (2016). The Developmental History of IgE and IgG4 Antibodies in Relation to Atopy, Eosinophilic Esophagitis, and the Modified TH2 Response. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(6), 45. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0621-x>
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Cellular and molecular immunology* (Ninth edition). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Akdis, C. A. [Cezmi A.], & Akdis, M. [Mübeccel] (2015). Advances in allergen immunotherapy: Aiming for complete tolerance to allergens. *Science Translational Medicine*, 7(280), 280ps6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7390>
- Alvaro-Lozano, M., Akdis, C. A. [Cezmi A.], Akdis, M. [Mubeccel], Alviani, C., Angier, E., Arasi, S., . . . Vazquez-Ortiz, M. (2020). Eeaci Allergen Immunotherapy User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology : Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 31 Suppl 25, 1–101. <https://doi.org/10.1111/pai.13189>
- Amu, S., Saunders, S. P., Kronenberg, M., Mangan, N. E., Atzberger, A., & Fallon, P. G. (2010). Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(5), 1114–1124.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.018>
- Andersen, M. N., Al-Karradi, S. N. H., Kragstrup, T. W., & Hokland, M. (2016). Elimination of erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors on human monocytes and macrophages. *Cytometry. Part a : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 89(11), 1001–1009. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22995>
- Andrés, C. de, Tejera-Alhambra, M., Alonso, B., Valor, L., Teijeiro, R., Ramos-Medina, R., . . . Sánchez-Ramón, S. (2014). New regulatory CD19(+)CD25(+) B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*, 270(1-2), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.02.003>
- APLIN, A., HOWE, A., & JULIANO, R. (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 737–744. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00045-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00045-9)
- Arnold, M. M., Srivastava, S., Fredenburgh, J., Stockard, C. R., Myers, R. B., & Grizzle, W. E. (1996). Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission*, 71(5), 224–230. <https://doi.org/10.3109/10520299609117164>
- Baba, Y., Saito, Y., & Kotetsu, Y. (2020). Heterogeneous subsets of B-lineage regulatory cells (Breg cells). *International Immunology*, 32(3), 155–162. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz068>
- Bankoti, R., Gupta, K., Levchenko, A., & Stäger, S. (2012). Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(8), 3961–3971. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102880>
- Barr, T. A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J., & Gray, D. [David] (2007). Tlr-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 37(11), 3040–3053. <https://doi.org/10.1002/eji.200636483>
- Barteneva, N. S., Fasler-Kan, E., & Vorobjev, I. A. (2012). Imaging flow cytometry: Coping with heterogeneity in biological systems. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official*

- Journal of the Histochemistry Society*, 60(10), 723–733.
<https://doi.org/10.1369/0022155412453052>
- Basiji, D. A. (2016). Principles of Amnis Imaging Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1389, 13–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3302-0_2
- Basiji, D. A., Ortyn, W. E., Liang, L., Venkatachalam, V., & Morrissey, P. (2007). Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clinics in Laboratory Medicine*, 27(3), 653–70, viii.
<https://doi.org/10.1016/j.cl.2007.05.008>
- Benndorf, K. (2005). *Physiologie. Mit 76 Tabellen plus CD-ROM mit Prüfungsfragen, Glossar, Literatur und allen Abbildungen.* (4., vollst. überarb. Aufl.). München: Urban und Fischer.
- Berthelot, J.-M., Jamin, C., Amrouche, K., Le Goff, B., Maugars, Y., & Youinou, P. (2013). Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, 80(1), 18–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.04.010>
- Biedermann, T., Heppt, W., Renz, H., & Röcken, M. (2016). *Allergologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37203-2>
- Blair, P. A., Chavez-Rueda, K. A., Evans, J. G., Shlomchik, M. J., Eddaoudi, A., Isenberg, D. A., . . . Mauri, C. (2009). Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(6), 3492–3502.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803052>
- Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). Cd19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 32(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Blank, U., Huang, H., & Kawakami, T. (2021). The high affinity IgE receptor: A signaling update. *Current Opinion in Immunology*, 72, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.03.015>
- Blomberg, K. E. M., Smith, C. I. E., & Lindvall, J. M. (2007). Gene expression signatures in primary immunodeficiencies: The experience from human disease and mouse models. *Current Molecular Medicine*, 7(6), 555–566. <https://doi.org/10.2174/156652407781695710>
- Bodhankar, S., Chen, Y., Vandenbark, A. A., Murphy, S. J., & Offner, H. (2014). Treatment of experimental stroke with IL-10-producing B-cells reduces infarct size and peripheral and CNS inflammation in wild-type B-cell-sufficient mice. *Metabolic Brain Disease*, 29(1), 59–73.
<https://doi.org/10.1007/s11011-013-9474-3>
- Bodhankar, S., Galipeau, D., Vandenbark, A. A., & Offner, H. (2013). Pd-1 Interaction with PD-L1 but not PD-L2 on B-cells Mediates Protective Effects of Estrogen against EAE. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 4(3), 143. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000143>
- Bodogai, M., Moritoh, K., Lee-Chang, C., Hollander, C. M., Sherman-Baust, C. A., Wersto, R. P., . . . Biragyn, A. (2015). Immunosuppressive and Prometastatic Functions of Myeloid-Derived Suppressive Cells Rely upon Education from Tumor-Associated B Cells. *Cancer Research*, 75(17), 3456–3465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3077>
- Bohle, B. (2014). Immune mechanisms of SCIT and SLIT: Facing possible differences? *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 44(3), 304–306. <https://doi.org/10.1111/cea.12263>
- Bosma, A., Abdel-Gadir, A., Isenberg, D. A., Jury, E. C., & Mauri, C. (2012). Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity*, 36(3), 477–490. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.008>

- Braza, F., Chesne, J., Durand, M. [M.], Dirou, S., Brosseau, C. [C.], Mahay, G., . . . Brouard, S. [S.] (2015). A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy*, *70*(11), 1421–1431. <https://doi.org/10.1111/all.12697>
- Brosseau, C. [Carole], Durand, M. [Maxim], Colas, L., Durand, E., Foureau, A., Cheminant, M.-A., . . . Brouard, S. [Sophie] (2018). Cd9+ Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients. *Frontiers in Immunology*, *9*, 3034. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03034>
- Brożek, J. L., Bousquet, J. [Jean], Agache, I. [Ioana], Agarwal, A., Bachert, C., Bosnic-Anticevich, S., . . . Schünemann, H. J. (2017). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(4), 950–958. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.050>
- Carlson, G. E. (1992). *Signal and linear system analysis*. Boston: Houghton Mifflin.
- Carter, N. A., Vasconcellos, R., Rosser, E. C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., . . . Mauri, C. (2011). Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(10), 5569–5579. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100284>
- Chen, H. [Han], Schürch, C. M., Noble, K., Kim, K., Krutzik, P. O., O'Donnell, E., . . . McIlwain, D. R. (2020). Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunology*, *21*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00345-0>
- Chernyshev, A. V., Tarasov, P. A., Semianov, K. A., Nekrasov, V. M., Hoekstra, A. G., & Maltsev, V. P. (2008). Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification. *Journal of Theoretical Biology*, *251*(1), 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.10.016>
- Chesneau, M., Michel, L., Degauque, N., & Brouard, S. [Sophie] (2013). Regulatory B cells and tolerance in transplantation: From animal models to human. *Frontiers in Immunology*, *4*, 497. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00497>
- Cinicola, B. L., Pulvirenti, F., Capponi, M., Bonetti, M., Brindisi, G., Gori, A., . . . Zicari, A. M. (2022). Selective IgA Deficiency and Allergy: A Fresh Look to an Old Story. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *58*(1). <https://doi.org/10.3390/medicina58010129>
- Ciprandi, G., Cirillo, I., Vizzaccaro, A., Tosca, M., Passalacqua, G. [G.], Pallestrini, E., & Canonica, G. W. [G. W.] (2005). Seasonal and perennial allergic rhinitis: Is this classification adherent to real life? *Allergy*, *60*(7), 882–887. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00602.x>
- Coffman, R. L., & Carty, J. (1986). A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *136*(3), 949–954.
- Coffre, M., & Koralov, S. B. (2017). Mirnas in B Cell Development and Lymphomagenesis. *Trends in Molecular Medicine*, *23*(8), 721–736. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.06.001>
- Corkum, C. P., Ings, D. P., Burgess, C., Karwowska, S., Kroll, W., & Michalak, T. I. (2015). Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunology*, *16*, 48. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0113-0>
- Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A. R., Khanna, P., Peppas, D., . . . Maini, M. K. (2012). IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *189*(8), 3925–3935. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103139>

