# Optimierung der Antikörperkonzentration für die durchflusszytometrische Charakterisierung von CIK-Zellen

**Bachelorarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades

BACHELOR OF SCIENCE (B.Sc.)

für den Studiengang

BIOTECHNOLOGIE

eingereicht an der

Hochschule Anhalt (FH)

Hochschule für angewandte Wissenschaften

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik

von

Tanja Luther

geboren am 19.01.1986 in Querfurt

| | |
|---|---|
| Betreuer: | Herr Dr. Schimmelpfennig |
| 1. Gutachter (HS Anhalt (FH)): | Herr Prof. Dr. Mägert |
| 2. Gutachter (HS Anhalt (FH)): | Herr Prof. Dr. Junghannß |
| | |
| Ausgabetermin: | 01.07.2008 |
| Abgabetermin: | 22.09.2008 |

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 7AAD | 7-Aminoactinomycin |
| APC | Antigen-Präsentierende Zellen |
| BC | Beckman Coulter |
| BD | Becton Dickinson |
| CD | Cluster of Differentiation; dt. Oberflächenmarker |
| CIK | Cytokin-induzierte Killerzellen |
| DC | Dendritische Zellen |
| ECD | R Phycoerythrin-Texas Red-X |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FL | Fluoreszenzkanal |
| FSC | Forward Scatter |
| IL-2 | Interleukin-2 |
| INF-γ | Interferon- γ |
| MHC | Major Histocompatibility Complex;<br>dt.: Haupthistokompatibilitätskomplex |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| PE | R Phycoerythrin |
| PE-Cy5 (PC5) | R Phycoerythrin –Cyanine5 |
| PMT | Photomultiplier |
| SSC | Side Scatter |

# Zusammenfassung

Die durchflusszytometrische Charakterisierung humaner Zellen nimmt in der Forschung wie auch in der Routinediagnostik eine bedeutende Rolle ein.

Wesentlicher Bestandteil dieser Untersuchungen sind Immunphänotypisierungen mit Antikörpern, die an ein Fluorochrom gekoppelt sind. Nach Bindung dieser Antikörper an spezifische Antigene können die so markierten Epitope mit Hilfe eines Durchflusszytometers detektiert werden. Fluorochrom markierte Antikörper stellen sowohl für Routine als auch Forschung einen relevanten Kostenfaktor da.

Da durch zukünftige Projekte der Arbeitsgruppe ein hoher Durchsatz an zu untersuchenden Zellen erwartet wird, war die Aufgabenstellung der hier vorliegenden Arbeit, die routinemäßig zur Immunphänotypisierung eingesetzten Fluorochrom-konjugierten Antikörpermischungen CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD19-PE, CD3-FITC/CD16+56-PE sowie dem separat vorliegenden Antikörper HLA-DR-PE-Cy5 auf eine mögliche Verdünnung (1:2, 1:5, 1:10 oder 1:20) hin zu untersuchen. Es wurde eine Dreifachfärbung durchgeführt, da alle Zellen neben den genannten Antikörpermischungen auch mit dem Antikörper CD45-ECD markiert wurden.

Ziel war es, festzustellen, ob eine Verdünnung ohne Qualitätsverluste möglich ist bzw. ab wann ein Qualitätsverlust in der Detektion bestimmter Antigene eintritt. Hierzu wurden Titrationsexperimente mit den genannten Antikörpern an *ex vivo* expandierten Cytokin-induzierten Killerzellen (CIK-Zellen) durchgeführt. CIK-Zellen stellen eine Population von T-Zellen dar, die aufgrund ihrer phänotypischen Eigenschaften (Expression der Oberflächenmarker CD8, CD16 und CD56) eine zytotoxische Wirkung gegenüber Krebszellen aufweisen. Nach Inkubation der Zellen erfolgten die Messungen an dem Durchflusszytometer FC500 der Firma Beckman Coulter.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensitäten der Verdünnungen im Vergleich zum Einsatz der Originalkonzentration. Geringer war der mit der Abnahme der Fluoreszenzintensität einhergehende Qualitätsverlust der Ergebnisse bei ausschließlicher Titration der Antikörpermischungen und Einsatz des Antikörpers CD45-ECD entsprechend der Empfehlung des Herstellers, sodass eine Verdünnung von 1:2 möglich ist.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis……...i