- Dasgupta, S. [Subhajit], Dasgupta, S. [Shaoni], & Bandyopadhyay, M. (2020). Regulatory B cells in infection, inflammation, and autoimmunity. *Cellular Immunology*, 352, 104076. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104076>
- Davies, A. M., & Sutton, B. J. (2015). Human IgG4: A structural perspective. *Immunological Reviews*, 268(1), 139–159. <https://doi.org/10.1111/imr.12349>
- Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: Their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*, 47(5), 450–455. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1992.tb00662.x>
- Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chrétien, I., Tiri, A., Macchia, D., . . . Romagnani, S. (1988). IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(12), 4193–4198.
- Dhami, S., Kakourou, A., Asamoah, F., Agache, I. [I.], Lau, S., Jutel, M. [M.], . . . Sheikh, A. [A.] (2017). Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 72(12), 1825–1848. <https://doi.org/10.1111/all.13208>
- Díaz-Alderete, A., Crispin, J. C., Vargas-Rojas, M. I., & Alcocer-Varela, J. (2004). IL-10 production in B cells is confined to CD154+ cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 23(4), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.10.001>
- Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., . . . Rothstein, D. M. (2011). Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3645–3656. <https://doi.org/10.1172/JCI46274>
- Doan, M., Vorobjev, I. A., Rees, P., Filby, A., Wolkenhauer, O., Goldfeld, Anna E., Lieberman, Judy, . . . Henning, H. (2018). Diagnostic Potential of Imaging Flow Cytometry. *Trends in Biotechnology*, 36(7), 649–652. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.008>
- Dominical, V., Samsel, L., & McCoy, J. P. (2017). Masks in imaging flow cytometry. *Methods (San Diego, Calif.)*, 112, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.07.013>
- Durham, S. R., & Shamji, M. H. (2023). Allergen immunotherapy: Past, present and future. *Nature Reviews. Immunology*, 23(5), 317–328. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00786-1>
- Erdbrügger, U., Rudy, C. K., Etter, M. E., Dryden, K. A., Yeager, M., Klibanov, A. L., & Lannigan, J. (2014). Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytometry. Part a : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 85(9), 756–770. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22494>
- Esteve-Solé, A., Luo, Y., Vlaga, A., Deyà-Martínez, Á., Yagüe, J., Plaza-Martín, A. M., . . . Alsina, L. (2018). B Regulatory Cells: Players in Pregnancy and Early Life. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072099>
- Evans, J. G., Chavez-Rueda, K. A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D. J., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(12), 7868–7878. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7868>
- Fattouh, R., & Jordana, M. (2008). Tgf-beta, eosinophils and IL-13 in allergic airway remodeling: A critical appraisal with therapeutic considerations. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 7(4), 224–236. <https://doi.org/10.2174/187152808786848388>
- Fehres, C. M., van Uden, N. O., Yeremenko, N. G., Fernandez, L., Franco Salinas, G., van Duivenvoorde, L. M., . . . Baeten, D. L. P. (2019). April Induces a Novel Subset of IgA+ Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1. *Frontiers in Immunology*, 10, 1368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01368>

- Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. [David], & Anderton, S. M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology*, 3(10), 944–950. <https://doi.org/10.1038/ni833>
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M. R., Isenberg, D. A., & Mauri, C. (2013). Cd19+cd24^{hi}cd38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science Translational Medicine*, 5(173), 173ra23. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005407>
- Flores-Montero, J., Kalina, T., Corral-Mateos, A., Sanoja-Flores, L., Pérez-Andrés, M., Martín-Ayuso, M., . . . Orfao, A. (2019). Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 475, 112618. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.06.009>
- FRAENKEL-CONRAT, H., & OLCOTT, H. S. (1948). The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *Journal of the American Chemical Society*, 70(8), 2673–2684. <https://doi.org/10.1021/ja01188a018>
- Francis, J. N., James, L. K., Paraskevopoulos, G., Wong, C., Calderon, M. A., Durham, S. R., & Till, S. J. (2008). Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(5), 1120–1125.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.01.072>
- Friedrich, M. J. (2017). Going With the Flow: The Promise and Challenge of Liquid Biopsies. *JAMA*, 318(12), 1095. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.10203>
- Fujimura, T., Yonekura, S., Horiguchi, S., Taniguchi, Y., Saito, A., Yasueda, H., . . . Okamoto, Y. (2011). Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 139(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.12.022>
- Gallego-Valle, J., Pérez-Fernández, V. A., Correa-Rocha, R., & Pion, M. (2018). Generation of Human Breg-Like Phenotype with Regulatory Function In Vitro with Bacteria-Derived Oligodeoxynucleotides. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061737>
- Gao, X., Ren, X., Wang, Q., Yang, Z., Li, Y. [Y.], Su, Z., & Li, J. (2019). Critical roles of regulatory B and T cells in helminth parasite-induced protection against allergic airway inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 198(3), 390–402. <https://doi.org/10.1111/cei.13362>
- Giordani, L., Sanchez, M., Libri, I., Quaranta, M. G., Mattioli, B., & Viora, M. (2009). Ifn-alpha amplifies human naive B cell TLR-9-mediated activation and Ig production. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(2), 261–271. <https://doi.org/10.1189/jlb.0908560>
- Gopakumar, G., Jagannadh, V. K., Gorthi, S. S., & Subrahmanyam, G. R. K. S. (2016). Framework for morphometric classification of cells in imaging flow cytometry. *Journal of Microscopy*, 261(3), 307–319. <https://doi.org/10.1111/jmi.12335>
- Graaf, M. T. de, Jongste, A. H. C. de, Kraan, J., Boonstra, J. G., Sillevius Smitt, P. A. E., & Gratama, J. W. (2011). Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 80(5), 271–281. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20603>
- Gray, D. [David], Gray, M. [Mohini], & Barr, T. (2007). Innate responses of B cells. *European Journal of Immunology*, 37(12), 3304–3310. <https://doi.org/10.1002/eji.200737728>
- Gray, M. [M.], Miles, K. [K.], Salter, D. [D.], Gray, D. [D.], & Savill, J. [J.] (2007). Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(35), 14080–14085. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700326104>

- Gruber, A. D., Moennig, V., Hewicker-Trautwein, M., & Trautwein, G. (1994). Effect of formalin fixation and long-term storage on the detectability of bovine viral-diarrhoea-virus (BVDV) RNA in archival brain tissue using polymerase chain reaction. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, *41*(10), 654–661. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1994.tb00276.x>
- Guizouarn, H., & Motais, R. (1999). Swelling activation of transport pathways in erythrocytes: Effects of Cl⁻, ionic strength, and volume changes. *The American Journal of Physiology*, *276*(1), C210-20. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.1.C210>
- Gutiérrez, C., Lopez-Abente, J., Pérez-Fernández, V., Prieto-Sánchez, A., Correa-Rocha, R., Moreno-Guillen, S., . . . Pion, M. (2019). Analysis of the dysregulation between regulatory B and T cells (Breg and Treg) in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. *PLoS One*, e0213744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213744>
- Haas, K. M., Watanabe, R., Matsushita, T., Nakashima, H., Ishiura, N., Okochi, H., . . . Tedder, T. F. (2010). Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(9), 4789–4800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902391>
- Han, Y., Gu, Y., Zhang, A. C., & Lo, Y.-H. (2016). Review: Imaging technologies for flow cytometry. *Lab on a Chip*, *16*(24), 4639–4647. <https://doi.org/10.1039/c6lc01063f>
- Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., . . . Lund, F. E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology*, *1*(6), 475–482. <https://doi.org/10.1038/82717>
- He, Y., Qian, H., Liu, Y. [Yuan], Duan, L., Li, Y. [Yan], & Shi, G. (2014). The roles of regulatory B cells in cancer. *Journal of Immunology Research*, *2014*, 215471. <https://doi.org/10.1155/2014/215471>
- Hoebe, R. A., van Oven, C. H., Gadella, T. W. J., Dhonukshe, P. B., van Noorden, C. J. F., & Manders, E. M. M. (2007). Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging. *Nature Biotechnology*, *25*(2), 249–253. <https://doi.org/10.1038/nbt1278>
- Horikawa, M., Weimer, E. T., DiLillo, D. J., Venturi, G. M., Spolski, R., Leonard, W. J., . . . Tedder, T. F. (2013). Regulatory B cell (B10 Cell) expansion during *Listeria* infection governs innate and cellular immune responses in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(3), 1158–1168. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201427>
- Hoyte, F. C. L., & Nelson, H. S. (2018). Recent advances in allergic rhinitis. *F1000Research*, *7*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15367.1>
- Huang, F., Ju, Y.-H., Wang, H.-B., & Li, Y.-N. (2020). Maternal vitamin D deficiency impairs Treg and Breg responses in offspring mice and deteriorates allergic airway inflammation. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, *16*, 89. <https://doi.org/10.1186/s13223-020-00487-1>
- Huang, Y., Wang, C., Wang, X. [Xiangdong], Zhang, L., & Lou, H. (2019). Efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy with house dust mite for allergic rhinitis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Allergy*, *74*(1), 189–192. <https://doi.org/10.1111/all.13583>
- Hussain, S., & Delovitch, T. L. (2007). Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(11), 7225–7232. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7225>

- Icha, J., Weber, M., Waters, J. C., & Norden, C. (2017). Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(8). <https://doi.org/10.1002/bies.201700003>
- Ise, W., & Kurosaki, T. [T.] (2020). Regulation of Plasma Cell Differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1254, 63–74. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_6
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., . . . Tedder, T. F. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117(2), 530–541. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249>
- Jenner, D., Chong, D., Walker, N., & Green, A. C. (2018). An imaging flow cytometry method to assess ricin trafficking in A549 human lung epithelial cells. *Methods*, 134-135, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.10.012>
- Jutel, M. [Marek], Agache, I. [Ioana], Bonini, S., Burks, A. W., Calderon, M., Canonica, W., . . . Akdis, C. A. [Cezmi A.] (2016). International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoconomics. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(2), 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1300>
- Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., & Toubi, E. (2012). Human CD19(+)/CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity Reviews*, 11(9), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.018>
- Kim, H. S. [Hyuk Soon], Kim, A.-R., Kim, D. K., Kim, H. W., Park, Y. H., Jang, G. H., . . . Choi, W. S. (2015). Interleukin-10-producing CD5+ B cells inhibit mast cells during immunoglobulin E-mediated allergic responses. *Science Signaling*, 8(368), ra28. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005861>
- Kim, H. S. [Hyuk Soon], Lee, M. B., Lee, D., Min, K. Y., Koo, J., Kim, H. W., . . . Choi, W. S. (2019). The regulatory B cell-mediated peripheral tolerance maintained by mast cell IL-5 suppresses oxazolone-induced contact hypersensitivity. *Science Advances*, 5(7), eaav8152. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav8152>
- Kim, J. S., Hur, D., Hwang, J. K., Chung, C., & Chang, J. K. (2010). Ongoing development of image cytometers. *Bioanalysis*, 2(10), 1755–1765. <https://doi.org/10.4155/bio.10.119>
- Kim, W.-J., Choi, I. S., Kim, C. S., Lee, J.-H., & Kang, H.-W. (2017). Relationship between serum IgA level and allergy/asthma. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 32(1), 137–145. <https://doi.org/10.3904/kjim.2014.160>
- Klimek, L. [Ludger], Bachert, C., Pfaar, O. [Oliver], Becker, S., Bieber, T., Brehler, R., . . . Bousquet, J. [Jean] (2019). Aria guideline 2019: Treatment of allergic rhinitis in the German health system. *Allergologie Select*, 3(1), 22–50. <https://doi.org/10.5414/ALX02120E>
- Korczak-Kowalska, G., Stelmaszczyk-Emmel, A., Bocian, K., Kiernozek, E., Drela, N., & Domagała-Kulawik, J. (2017). Expanding Diversity and Common Goal of Regulatory T and B Cells. II: In Allergy, Malignancy, and Transplantation. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 65(6), 523–535. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0471-9>
- Kucuksezer, U. C., Ozdemir, C., Cevhertas, L., Ogulur, I., Akdis, M. [Mubeccel], & Akdis, C. A. [Cezmi A.] (2020). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and allergen tolerance. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 69(4), 549–560. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.08.002>
- Lal, G., Nakayama, Y., Sethi, A., Singh, A. K., Burrell, B. E., Kulkarni, N., . . . Bromberg, J. S. (2015). Interleukin-10 From Marginal Zone Precursor B-Cell Subset Is Required for Costimulatory