Zusammenfassung……ii

*1 Einleitung .....1*

1.1 Die Immuntherapie ..... 1
1.2 Cytokin-induzierte Killerzellen ..... 2
1.2.1 Klinische Studien mit CIK-Zellen ..... 2
1.2.2 Immunologische Phänotypisierung von CIK-Zellen ..... 3
1.3 Durchflusszytometrie ..... 4
1.3.1 Anwendung der Durchflusszytometrie in Forschung und Medizin ..... 5
1.3.2 Aufbau eines Durchflusszytometers ..... 5
1.3.3 Prinzip des Messvorganges ..... 7
1.4 Ziel der Arbeit ..... 8

*2 Materialien und Methoden.....9*

2.1 Materialien ..... 9
2.1.1 Geräte ..... 9
2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien ..... 9
2.1.3 Antikörper ..... 10
2.2 Methoden ..... 10
2.2.1 Zellkultur ..... 10
2.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten aus Frischblut ..... 10
2.2.1.2 Generierung und Kultivierung von CIK-Zellen ..... 11
2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von CIK-Zellen ..... 11
2.2.2 Durchflusszytometrie ..... 12
2.2.2.1 Zellaufbereitung ..... 12
2.2.2.2 Fluorochrome ..... 13
2.2.2.3 Einsatz der Antikörper ..... 13
2.2.2.4 Färbung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern ..... 14
2.2.2.5 Datenerhebung ..... 16
2.2.2.6 Datenanalyse ..... 17

*3 Ergebnisse .....20*

3.1 Generierung von CIK-Zellen ..... 20
3.2 FACS-Analyse von CIK-Zellen ..... 21

3.2.1 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse von CIK-Zellen aus einer heterogenen Zellpopulation ..... 21
3.2.2 Immunphänotypische Charakterisierung der CIK-Population ..... 23
3.2.2.1 Färbung mit CD3-FITC/CD4-PE/CD45-ECD-Antikörpern ..... 24
3.2.2.2 Färbung mit CD3-FITC/CD8-PE/CD45-ECD-Antikörpern ..... 28
3.2.2.3 Färbung mit CD3-FITC/CD19-PE/CD45-ECD-Antikörpern ..... 32
3.2.2.4 Färbung mit CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-ECD-Antikörpern ..... 34
3.2.2.5 HLA-DR-PE-Cy5/CD45-ECD ..... 37
3.2.3 Titration der Antikörpermischungen CD3/CD4; CD3/CD8; CD3/CD19; CD3/CD16+56 und des Antikörpers HLA-DR bei Einsatz des unverdünnten CD45-Antikörpers ..... 40
3.2.4 Auswertung der Berechnung der Gesamtdifferenz der Verdünnungen zur Originalkonzentration ..... 51

*4 Diskussion .....53*

I Literaturverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

Anhang I Technische Spezifikation des FC500 von Beckman Coulter

Anhang II Antigene Koexpression von Leukozyten des Blutes

*Danksagung*

*Eidesstattliche Erklärung*

# 1 Einleitung

Jedes Jahr erkranken 436.000 Menschen in Deutschland neu an bösartigen Tumoren, 211.500 Menschen sterben daran[1]. Damit stellen Krebserkrankungen hinter Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesart dar. Bisherige Therapien scheitern jedoch oft nicht an dem Tumor selbst, sondern an der Eigenschaft der Tumorzellen, sich in den Gefäßen des menschlichen Körpers bewegen zu können und neue Kolonien von Krebszellen zu bilden[2]. Diese Fähigkeit zur Bildung sekundärer Tumore, die als Metastasierung bezeichnet wird, ist die gefährlichste Eigenschaft von Krebs, denn es sind die Metastasen, die verantwortlich für ca. 90% der Todesfälle sind[3]. Deshalb genügt oft die operative Entfernung des Primärtumors allein nicht aus, und häufig angewendete Standardtherapien, wie die Strahlen- und die Chemotherapie, führen nicht immer zu einer Heilung. Zudem bringen sie eine erhebliche Belastung für den menschlichen Körper mit sich.