- Blockade-Induced Transplantation Tolerance. *Transplantation*, 99(9), 1817–1828.
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000718>
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderón Gómez, E., Sweenie, C. H., . . . Fillatreau, S. (2008). Tlr-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 4763–4773.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4763>
- Larenas-Linnemann, D. E. S., Antolín-Amérigo, D., Parisi, C., Nakonechna, A., Luna-Pech, J. A., Wedi, B., . . . Pfaar, O. [O.] (2018). National clinical practice guidelines for allergen immunotherapy: An international assessment applying AGREE-II. *Allergy*, 73(3), 664–672.
<https://doi.org/10.1111/all.13316>
- Layhadi, J. A., Eguiluz-Gracia, I., & Shamji, M. H. (2019). Role of IL-35 in sublingual allergen immunotherapy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 19(1), 12–17.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000499>
- Lazibat, I., Rubinić Majdak, M., & Županić, S. (2018). Multiple Sclerosis: New Aspects of Immunopathogenesis. *Acta Clinica Croatica*, 57(2), 352–361.
<https://doi.org/10.20471/acc.2018.57.02.17>
- Lee-Chang, C., Bodogai, M., Martin-Montalvo, A., Wejksza, K., Sanghvi, M., Moaddel, R., . . . Biragyn, A. (2013). Inhibition of breast cancer metastasis by resveratrol-mediated inactivation of tumor-evoked regulatory B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(8), 4141–4151. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300606>
- Leif, R. C., & Shapiro, H. M. (1986). Practical flow cytometry, by Howard M. Shapiro. Alan R. Liss, New York, 1985, 295 pages, \$49.50. *Cytometry*, 7(1), 111–112.
<https://doi.org/10.1002/cyto.990070119>
- Li, R., Rezk, A., Miyazaki, Y., Hilgenberg, E., Touil, H., Shen, P., . . . Bar-Or, A. (2015). Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Science Translational Medicine*, 7(310), 310ra166. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab4176>
- Lin, A. A., Freeman, A. F., & Nutman, T. B. (2018). IL-10 Indirectly Downregulates IL-4-Induced IgE Production by Human B Cells. *ImmunoHorizons*, 2(11), 398–406.
<https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800076>
- Lino, A. C., van Dang, D., Lampropoulou, V., Welle, A., Joedicke, J., Pohar, J., . . . Fillatreau, S. (2018). Lag-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity*, 49(1), 120-133.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.007>
- Lippeveld, M., Knill, C., Ladlow, E., Fuller, A., Michaelis, L. J., Saeys, Y., . . . Peralta, D. (2019). Classification of Human White Blood Cells Using Machine Learning for Stain-Free Imaging Flow Cytometry. *Cytometry. Part a : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23920>
- Liu, X., Ng, C. L., & Wang, D. Y. (2018). The efficacy of sublingual immunotherapy for allergic diseases in Asia. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 67(3), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.02.007>
- López-Riquelme, N., Minguela, A., Villar-Permu, F., Ciprian, D., Castillejo, A., Álvarez-López, M.-R., & Soto, J.-L. (2013). Imaging cytometry for counting circulating tumor cells: Comparative analysis of the CellSearch vs ImageStream systems. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 121(12), 1139–1143. <https://doi.org/10.1111/apm.12061>

- Lundy, S. K., & Fox, D. A. (2009). Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5+ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, *11*(4), R128. <https://doi.org/10.1186/ar2795>
- Lundy, S. K., & Klinker, M. W. (2014). Characterization and activity of Fas ligand producing CD5+ B cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1190*, 81–102. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1161-5_7
- Luo, J., Guo, H., Liu, Z., Peng, T., Hu, X., Han, M., . . . Li, H. (2018). Analysis of Peripheral B Cell Subsets in Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, *10*(3), 236–243. <https://doi.org/10.4168/air.2018.10.3.236>
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator: Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>
- Maravillas-Montero, J. L., & Acevedo-Ochoa, E. (2017). Human B Regulatory Cells: The New Players in Autoimmune Disease. *Revista De Investigacion Clinica; Organo Del Hospital De Enfermedades De La Nutricion*, *69*(5), 243–246. <https://doi.org/10.24875/RIC.17002266>
- Markey, K. A., & Gartlan, K. H. (2019). Imaging Flow Cytometry to Assess Antigen-Presenting-Cell Function. *Current Protocols in Immunology*, *125*(1), e72. <https://doi.org/10.1002/cpim.72>
- Martins, C., Lima, J., Nunes, G., & Borrego, L. M. (2017). Regulatory T and B Cells in Asthmatic Women: Variations From Pregnancy to Postpartum. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, *27*(1), 46–57. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0086>
- Masson, A. de, Bouaziz, J.-D., Le Buanec, H., Robin, M., O'Meara, A., Parquet, N., . . . Socié, G. (2015). Cd24(hi)CD27+ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*, *125*(11), 1830–1839. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-599159>
- Mastoridis, S., Bertolino, G. M., Whitehouse, G., Dazzi, F., Sanchez-Fueyo, A., & Martinez-Llordella, M. (2018). Multiparametric Analysis of Circulating Exosomes and Other Small Extracellular Vesicles by Advanced Imaging Flow Cytometry. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01583>
- Matsuda, Y., Fujii, T., Suzuki, T., Yamahatsu, K., Kawahara, K., Teduka, K., . . . Naito, Z. (2011). Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, *59*(1), 68–75. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.957217>
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., . . . Baba, Y. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*, *41*(6), 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.016>
- Matsumoto, M., Fujii, Y., Baba, A., Hikida, M., Kurosaki, T. [Tomohiro], & Baba, Y. (2011). The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity*, *34*(5), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.016>
- Matsushita, T. (2019). Regulatory and effector B cells: Friends or foes? *Journal of Dermatological Science*, *93*(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.11.008>
- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., & Tedder, T. F. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *185*(4), 2240–2252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001307>

- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Fujimoto, M., & Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(10), 3420–3430. <https://doi.org/10.1172/JCI36030>
- Mauri, C., & Blair, P. A. (2014). The incognito journey of a regulatory B cell. *Immunity*, *41*(6), 878–880. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.003>
- Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annual Review of Immunology*, *30*, 221–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immunity. *The New England Journal of Medicine*, *343*(5), 338–344. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>
- Meltzer, E. O. (2016). Allergic Rhinitis: Burden of Illness, Quality of Life, Comorbidities, and Control. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, *36*(2), 235–248. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.12.002>
- Miles, K. [Katherine], Heaney, J., Sibinska, Z., Salter, D. [Donald], Savill, J. [John], Gray, D. [David], & Gray, M. [Mohini] (2012). A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(3), 887–892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109173109>
- Miyagaki, T., Fujimoto, M., & Sato, S. (2015). Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: From mouse models to clinical research. *International Immunology*, *27*(10), 495–504. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv026>
- Mizoguchi, A. [A.], Mizoguchi, E. [E.], Smith, R. N., Preffer, F. I., & Bhan, A. K. [A. K.] (1997). Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*(10), 1749–1756. <https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1749>
- Mizoguchi, A. [Atsushi], Mizoguchi, E. [Emiko], Takedatsu, H., Blumberg, R. S., & Bhan, A. K. [Atul K.] (2002). Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity*, *16*(2), 219–230. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00274-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00274-1)
- Mohd Jaya, F. N., Garcia, S. G., Borràs, F. E., Chan, G. C. F., & Franquesa, M. (2019). Paradoxical role of Breg-inducing cytokines in autoimmune diseases. *Journal of Translational Autoimmunity*, *2*, 100011. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2019.100011>
- Moore-Connors, J. M., Kim, H. S. [H. S.], Marshall, J. S., Stadnyk, A. W., Halperin, S. A., & Wang, J. [J.] (2015). Cd43⁻, but not CD43⁺, IL-10-producing CD1dhiCD5⁺ B cells suppress type 1 immune responses during Chlamydia muridarum genital tract infection. *Mucosal Immunology*, *8*(1), 94–106. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.45>
- Moriyama, S., Adachi, Y., Tonouchi, K., & Takahashi, Y. (2020). Memory B Cells in Local and Systemic Sites. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1254*, 55–62. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_5
- Nakashima, H., Hamaguchi, Y., Watanabe, R., Ishiura, N., Kuwano, Y., Okochi, H., . . . Fujimoto, M. (2010). Cd22 expression mediates the regulatory functions of peritoneal B-1a cells during the remission phase of contact hypersensitivity reactions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(9), 4637–4645. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901719>
- Natarajan, P., Singh, A. [A.], McNamara, J. T., Secor, E. R. [E. R.], Guernsey, L. A. [L. A.], Thrall, R. S. [R. S.], & Schramm, C. M. [C. M.] (2012). Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5⁺, express TGF- β , and co-localize with CD4⁺Foxp3⁺ T cells. *Mucosal Immunology*, *5*(6), 691–701. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.42>

- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, *140*(6), 871–882.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
- Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., . . . Fillatreau, S. (2010). Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity*, *33*(5), 777–790.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.016>
- Niswander, L. M., McGrath, K. E., Kennedy, J. C., & Palis, J. (2014). Improved quantitative analysis of primary bone marrow megakaryocytes utilizing imaging flow cytometry. *Cytometry. Part a : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *85*(4), 302–312.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22438>
- Noh, J., Lee, J. H., Noh, G., Bang, S. Y., Kim, H. S. [Hyuk Soon], Choi, W. S., . . . Lee, S. S. (2010). Characterisation of allergen-specific responses of IL-10-producing regulatory B cells (Br1) in Cow Milk Allergy. *Cellular Immunology*, *264*(2), 143–149.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.05.013>
- Noh, J., & Noh, G. (2012). Allergen-specific responses of CD19(high) and CD19(low) B Cells in Non-IgE-mediated food allergy of late eczematous reactions in atopic dermatitis: Presence of IL-17- and IL-32-producing regulatory B cells (Br17 & Br32). *Inflammation & Allergy Drug Targets*, *11*(4), 320–329. <https://doi.org/10.2174/187152812800959022>
- Noh, J., Noh, G., Kim, H. S. [Hyuk Soon], Kim, A.-R., & Choi, W. S. (2012). Allergen-specific responses of CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions. *Cellular Immunology*, *274*(1-2), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.01.005>
- Ogle, L. F., Orr, J. G., Willoughby, C. E., Hutton, C., McPherson, S., Plummer, R., . . . Reeves, H. L. (2016). Imagestream detection and characterisation of circulating tumour cells - A liquid biopsy for hepatocellular carcinoma? *Journal of Hepatology*, *65*(2), 305–313.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.014>
- Okubo, K., & Izuhara, K. [Kenji] (2018). The status of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic diseases. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, *67*(3), 299–300. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.06.001>
- Oliveria, J.-P., El-Gammal, A. I., Yee, M., Obminski, C. D., Scime, T. X., Watson, R. M., . . . Gauvreau, G. M. (2018). Changes in regulatory B-cell levels in bone marrow, blood, and sputum of patients with asthma following inhaled allergen challenge. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(4), 1495-1498.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.013>
- Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., . . . Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Research*, *71*(10), 3505–3515.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4316>
- Oppenheim, J. J. (2018). The Future of the Cytokine Discipline. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028498>
- Ostasiewicz, P., Zielinska, D. F., Mann, M., & Wiśniewski, J. R. (2010). Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, *9*(7), 3688–3700. <https://doi.org/10.1021/pr100234w>
- Papandreou, S. (2013). *Flow cytometry: Principles, methodology and applications. Cell Biology Research Progress*. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc.

- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Passalacqua, G. [Giovanni], Bagnasco, D., & Canonica, G. W. [Giorgio Walter] (2020). 30 years of sublingual immunotherapy. *Allergy*, 75(5), 1107–1120. <https://doi.org/10.1111/all.14113>
- Pikkarainen, M., Martikainen, P., & Alafuzoff, I. (2010). The effect of prolonged fixation time on immunohistochemical staining of common neurodegenerative disease markers. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69(1), 40–52. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181c6c13d>
- Piper, C. J. M., Rosser, E. C., Oleinika, K., Nistala, K., Krausgruber, T., Rendeiro, A. F., . . . Mauri, C. (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Reports*, 29(7), 1878-1892.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.018>
- Qian, F., & Montgomery, R. R. (2015). Imaging Immunosenescence. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1343, 97–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_8
- Rafei, M., Hsieh, J., Zehntner, S., Li, M., Forner, K., Birman, E., . . . Galipeau, J. (2009). A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nature Medicine*, 15(9), 1038–1045. <https://doi.org/10.1038/nm.2003>
- Rassow, J. (2008). *Biochemie: 50 Tabellen* (2., aktualisierte Aufl.). *Duale Reihe*. Stuttgart: Thieme.
- Ray, A., Basu, S., Williams, C. B., Salzman, N. H., & Dittel, B. N. (2012). A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(7), 3188–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103354>
- Ray, A., & Dittel, B. N. (2017). Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *Journal of Clinical Medicine*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/jcm6010012>
- Ray, A., Khalil, M. I., Pulakanti, K. L., Burns, R. T., Gurski, C. J., Basu, S., . . . Dittel, B. N. (2019). Mature IgDlow/- B cells maintain tolerance by promoting regulatory T cell homeostasis. *Nature Communications*, 10(1), 190. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08122-9>
- Reinhold, T., & Brüggjenjürgen, B. (2017). Cost-effectiveness of grass pollen SCIT compared with SLIT and symptomatic treatment. *Allergo Journal International*, 26(1), 7–15. <https://doi.org/10.1007/s40629-016-0002-y>
- Rieger, A. M., Hall, B. E., Le Luong, T., Schang, L. M., & Barreda, D. R. (2010). Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *Journal of Immunological Methods*, 358(1-2), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.03.019>
- Rodrigues, M. A. (2018). Automation of the in vitro micronucleus assay using the Imagestream® imaging flow cytometer. *Cytometry. Part a : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 93(7), 706–726. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23493>
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: Origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
- Rosser, E. C., Oleinika, K., Tonon, S., Doyle, R., Bosma, A., Carter, N. A., . . . Mauri, C. (2014). Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nature Medicine*, 20(11), 1334–1339. <https://doi.org/10.1038/nm.3680>

- Sack, U., Trnok, A., & Rothe, G. (2006). *Zelluläre Diagnostik*. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen. Basel: S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-01217-0>
- Samitas, K., Carter, A., Kariyawasam, H. H., & Xanthou, G. [G.] (2018). Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited. *Allergy*, *73*(5), 993–1002. <https://doi.org/10.1111/all.13373>
- Samsel, L., Dagur, P. K., Raghavachari, N., Seamon, C., Kato, G. J., & McCoy, J. P. (2013). Imaging flow cytometry for morphologic and phenotypic characterization of rare circulating endothelial cells. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *84*(6), 379–389. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21088>
- Sarvaria, A., Basar, R., Mehta, R. S., Shaim, H., Muftuoglu, M., Khoder, A., . . . Rezvani, K. (2016). IL-10+ regulatory B cells are enriched in cord blood and may protect against cGVHD after cord blood transplantation. *Blood*, *128*(10), 1346–1361. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-695122>
- Schioppa, T., Moore, R., Thompson, R. G., Rosser, E. C., Kulbe, H., Nedospasov, S., . . . Balkwill, F. R. (2011). B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(26), 10662–10667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100994108>
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2573-7>
- Shalapour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., . . . Karin, M. (2015). Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*, *521*(7550), 94–98. <https://doi.org/10.1038/nature14395>
- Shamji, M. H., Layhadi, J. A., Scadding, G. W., Cheung, D. K. M., Calderon, M. A., Turka, L. A., . . . Durham, S. R. (2015). Basophil expression of diamine oxidase: A novel biomarker of allergen immunotherapy response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(4), 913-921.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.09.049>
- Shen, P., & Fillatreau, S. (2015). Antibody-independent functions of B cells: A focus on cytokines. *Nature Reviews. Immunology*, *15*(7), 441–451. <https://doi.org/10.1038/nri3857>
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R. A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., . . . Fillatreau, S. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, *507*(7492), 366–370. <https://doi.org/10.1038/nature12979>
- Singh, A. [Anurag], Carson, W. F., Secor, E. R. [Eric R.], Guernsey, L. A. [Linda A.], Flavell, R. A., Clark, R. B., . . . Schramm, C. M. [Craig M.] (2008). Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(11), 7318–7326. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7318>
- Steffen, U., Koeleman, C. A., Sokolova, M. V., Bang, H., Kleyer, A., Rech, J., . . . Schett, G. (2020). Iga subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nature Communications*, *11*(1), 120. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13992-8>
- Stelmaszczyk-Emmel, A., Zawadzka-Krajewska, A., Głodkowska-Mrówka, E., & Demkow, U. (2015). Foxp3 Tregs Response to Sublingual Allergen Specific Immunotherapy in Children Depends on the Manifestation of Allergy. *Journal of Immunology Research*, *2015*, 731381. <https://doi.org/10.1155/2015/731381>
- Stuck, B. A., Czajkowski, J., Hagner, A.-E., Klimek, L. [Ludger], Verse, T., Hörmann, K., & Maurer, J. T. (2004). Changes in daytime sleepiness, quality of life, and objective sleep patterns in seasonal allergic rhinitis: A controlled clinical trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *113*(4), 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.589>

- Su, J. M. F., Perlaky, L., Li, X.-N., Leung, H.-C. E., Antalffy, B., Armstrong, D., & Lau, C. C. (2004). Comparison of ethanol versus formalin fixation on preservation of histology and RNA in laser capture microdissected brain tissues. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *14*(2), 175–182. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00050.x>
- Sun, J., Wang, J. [Jiguang], Pefanis, E., Chao, J., Rothschild, G., Tachibana, I., . . . Basu, U. (2015). Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells. *Cell Reports*, *13*(6), 1110–1117. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.070>
- Taitano, S. H., van der Vlugt, L. E. P. M., Shea, M. M., Yang, J. [Jennifer], Lukacs, N. W., & Lundy, S. K. (2018). Differential Influence on Regulatory B Cells by TH2 Cytokines Affects Protection in Allergic Airway Disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *201*(7), 1865–1874. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800206>
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., & Kaufman, D. L. (2001). Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(2), 1081–1089. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.1081>
- TOMASI, T. B., TAN, E. M., SOLOMON, A., & PRENDERGAST, R. A. (1965). Characteristics OF AN IMMUNE SYSTEM COMMON TO CERTAIN EXTERNAL SECRETIONS. *The Journal of Experimental Medicine*, *121*(1), 101–124. <https://doi.org/10.1084/jem.121.1.101>
- Tsubata, T. (2019). Inhibitory B cell co-receptors and autoimmune diseases. *Immunological Medicine*, *42*(3), 108–116. <https://doi.org/10.1080/25785826.2019.1660038>
- Tung, J. W., Parks, D. R., Moore, W. A., Herzenberg, L. A. [Leonard A.], & Herzenberg, L. A. [Leonore A.] (2004). New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *110*(3), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.016>
- Vadasz, Z., Peri, R., Eiza, N., Slobodin, G., Balbir-Gurman, A., & Toubi, E. (2015). The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of Immunology Research*, *2015*, 254245. <https://doi.org/10.1155/2015/254245>
- Vadasz, Z., & Toubi, E. (2017). Foxp3 Expression in Macrophages, Cancer, and B Cells-Is It Real? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *52*(3), 364–372. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8572-5>
- Van de Veen, W. (2017). *The role of regulatory B cells in allergen immunotherapy*. Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.5167/uzh-145834>
- Van de Veen, W., & Akdis, M. [Mübecel] (2016). Role of IgG4 in IgE-mediated allergic responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(5), 1434–1435. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.022>
- Van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D. G., . . . Akdis, M. [Mübecel] (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(4), 1204–1212. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.014>
- Van der Net, J. B., Bushell, A., Wood, K. J., & Harden, P. N. (2016). Regulatory T cells: First steps of clinical application in solid organ transplantation. *Transplant International : Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, *29*(1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/tri.12608>
- Vorobjev, I. A., & Barteneva, N. S. (2016). Quantitative Functional Morphology by Imaging Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1389*, 3–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3302-0_1