Die Entwicklung neuartiger Strategien zur effektiven und gleichzeitig schonenderen Behandlung von Tumorpatienten ist damit unabdingbar. Neue Ansätze liegen in immunologischen Therapieverfahren, da in den letzten Jahren Kenntnisse über das Immunsystem und dessen Rolle bei Krebserkrankungen gewachsen sind.

## 1.1 Die Immuntherapie

Unter einer Immuntherapie versteht man verschiedene Behandlungsformen, die das Immunsystem des Menschen und dessen Mechanismen für die Behandlung gegen Krebs nutzen. Erste Ansätze einer Immuntherapie gab es bereits in den 1970er Jahren, als Patienten Tumorzellen entnommen und in abgeschwächter Form als Impfstoff dem Körper zurückgeführt wurden[4].

Heutzutage unterscheidet man in der medizinischen Anwendung einer Immuntherapie drei prinzipielle Methoden: die passive Immuntherapie, bei der dem Patienten spezifische Antikörper verabreicht werden; die aktive Immuntherapie, bei der die Immunzellen auf die Bekämpfung des Tumors angesetzt werden sowie die Transplantation von Stammzellen.

Die Arbeitsgruppe Immuntherapie/Hämatologie/Onkologie legt ihren Schwerpunkt in der Forschung auf die aktive zelluläre Immuntherapie. Diese zielt nicht auf die bloße

Immunstimulation des Patienten ab, sondern soll hochspezifisch gegen den Tumor wirken. Genutzt werden hierbei zum einen dendritische Zellen (DC) und zum anderen Cytokin-induzierte Killerzellen (CIK), wobei sich diese Arbeit nur auf Cytokin-induzierte Killerzellen konzentriert.

## 1.2 Cytokin-induzierte Killerzellen

Cytokin-induzierte Killerzellen stellen eine heterogene Population von Effektorzellen dar, die aus peripheren mononukleären Blutzellen durch Zusatz von Interferon-γ (INF-γ), Interleukin-2 (IL-2) und einem monoklonalen Antikörper gegen CD3, Okt3, expandiert werden[5, 6, 7]. Ihre Besonderheit besteht darin, dass sie funktionelle und phänotypische Eigenschaften sowohl von T-Zellen als auch von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) besitzen, weshalb man sie als natürliche Killer-T-Zellen (NKT) bezeichnet. Anders als reine T-Zellen, die für die Entfaltung ihrer zytotoxischen Aktivität die Darbietung von MHC (Major Histocompatibility Complex)-Molekülen seitens Antigen-Präsentierender Zellen benötigen, sind CIK-Zellen unabhängig vom Haupthistokompatibilitätskomplex. Sie sind leicht zu expandieren und besitzen eine hohe Zytotoxizität gegenüber Krebszellen, was sie zu potentiellen Kandidaten in der klinischen Anwendung macht.

### 1.2.1 Klinische Studien mit CIK-Zellen

1991 führten Schmidt-Wolf et. al Versuche mit SCID Mäusen (immundefiziente Mäuse) durch, die zeigten, dass CIK-Zellen eine hohe Toxizität gegenüber Lymphom-Zellen, jedoch nur eine geringe Toxizität gegenüber blutbildenden Vorläuferzellen aufwiesen[8]. Folgestudien zeigten ähnlich gute Resultate. Eine Studie aus dem Jahr 2004 bestätigte, dass CIK-Zellen den immunologischen Status in HCC-Patienten erhöhen [5]. Eine weitere Phase-I Studie mit Patienten, die an fortgeschrittener Hodgkin-Krankheit bzw. am Non-Hodgkin Lymphom leiden, ergab, dass die Behandlung mit CIK-Zellen für Hoch-Risiko Patienten nach autologer Transplantation von Vorteil ist[6].
Neben der hohen zytotoxischen Wirkung gegen Krebszellen wurde in den Studien auch nachgewiesen, dass die Nebenwirkungen gering sind und mehrfache Infusionen mit einer durchschnittlichen Zellzahl von $12{,}4 \times 10^6$ Zellen/kg gut von Patienten vertragen werden[9].