- Wachholz, P. A., & Durham, S. R. (2004). Mechanisms of immunotherapy: Igg revisited. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4(4), 313–318. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000136753.35948.c0>
- Wang, J.-Y. (2020). *B Cells in Immunity and Tolerance* (Vol. 1254). Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., . . . Egwuagu, C. E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature Medicine*, 20(6), 633–641. <https://doi.org/10.1038/nm.3554>
- Wang, W. W., Yuan, X. L., Chen, H. [Hui], Xie, G. H., Ma, Y. H., Zheng, Y. X., . . . Shen, L. S. (2015). Cd19+cd24hicd38hibregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer. *Oncotarget*, 6(32), 33486–33499. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5588>
- Wang, Y., Liu, J. [Jun], Burrows, P. D., & Wang, J.-Y. (2020). B Cell Development and Maturation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1254, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_1
- Wang, Z., & Tan, F. (2020). The blockade of PD-1/PD-L1 pathway promotes the apoptosis of CD19+ CD25+ Bregs and suppresses the secretion of IL-10 in patients with allergic rhinitis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 91(2), e12836. <https://doi.org/10.1111/sji.12836>
- Watanabe, R., Ishiura, N., Nakashima, H., Kuwano, Y., Okochi, H., Tamaki, K., . . . Fujimoto, M. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: Cd19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(9), 4801–4809. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902385>
- Wiest, M., Upchurch, K., Hasan, M. M., Cardenas, J., Lanier, B., Millard, M., . . . Joo, H. (2019). Phenotypic and functional alterations of regulatory B cell subsets in adult allergic asthma patients. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 49(9), 1214–1224. <https://doi.org/10.1111/cea.13439>
- Wittels, K. A., Hubert, E. M., Musch, M. W., & Goldstein, L. (2000). Osmolyte channel regulation by ionic strength in skate RBC. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(1), R69–76. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.1.R69>
- Xiao, S., Brooks, C. R., Zhu, C., Wu, C., Sweere, J. M., Petecka, S., . . . Kuchroo, V. K. (2012). Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30), 12105–12110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120914109>
- Xiao, X., Lao, X.-M., Chen, M.-M., Liu, R.-X., Wei, Y., Ouyang, F.-Z., . . . Kuang, D.-M. (2016). Pd-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. *Cancer Discovery*, 6(5), 546–559. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1408>
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M., & Tedder, T. F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28(5), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.017>
- Yang, M., Deng, J., Liu, Y. [Yang], Ko, K.-H., Wang, X. [Xiaohui], Jiao, Z., . . . Lu, L. (2012). Il-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. *The American Journal of Pathology*, 180(6), 2375–2385. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.010>
- Yang, X. [Xue], Yang, J. [Ji], Chu, Y., Xue, Y., Xuan, D., Zheng, S., & Zou, H. (2014). T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus. *PloS One*, 9(2), e88441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088441>

- Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D. J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E. I., . . . Tedder, T. F. (2012). Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, *491*(7423), 264–268. <https://doi.org/10.1038/nature11501>
- Zha, L., Leoratti, F. M. S., He, L., Mohsen, M. O., Cragg, M., Storni, F., . . . Bachmann, M. F. (2018). An unexpected protective role of low-affinity allergen-specific IgG through the inhibitory receptor FcγRIIb. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *142*(5), 1529-1536.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.054>
- Zhang, C., Xin, H., Zhang, W., Yazaki, P. J., Zhang, Z., Le, K., . . . Yu, H. (2016). Cd5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer. *Immunity*, *44*(4), 913–923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.003>
- Zhang, F., Lei, C., Huang, C.-J., Kobayashi, H., Sun, C.-W., & Goda, K. (2019). Intelligent Image De-Blurring for Imaging Flow Cytometry. *Cytometry. Part a : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *95*(5), 549–554. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23771>
- Zhang, H.-P., Wu, Y., Liu, J. [Jiangqi], Jiang, J., Geng, X.-R., Yang, G., . . . Yang, P.-C. (2013). Tsp1-producing B cells show immune regulatory property and suppress allergy-related mucosal inflammation. *Scientific Reports*, *3*, 3345. <https://doi.org/10.1038/srep03345>
- Zhang, Y. [Yu], Morgan, R., Chen, C., Cai, Y., Clark, E., Khan, W. N., . . . Rosenblatt, J. D. (2016). Mammary-tumor-educated B cells acquire LAP/TGF-β and PD-L1 expression and suppress anti-tumor immune responses. *International Immunology*, *28*(9), 423–433. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw007>
- Zhou, J., Min, Z., Zhang, D., Wang, W., Marincola, F., & Wang, X. [Xiangdong] (2014). Enhanced frequency and potential mechanism of B regulatory cells in patients with lung cancer. *Journal of Translational Medicine*, *12*, 304. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0304-0>
- Zissler, U. M. [U. M.], Esser-von Bieren, J., Jakwerth, C. A. [C. A.], Chaker, A. M. [A. M.], & Schmidt-Weber, C. B. [C. B.] (2016). Current and future biomarkers in allergic asthma. *Allergy*, *71*(4), 475–494. <https://doi.org/10.1111/all.12828>
- Zissler, U. M. [Ulrich M.], Jakwerth, C. A. [Constanze A.], Guerth, F. M., Pechtold, L., Aguilar-Pimentel, J. A., Dietz, K., . . . Chaker, A. M. (2018). Early IL-10 producing B-cells and coinciding Th/Tr17 shifts during three year grass-pollen AIT. *EBioMedicine*, *36*, 475–488. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.016>
- Zuba-Surma, E. K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., Lillard, J. W., & Ratajczak, M. Z. (2007). The ImageStream System: A key step to a new era in imaging. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, *45*(4), 279–290.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörper	8
Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbung: Erregung eines antikörpergebundenen Fluorochroms durch Licht einer bestimmten Wellenlänge mit anschließender Emission von Licht einer bekannten Wellenlänge.....	12
Abbildung 3: Reifung einer B-Zelle: B-Zellen (BZ) entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und reifen über mehrere Stufen zu unreifen B-Zellen heran, in der Milz entstehen unterschiedliche reife BZ-Formen, die in lymphatischen Gewebe durch Aktivierung zu Plasmazellen oder Memory-Zellen reifen. Modifiziert nach (Blomberg, Smith, & Lindvall, 2007; Coffre & Koralov, 2017) und https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/b-cells , zuletzt geöffnet am 01.07.2022	14
Abbildung 4: FoxP3 ⁺ B-Zellen über 3 Jahre AIT, unveröffentlichte PACIFIC Daten	19
Abbildung 5: FoxP3 ⁺ IL-10 ⁺ regulatorische B-Zellen über 3 Jahre AIT, unveröffentlichte PACIFIC Daten	19
Abbildung 6: CD27 ⁺ FoxP3 ⁺ B-Zellen über 3 Jahre AIT, unveröffentlichte PACIFIC Daten	20
Abbildung 7: Sekretorische Wirkmechanismen von Bregs, Adaptation und Weiterentwicklung nach (Maravillas-Montero & Acevedo-Ochoa, 2017; Mauri & Blair, 2014).....	21
Abbildung 8: Zell-Zell-Interaktionen von Bregs, Bild erstellt mit Hilfe der Tabelle aus (Ray & Dittel, 2017).....	22
Abbildung 9: Stimulierende und Inhibierende Signale auf Bregs.....	23
Abbildung 10: Aufbau eines ICF, vgl. www.luminexcorp.com	26
Abbildung 11: Beispiel für überlappende Emissionsspektren zweier Fluorochrome: Fluorochrom 1 und 2 emittieren im Bereich von ca. 470-520 nm beide und besitzen dort einen spektralen Überlappungsbereich, somit strahlt Fluorochrom 1 bei Anregung auch in den Kanal in dem die Emission von Fluorochrom 2 detektiert wird.....	28
Abbildung 12: Workflow Daten (vgl. IDEAS™ Usermanual, www.luminexcorp.com).....	29
Abbildung 13: manuelle Ficollseparation, vgl. (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, 2014)	34
Abbildung 14: Übersicht der gateden B-Zellen	41
Abbildung 15: Gatingstrategie für Breg-Suche	42
Abbildung 16: Beispiel für Häufigkeitsverteilung von Merkmalen im Dotplot, die Farben markieren die Punktdichte.....	43
Abbildung 17: Singlegating.....	43
Abbildung 18: Fokusgating	43
Abbildung 19: Lymphozytengating.....	44
Abbildung 20: Life-Gating.....	44
Abbildung 21: B-Zellgating	44
Abbildung 22: feines Lymphozytengating	45
Abbildung 23: feines Life-Gating	45
Abbildung 24: IL10 ⁺ Gating von CD19 ⁺ Zellen	45
Abbildung 25: FoxP3 ⁺ Gating von CD19 ⁺ IL10 ⁺ Zellen	45
Abbildung 26: FoxP3 ⁺ Gating von CD19 ⁺ Zellen	46
Abbildung 27: CD27 ⁺ / ⁻ Gating von CD19 ⁺ Zellen	46
Abbildung 28: IL10 ⁺ Gating von CD19 ⁺ CD27 ⁺ Zellen.....	46
Abbildung 29: FoxP3 ⁺ Gating von CD19 ⁺ CD27 ⁺ IL10 ⁺ Zellen.....	46
Abbildung 30: IgD ⁺ Gating von CD19 ⁺ CD27 ⁺ Zellen.....	47
Abbildung 31: IL10 ⁺ Gating von CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ Zellen	47

Abbildung 32: FoxP3+ Gating von CD19+CD27+IgD+IL10+ Zellen.....	47
Abbildung 33: IgD- Gating von CD19+CD27- Zellen.....	47
Abbildung 34: IL10+ Gating von CD19+CD27-IgD- Zellen.....	47
Abbildung 35: FoxP3+ Gating von CD19+CD27-IgD-IL10+ Zellen.....	47
Abbildung 36: Vergleich der Ausbeute von PBMC nach Zellseparation mittels CPT- oder Ficoll- Method, p-Wert 0,43 bei Signifikanzniveau von 0,05 und unterschiedlichen Probanden	48
Abbildung 37: Beispiel für gelungene extrazelluläre Färbung mit FITC-viobright.....	49
Abbildung 38: Isotypkontrolle eines extrazellulären Merkmals	52
Abbildung 39: Isotypkontrolle eines intrazellulären Merkmals	52
Abbildung 40: Intensitätshistogramm der Aqua Life/Dead® Färbung	53
Abbildung 41: Beispiele für Fluoreszenzsignale von untersuchten Merkmalen CD19 (grün), CD27 (violett), IL-10 (orange), FoxP3 (rot), IgD (magenta).....	54
Abbildung 42: Memory-B-Zelle (CD19 ⁺ CD27 ⁺ , grün und violett)	55
Abbildung 43: Non-Memory-B-Zelle (CD19 ⁺ CD27 ⁻ , grün und kein violett)	55
Abbildung 44: reife/aktivierte Memory-B-Zelle (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , grün, violett und magenta)	55
Abbildung 45: unreife/niedrigaktive Non-Memory-B-Zelle (CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻ , grün ohne violett und magenta)	55
Abbildung 46: IL-10-positive regulatorische B-Zelle (CD19 ⁺ IL-10 ⁺ , grün und orange)	55
Abbildung 47: IL-10-positive Memory-Breg (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IL-10 ⁺ , grün, violett und orange).....	55
Abbildung 48: IL-10-positive aktivierte Memory-Breg (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ IL-10 ⁺ , grün, violett, magenta und orange)	56
Abbildung 49: IL-10-positive niedrigaktive Non-Memory-Breg (CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻ IL-10 ⁺ , grün und orange ohne violett und magenta).....	56
Abbildung 50: FoxP3-positive B-Zelle (CD19 ⁺ FoxP3 ⁺ , grün und rot)	56
Abbildung 51:FoxP3-positive Breg (CD19 ⁺ IL10 ⁺ FoxP3 ⁺ , grün, orange und rot).....	56
Abbildung 52: FoxP3-positive aktivierte Memory-Breg (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ IL-10 ⁺ FoxP3 ⁺ , grün, violett, magenta, orange und rot)	56
Abbildung 53: FoxP3-positive niedrigaktive Non-Memory-Breg (CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻ IL-10 ⁺ FoxP3 ⁺ , grün, orange und rot ohne violett und magenta).....	56
Abbildung 54: Anzahl an B-Zellen pro 1000 jedes Probanden, entsprechend den Bezugswerten aus Tabelle 4, nach Probandengruppe sortiert	57
Abbildung 55: Anteil der Memory-Zellen pro 1000 B-Zellen, schwarze Rauten: Einzelwerte, violett: Mittelwert und Standardabweichung einer Probandengruppe.....	57
Abbildung 56: Anteile an Memory- und Non-Memory-Zellen an allen B-Zellen	58
Abbildung 57: Anteil an IgD-positiven und negativen Zellen in Memory und Non-Memory-Zellen	58
Abbildung 58: Anteil von IL-10-Bregs pro 1000 B-Zellen, schwarze Rauten: Einzelwerte, orange: Mittelwert und Standardabweichung innerhalb einer Probandengruppe	59
Abbildung 59: Breg-Anteil in unterschiedlichen B-Zell-Gruppen, mit Mittelwert und Standardabweichung.....	59
Abbildung 60: Anteile Breg in Gruppe HC, Mittelwerte	60
Abbildung 61: Anteile in Bregs in Gruppe AR, Mittelwerte	61
Abbildung 62: Anteile in Bregs in Gruppe AR+AIT, Mittelwerte	61
Abbildung 63: Anteil von FoxP3+ an 1000 B-Zellen, schwarze Rauten: Einzelwerte, rot: Mittelwert mit Standardabweichung einer Probandengruppe	62
Abbildung 64: FoxP3 ⁺ Anteil an Zellen in unterschiedlichen Breg-Subtypen.....	62
Abbildung 65: Anteil von CD27 ⁺ und CD27 ⁺ IgD ⁺ an FoxP3 ⁺ IL-10 ⁺ Bregs.....	63
Abbildung 66:Entwicklung der Bregs in seperater Zellreihe aus Vorläufer B-Zelle	69
Abbildung 67: Entwicklung von Bregs aus einzelnen Beff.....	70

Abbildung 68: Vorschlag für kombinierten Entstehungsmechanismus von Bregs	70
Abbildung 69: Beispiel für Bildergalerie im INSPIRE.....	97
Abbildung 70: Isotypkontrolle PE-Dazzle	100
Abbildung 71: Isotypkontrolle für FITC-viobright.....	100
Abbildung 72: Isotypkontrolle für PE-Cy7	100

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Benennung der Zellen in dieser Arbeit	16
Tabelle 2: Gegenüberstellung von FACS und Fluoreszenzmikroskopie.....	31
Tabelle 3: Färbepanel in dieser Arbeit	51
Tabelle 4: Bezugswerte B-Zellen: absolute Anzahl der aufgenommenen B-Zellen pro Proband, nach Probandengruppe sortiert.....	56
Tabelle 5: Technische Daten der Methoden	65
Tabelle 6: Ausgewählte Farben zur Darstellung von Breg mittels IFC.....	94
Tabelle 7: Ausgewählte Isotypen zur Darstellung von Breg mittels IFC.....	94
Tabelle 8: in der Literatur beschriebene regulatorische B-Zellen	97
Tabelle 9: Rohdaten der Breg Studie, absolute Zellzahlen.....	99

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIT	Allergen-spezifische Immuntherapie
APRIL	A Proliferation Inducing Ligand
AR	Allergische Rhinitis
BAFF	B Cell Activating Factor
Beff	Effektor-B-Zelle
Breg	regulatorische B-Zelle
BZ	B-Zelle
CCD	Charge-Coupled-Device
CPT	Cell Preparation Tube
DSMO	Dimethylsulfoxid
FACS/FC	Flouroscent Activated Cell Sorter / Flow Cytometer
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HC	Healthy Control
IFC	Imaging Flow Cytometer
INF	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	Major Histocompatibility Complex
MZ	Marginalzonen-Zellen
MZP	Marginalzonen Vorläuferzellen
NK	Natural Killer Zelle
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cell
SCIT	Subcutane Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
SSC	Side Scatter
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle

9 DANKSAGUNG

Im Rahmen meiner Arbeit haben mich viele liebe Menschen unterstützt. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die Begleitung meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Dr. Ulrich Zißler und Prof. Dr. Carsten Schmitt-Weber vom Zentrum für Allergie und Umwelt und bei PD Dr. Adam Chaker von der HNO-Klinik des Klinikums Rechts der Isar. Besonderer Dank gilt Jana Hartmann von der Allergieambulanz des Klinikums Rechts der Isar, ohne die die Patientenstudie nicht umsetzbar gewesen wäre. Madlen Oelsner und Ferdinand Gürth haben mich in die Arbeit ins Labor eingeführt und standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank für eure unermüdliche Unterstützung!

Ebenso möchte ich Dr. Ritu Mishra, Markus Utzt und Dr. Marc Rosenbaum vom TransaTUM für ihre Hilfe bei der Erkundung der Funktionen des Amnis ImageStream Mk II danken. Vielen Dank an Dr. Peter Rhein von Luminex für den regen Austausch und der Unterstützung beim Verstehen des IFC.

Zuletzt ein großes „Danke“ an meine Familie und Freunde für eure Unterstützung, die es mir ermöglicht hat, diese Aufgabe zu meistern.