Um CIK- und andere Effektorzellen präklinisch und klinisch zum Einsatz zu bringen, ist es wesentlich, sie vorab phänotypisch und funktionell genau zu charakterisieren.

### 1.2.2 Immunologische Phänotypisierung von CIK-Zellen

Unter Immunphänotypisierung versteht man die Analyse der Expression verschiedener Antigene auf Zellen, mit deren Hilfe man Aussagen zur Zugehörigkeit von Zellen zu einem bestimmten Zelltyp sowie deren Differenzierungsgrad treffen kann. Diese immunphänotypische Analyse wurde ermöglicht mit dem Beginn der Produktion monoklonaler Antikörper im Jahr 1975, etabliert durch G. Köhler und C. Milstein, die Hybridzellkulturen aus murinen Myelom- und Milzzellen herstellten[10]. Monoklonale Antikörper sind Plasmaproteine, deren einzigartige Struktur es ermöglicht, spezifisch an Antigene zu binden[11]. Gruppen von monoklonalen Antikörpern, die dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen, werden als Cluster of Differentiation (CD) bezeichnet.
In der klinischen Diagnostik spielt die Immunphänotypisierung eine entscheidende Rolle bei der Einschätzung des Status eines Patienten. Die Analyse findet z. B. Anwendung bei Erkrankungen wie Leukämien bzw. malignen Lymphomen. So sind frühzeitig Befunde und eine Aussage über die Prognose sowie das Anschlagen von Therapien möglich[12].
Im Rahmen der Forschung und nachfolgenden klinischen Anwendung von Zelltherapeutika ist die Kenntnis über die Expression entsprechender Zelloberflächenmarker essentiell für die Klassifizierung und genaue Charakterisierung des jeweiligen Differenzierungsgrades der Zellpopulationen bzw. einzelner Zellen. Die für die Immunphänotypisierung von CIK-Zellen bedeutsamen CD-Marker sind in Tabelle 1 aufgeführt.
Im Rahmen der Generierung von CIK-Zellen entwickeln sich im Verlauf der Differenzierung aus zu Beginn stark $CD3^+CD4^+$-exprimierenden T-Lymphozyten T-Zellen mit einem zytotoxischen Phänotyp ($CD3^+CD8^+$ sowie $CD3^+CD16^+$ und $CD3^+CD56^+$). CIK-Zellen setzen sich nach abgeschlossener Differenzierung zu ca. 10% aus $CD3^+CD4^+$, zu 70-80% aus $CD3^+CD8^+$ sowie zu 10-15% aus $CD3^+CD56^+$-Zellen zusammen[7]. Zellen mit diesem Phänotyp zeigen hohe Proliferationsraten und vermitteln eine starke Zytotoxizität.

**Tabelle 1. Wichtige CD-Antigene für die Immunphänotypisierung von CIK-Zellen[13].**

| CD-Antigen | Exprimierender Zelltyp | Funktion |
|---|---|---|
| **CD3** | Thymozyten, T-Zellen | assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen (TCR), notwendig für die Zelloberflächen-expression und Signalübertragung des TCR |
| **CD4** | einige Thymozyten, TH1 und TH2 Zellen (T-Helferzellen), Monozyten, Makrophagen | Korezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle |
| **CD8** | einige Thymozyten, NK-Zellen zytotoxische T-Zellen | Korezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle |
| **CD16** | neutrophile Zellen, NK-Zellen, Makrophagen | Bestandteil des niedrigaffinen Fc-Rezeptors FcγRIII, vermittelt Phagozytose und Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität |
| **CD19** | B-Zellen | bildet Komplex mit CD21und CD81; Korezeptor für B-Zellen |
| **CD45** | alle hämatopoetischen Zellen | Tyrosinphosphatase; erhöht die Signal-vermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen |
| **CD56** | NK-Zellen | Adhäsionsmolekül |
| **HLA-DR** | Vorläuferzellen, B-Zellen, Monozyten, aktivierte T-Zellen | HLA-Klasse-II-Rezeptor |