10 ANHANG

10.1 MATERIALLISTE

Farben und Konzentrationen für die Studie:

AG	Farbe	Chanel - Laser	Verdünnung pro 10mio	Hersteller	Katalog/Lot	Konzentration
CD19	Vio-bright FITC	2 - 488	1:200 in 100µl Puffer	miltenyi	130-104-650/ 5180605581	33 µg/ml → 0,0165µg/100µl Puffer
CD27	BV421	7 - 405	1:00 in 100µl	BD	562514/ 2237802	0,05 mg/ml → 0,05µg/100ml Puffer
IgD	PECy7	6 - 488	1:100 in 100µl	BD	561314/ 3317813	0,125 mg/ml → 0,025µg/100ml Puffer
FoxP3	AF647	11 -642	1:25 in 100µl	Biolegend	320113/ B193596	60 µg/ml → 0,24 µg/100ml Puffer
IL10	PEDazzle	4 - 488	1:25 in 100µl	Biolegend	501426/ B224147	100µg/ml → 0,4 µg/100ml Puffer
Live/Dead	Aqua	8 - 405	1:1000 in 1ml	invitrogen	L-34965/ 2103471	µg/ml

Tabelle 6: Ausgewählte Farben zur Darstellung von Breg mittels IFC

Isotypen für die Studie:

Farbe	Isotyp	Klon	Katalog/Lot	Konzentration
Viobright FITC	Mouse IgG1κ		130-113-768/ 5190115125	100µg/ml →0,5µl in 300µl Puffer, davon 100µl
BV421	Mouse IgG1,κ	X40	562438/6266941	0,2µg/µl →0,5µl in 200µl Puffer, davon 100µl
PECy7	Mouse IgG2a,κ	G155-178	552868/8239776	0,2µg/µl →0,5µl in 400µl Puffer, davon 100µl
AF647	Mouse IgG1,κ	MOPC-21	400135/B256138	100µg/ml →2,4µl in 100µl Puffer
PEDazzle 594	Rat IgG2a, κ	RTK4530	400659/B195916	0,2 µg/µl →2µl in 100µl Puffer

Tabelle 7: Ausgewählte Isotypen zur Darstellung von Breg mittels IFC

Reagenzien:

FoxP3 FoxP3 Transcription Factor staining kit (*eBioscience™*, Catalog No. 00-5523-00)

BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeablization Kit (Catalog No. 554714)

Gerät

AMNIS® ImageStream®X Mk. II (Part/Serial No: 799-03300/ ISX 536, früher Millipore, jetzt Luminex, mit folgenden Lasern: 405nm, 488nm, 642nm; mit 40x Vergrößerungslinse) mit INSPIRE™ und IDEAS™ Software

10.2 ÜBERSICHT ÜBER BEKANNTE REGULATORISCHE B-ZELLEN

Phänotyp	Name/ Zelltyp	Spezies, Ort	Funktion	Krankheit	Quelle
CD73- CD25+CD71+ 25+71+CD73loPD- L1+	Br1	Mensch, Blut	IL-10, IgG4	Allergie, bei AIT erhöht	(van de Veen et al., 2013)
IgD+CD27-IgA+	Aus naiven B-Zellen	Maus, Mensch, Synovialflüssigkeit	IL10, PD-L1, T-Zellen und Makrophagen weniger	EAE, Kontakthypersensibilität, arthritis	(Fehres et al., 2019)
CD5(hi)CD24(-/+) CD27(hi/+)CD38(dim)		Mensch, Tumoren	IL10,	Tumor	(X. Xiao et al., 2016)
CD5+	Br1, ?	Mensch, Blut Maus, Blut	IL10, CD40, Mastzellinhibition, Tumorzellschutz	Foodallergie, Allergie, Tumor	(H. S. Kim et al., 2015; Noh et al., 2010; C. Zhang et al., 2016)
CD24hiCD38hi	Unreife Zellen	Mensch, Blut, Inflammation	IL-10, TGFbeta Induktion Treg, Supprimieren Th1, Th17, zytotox. T-Zellen, iNKT unterstützt	Defekt bei SLE, RA, Chr. HepB Infektion, Tumor	(Blair et al., 2010; Bosma, Abdel-Gadir, Isenberg, Jury, & Mauri, 2012; Das et al., 2012; Flores-Borja et al., 2013; W. W. Wang et al., 2015)
CD24hiCD27int	Plasmablast	Mensch, Blut	IL-10, supp. DZ, Th effektorzellen	AI Enzephalitis	(Matsumoto et al., 2014)
CD138+CD44hi	Plasmablast	Maus, LK			
CD27intCd38+	Plasmablast				
Tim-1+	Tim-1+ Breg	Maus, Milz	IL-10, supp. Th	AI	(Ding et al., 2011; S. Xiao et al., 2012)
CD9+		Maus, Mensch, Blut	IL10- Supp. Th2, th17	Allergie, Asthma	(Braza et al., 2015; Brosseau et al., 2018; Sun et al., 2015)
CD138+MHC-11loB220+	Plasmazelle	Maus, Milz	IL-10, IL35, supp. Th, NK, Neutrophile	Salmonella, Infektion, AI	(Neves et al., 2010; Shen et al., 2014)
CD19loCD138+MCHI+MHCII+IgM+IgD+PAX-	B2, Plasmazellen, GIFT15	Maus, Milz	IL-10	Autoimmun Encephalomyelitis	(Rafei et al., 2009)
CD138+LAG-3+CD200+PD-L1+PD-L2+	Plasbazellen	Maus,	IL10, Immunsuppressive Rezeptoren	Salmonelleninfektion	(Lino et al., 2018)
CD138+IgA+PD-L1+	Plasmazellen	Maus, Prostata	IL-10, T-Zellinhibition	Immunochemotherapie	(Shalpour et al., 2015)
CD24hiCD27+	B10	Mensch, Blut	IL-10, supp. Th, DZ, Monozyten,	SLE, RA, Sjögren, AI Hauterkr.	(Iwata et al., 2011)

CD5+CD1dhi	B10	Maus, Milz, Mensch, Blut		Infektion, EAE (exp. Enemaphlomyelitis ai), sle,	(Horikawa et al., 2013; H. S. Kim et al., 2019; Matsushita, Horikawa, Iwata, & Tedder, 2010; Yanaba et al., 2008; X. Yang et al., 2014)
CD154+ (=CD40L)		Mensch, Blut	IL10	SLE	(Díaz-Alderete, Crispin, Vargas-Rojas, & Alcocer-Varela, 2004)
CD5+CD1dint	B2	Maus, Milz	, IL10, IL13 produzierende Typ2 innate lymphoide Zellen	Hypersensibilitätsreaktion der Haut	(H. S. Kim et al., 2019)
CD5+CD1dhiCD43-	B2	Maus	IL10, TLR, BAFF	Genitalinfekt	(Moore-Connors et al., 2015)
CD5+CD22+	B1a	Maus, peritoneal	IL10, v.a. in Remissionsphase, CD22 führt zu längerem Überleben	Kontakt-hypersensitivität	(Nakashima et al., 2010)
CD21hiCD23-	MZ	Maus, Milz	IL-10, ind. Treg, supp. Th, Zytotox T-Zellen, TLR9, CD40, TNFalpha	AI,	(Bankoti, Gupta, Levchenko, & Stäger, 2012; M. Gray, Miles, Salter, Gray, & Savill, 2007; Miles et al., 2012)
CD21hiCD23hiCD24hi	T2-MZP	Maus, Milz		SLE, RA, Tumor,	(Blair et al., 2009; Carter et al., 2011; Evans et al., 2007; Schioppa et al., 2011)
Cd23sigMhisigDhiCD21/IL35hi	MZP	Maus	IL10, CD40 Blockade erhöht diese Bregs	Transplantationstoleranz	(Lal et al., 2015)
BCR-aktiviert B220+CD86+CD40		Maus, Milz	IL10, weniger INFgamma, mehr IL10 und IL4 durch Th und Splenozyten	Diabetes	(Hussain & Delovitch, 2007)
FasL+Br220+		Maus, Milz	TGFbeta	AI Diabetes	(Tian et al., 2001)
LAP+CD80+PD-L1+	B2, TIL-B-Cells	Maus, Mamma	TGFbeta, T und NK weniger	Tumor	(Y. Zhang et al., 2016)
CD19(+) CD25(High) CD69(High) Stat3 and B7-H1(High) CD81(High) CD86(High) CD62L(Low) IgM(Int)	B2, tBreg	Maus, Lungenmetastasen MammaCA	TGFbeta, Treg mehr	Tumor	(Olkhanud et al., 2011)
25hi81hi	B2	Maus, Mamma Ca Metastase	TGFbeta	Tumor	(Bodogai et al., 2015; Lee-Chang et al., 2013)
CD1dhigh		Maus, Milz	IL10, FoxP3-Treg mehr	Allergische Atemwegserkrankung, Chronische Kolitis	(Amu et al., 2010; A. Mizoguchi, Mizoguchi, Smith, Preffer, & Bhan, 1997)
CD5+LAP+	B1, B2	Maus, LK und Bronchialsekret	TGFbeta, mehr Tregs	Allergie	(Natarajan et al., 2012; Singh et al., 2008)
CD25hiCD27hiCD86hi CD1dhi		Mensch	TGFbeta	AI	(Kessel et al., 2012)
CD5+FasL	Killer Breg	Maus		Schistosoma, Asthma, chr. Inflammation	(Lundy & Klinker, 2014)

CD5+FoxP3+	Br17, Br32	Mensch, Blut	IL10, 17, 32, TGFbeta	Food Allergy	(Noh & Noh, 2012; Noh, Noh, Kim, Kim, & Choi, 2012)
CD25+FoxP3+		Mensch, Liquor und Blut	IL10	MS, SLE	(Andrés et al., 2014; Vadasz et al., 2015)
CD21hiCD24hi		Maus	IL10	Arthritis	(Piper et al., 2019)

Tabelle 8: in der Literatur beschriebene regulatorische B-Zellen

10.3 BEISPIEL FÜR BILDERGALERIE IM INSPIRE®:

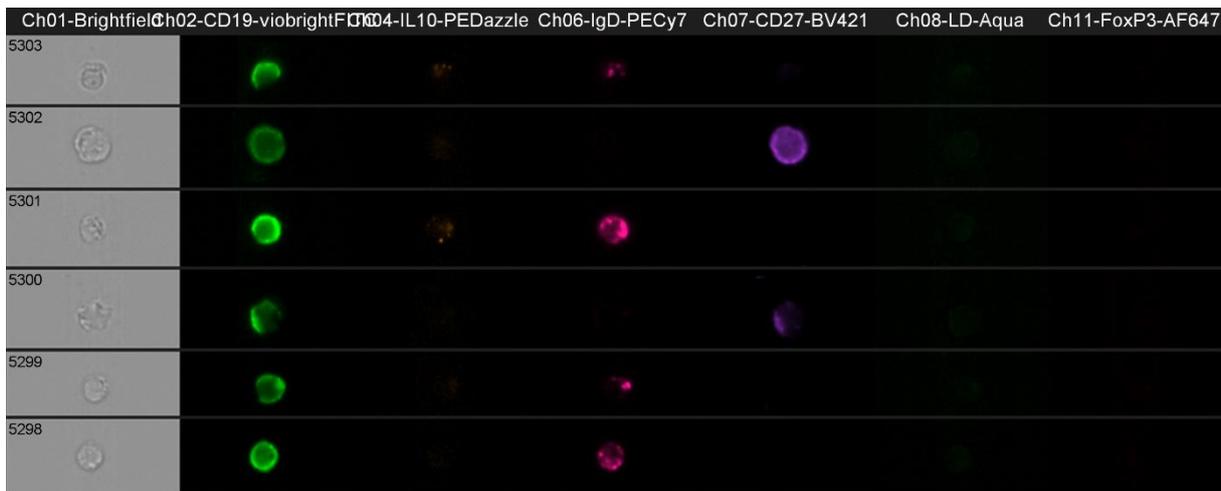


Abbildung 69: Beispiel für Bildergalerie im INSPIRE

10.4 IMAGE STREAM STAINING ANLEITUNG FÜR BREGS

1. Abnahme von 25ml Vollblut in Spritze mit 100 mikroliter Heparin
2. Ficoll Separation
 - in ein 50ml Falcon steril 15 ml Ficoll pipettieren
 - 25 ml Blut vorsichtig am Rand hineinlaufen lassen, dass sich zwei Phasen bilden
 - für 15 min bei 1500 rpm ohne Bremse zentrifugieren
 - Zellen mit Pipette absammeln und in neuem Falcon sammeln,
 - Falcon auf 50 ml mit PBS auffüllen und für 5 min bei 1500 rpm abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
3. Erylyse
 - Steril in einem 25ml Falcon 100 microliter Erylysepuffer mit 1900 microliter H₂O mili vermischen (2x)
 - Zellpellet darin resuspendieren
 - 10-15 min bei RT inkubieren
 - Erylysestopp mit FACS Puffer durchführen: auffüllen des Falcon
 - 5 min bei 1400 rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen
4. Zellzählung
 - Zellpellet in 10 ml PBS resuspendieren
 - 10 microliter abnehmen und mit 90 microliter Trypanblau vermischen
 - in Neubauerzählkammer zählen
 - Auswertung: Durchschnittswert der 4 Quadranten x 10⁶ Zellen
5. Stimulation mit B-Zellmedium
 - Zellpellet in 1 ml B-Zellmedium pro 1 mio Zellen resuspendieren

- auf 6-Wellplatten je 5 ml der Suspension geben und für 4h im Brutschrank bei 37 Grad C inkubieren
 - Zellen ernten und in ein Falcon geben
 - 5 min bei 1400 rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen
6. Vorbereitung der Lösungen
- **F_c-Block:** 1:20 in PBS herstellen, 100 microliter pro Probe
 - **Aqua-LifeDead:** 1:1000 in PBS, 100 microliter pro Probe
 - **Oberflächenstain:** 1:100 in FACS Puffer, 50 microliter pro Probe
 - **FoxP3-Fixierung:** ¼ Konzentrat + ¾ Diluent, 100 microliter pro Probe
 - **PermWash:** 1:10 in H₂O mili, 400 microliter pro Probe
7. FC-Rezeptorblock
- Zellpellet in Rezeptorblock-Lösung resuspendieren und je 100 microliter pro well in vorbereitete 96-Wellplatte geben (ein well pro Probe)
 - 15 min bei 4 Grad C inkubieren
 - mit 100 microliter kaltem PBS auffüllen
 - bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugieren und Überstand verwerfen
8. Aqua-LifeDead-Staining
- je 100 microliter pro well hinzugeben und resuspendieren
 - 30 min lichtgeschützt bei 4 Grad C inkubieren
 - je 100 microliter kaltes PBS hinzufügen
 - bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugieren und Überstand verwerfen
9. Oberflächenstaining
- je 50 microliter der Farbelösung auf ein well geben und resuspendieren
 - 30 min bei RT lichtgeschützt inkubieren
 - je 200 microliter kalten FACS Puffer hinzugeben
 - bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugieren und Überstand verwerfen
10. FoxP3-Fixierung
- je 100 microliter Fixierlösung pro Well hinzugeben und resuspendieren
 - 30 min bei RT lichtgeschützt inkubieren
 - je 100 microliter PermWash hinzugeben
 - bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugieren, Überstand verwerfen
 - je 100 microliter PermWash dazugeben und resuspendieren
 - Platte sealen und lichtgeschützt über Nacht bei 4 Grad C lagern
11. Intrazelluläre Staining
- Platte bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugieren, Überstand verwerfen
 - **IZ-Staining:** 1:50 in PermWash, 50 microliter pro Probe
 - je 50 ml der Farbelösung auf die Proben geben und resuspendieren
 - 30 min bei RT lichtgeschützt inkubieren
 - je 100 microliter PermWash hinzugeben
 - bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugieren, Überstand verwerfen
12. Vorbereitung zum Transport
- je 100 microliter PBS hinzufügen und resuspendieren
 - bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugieren, Überstand verwerfen
 - Proben in PBS resuspendieren (jede Probe sollte als Maximale Verdünnung 3 mio Zellen pro 50 microliter besitzen und es sollte auch mindestens 50 microliter sein)
 - Proben über 30 micrometer Filter in Eppis überführen
 - Proben bis zu Einlesen auf Eis oder im Kühlschrank lagern
 - vor dem Einlesen vortexen

10.5 ROHDATEN DER BREG STUDIE

Proband	Gruppe	CD19	CD19+IL10+	CD19+IL10+FoxP3+	CD19+FoxP3+	CD19+CD27+	CD19+CD27+IL10+
		B-Zellen	Breg	FoxP3-Breg	FoxP3-B-Zellen	Memory-B-Zellen	Memory-Breg
1a	HC	72083	3402	70	178	23608	538
2a	AR	136439	7924	119	211	44001	933
3a	AR+AIT	97889	5357	23	76	52478	2701
4a	HC	4801	406	1	3	1234	26
5a	AR	62540	2318	23	63	33266	1076
6a	HC	83251	4268	40	125	42432	2138
7a	HC	56644	1628	21	54	26735	584
8a	AR+AIT	74658	2918	23	42	27714	928
9a	AR	57170	2945	22	83	27050	1564

Proband	CD19+CD27+IL10+FoxP3+	CD19+CD27+IgD+	CD19+CD27+IgD+IL10	CD19+CD27+IgD+IL10+FoxP3
	FoxP3-Memory-Breg	aktivierte Memory-B-Zellen	aktivierte Memory-Breg	aktivierte FoxP3-Memory-Breg
1a	1	11161	351	23
2a	9	19680	240	11
3a	2	34234	2896	12
4a	0	597	22	0
5a	18	20715	1026	22
6a	4	21050	1195	28
7a	1	13395	563	39
8a	6	19080	685	23
9a	10	18122	987	8

Proband	CD19+CD27-	CD19+CD27-IgD-	CD19+CD27-IgD-IL10+	CD19+CD27-IgD-IL10+FoxP3+
	Non-Memory-B-Zellen	niedrigaktive Non-Memory-B-Zellen	niedrigaktive Non-Memory-Breg	niedrigaktive FoxP3-Non-Memory-Breg
1a	48470	3969	8	0
2a	92432	3801	15	3
3a	45409	4561	4	0
4a	3567	235	2	0
5a	29263	2346	10	--
6a	40817	4706	10	0
7a	30016	1772	3	0
8a	47115	1552	11	0
9a	29934	1363	3	1

Tabelle 9: Rohdaten der Breg Studie, absolute Zellzahlen

10.6 ISOTYPKONTROLLEN

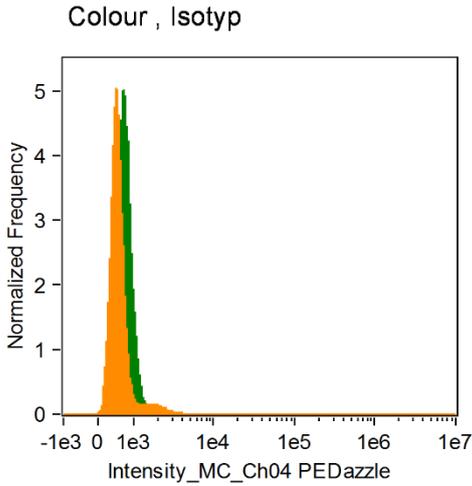


Abbildung 70: Isotypkontrolle PE-Dazzle

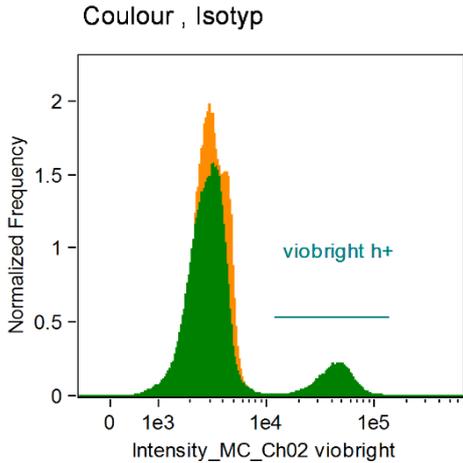


Abbildung 71: Isotypkontrolle für FITC-viobright

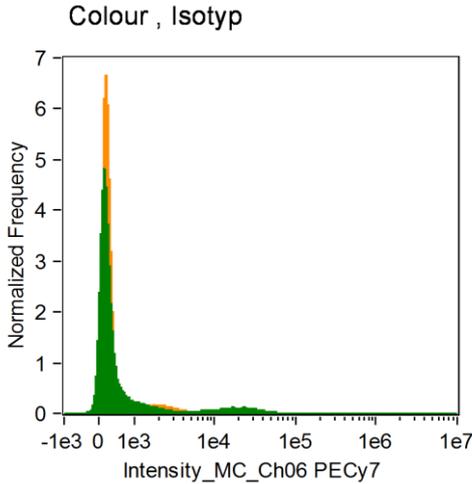


Abbildung 72: Isotypkontrolle für PE-Cy7