Die immunphänotypische Charakterisierung gibt Auskunft über die prozentuale Verteilung der Markerexpression der *ex vivo* expandierten CIK-Zellen und liefert damit eine Aussage hinsichtlich der Zytotoxizität und der potentiellen Wirksamkeit der CIK-Zellen. Dies spielt vor allem eine Rolle für die Entwicklung geeigneter Therapien für Patienten.

## 1.3 Durchflusszytometrie

Im Jahr 1965 entwickelte Mack Fulwyler (Los Alamos National Laboratory, New Mexiko) den Prototyp eines Zell-Sortierers, der Vibrationen nutzte, um Tropfen aus einer Suspension zu erhalten[14]. Leonard Herzenberg et al. adaptierten Fulwyler`s Erfindung und entwickelten eine Maschine, die Zellen anhand der An- oder Abwesenheit von mit Fluoreszenzen gekennzeichneten Oberflächenmolekülen sortierte, das erste Beispiel für einen „Fluorescense Activated Cell Sorter“ (FACS)[14]. Becton Dickinson (BD) patentierte die

Erfindung und entwickelte das erste kommerzielle Gerät, womit auch der Begriff „FACS“ seither geschützt ist.

### 1.3.1 Anwendung der Durchflusszytometrie in Forschung und Medizin

Umfassende Relevanz in der klinischen Forschung und Anwendung erhielt die Durchflusszytometrie vor allem durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper[15].
Die FACS-Analyse spielt durch die Beurteilung von Zelloberflächenmarkern eine wichtige Rolle in der Routinediagnostik hämatologischer Erkrankungen. 1987 wurde erstmals demonstriert, dass anhand der Anzahl von CD4 T-Zellen die Beobachtung des Erkrankungsverlaufes von HIV möglich war[16, 17].
Heutzutage finden sich neben dem Einsatz in der klinischen Diagnostik auch zahlreiche neue Anwendungen in Gebieten wie der Detektion apoptotischer Zellen[18] bzw. der Analyse zellulären DNA-Inhaltes[19], aber auch bei der Gen- und Cytokinexpression sowie der Zellbiochemie[20]. Neben diesen Möglichkeiten können auch Kinase- und Phosphataseaktivität sowie die Redoxaktivität von Enzymen in individuellen Zellen gleichzeitig zur Immunphänotypisierung gemessen werden[15]. Dies wird hauptsächlich ermöglicht durch die fortlaufende Entwicklung neuer Hard- und Software, von monoklonalen Antikörpern sowie neuartiger Fluorochrome (z.B. Tandem-Konjugate)[14].
Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die immunphänotypische Charakterisierung von CIK-Zellen.

### 1.3.2 Aufbau eines Durchflusszytometers

Durchflusszytometer bestehen generell aus drei wesentlichen Teilen: dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System und der Signalverarbeitung (Abbildung 1). Das Flüssigkeitssystem transportiert die Zellen zum Messpunkt, wo sie von einem Laser erfasst und angeregt werden. Zur Optik gehört mindestens ein Argon-Laser (Blaulaser) mit 488nm Anregungswellenlänge. Viele der Geräte besitzen heutzutage jedoch mehr als nur einen Laser. Bei der Signalverarbeitung werden die optischen Signale (Photonen) mittels

Photomultiplier (PMT) in elektronische Signale umgewandelt, um so im Computer digitalisiert werden zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem FACS-Gerät FC500 von Beckman Coulter gearbeitet (Abbildung 2). Dieses Durchflusszytometer besitzt neben dem Argon-Laser einen zweiten HeNe-Laser (Rotlaser) mit 635nm Anregungswellenlänge, die es in Kombination mit verschiedenen optischen Spiegeln und Filtern ermöglichen, ein großes Spektrum von Fluorochromen parallel (bis zu 5fach-Färbungen einer Zelle), d.h. in ein- und demselben experimentellen Ansatz, zu analysieren. Dies ist entscheidend für die Mehrfachfärbung von Zellen, die in dieser Arbeit Anwendung fand (siehe Punkt 2.2.2.4). Im Anhang I ist die genaue technische Spezifikation dieses FACS-Gerätes dargestellt.

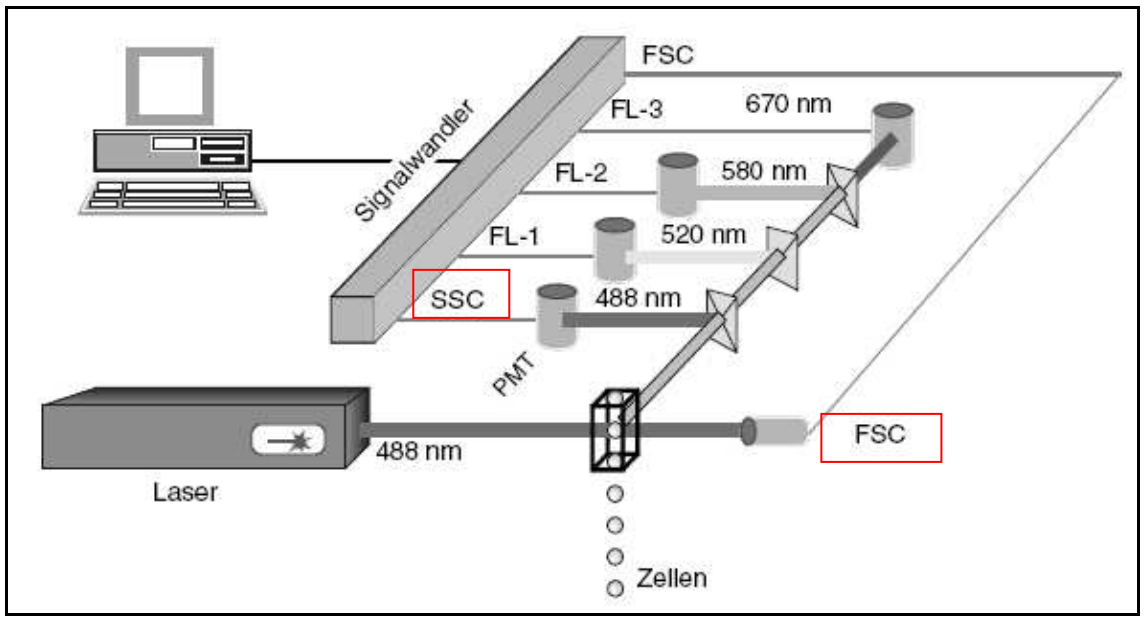


**Abbildung 1. Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers. Am Kreuzungspunkt eines Laser-Strahls mit dem Probenstrom wird während der Passage einzelner Zellen Licht gestreut und Fluoreszenzen angeregt. Das FSC (Forward Scatter) wird als Maß der Zellgröße detektiert, SSC (Sideward Scatter) steht für die Zellgranularität[21].**

**Abbildung 2. Durchflusszytometer FC 500 von Beckman Coulter.**

### 1.3.3 Prinzip des Messvorganges

Die durchflusszytometrische Analyse basiert auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen in dem Moment, in dem die Zellen einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laser-Strahl passieren[21].

Voraussetzung für die Charakterisierung einzelner Zellen ist, dass diese nicht gleichzeitig, sondern nacheinander den Laserstrahl passieren. Dies gelingt durch einen Prozess, der als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird. Hierbei wird der eigentliche Probenstrahl in einen Hüllstrom injiziert („Sheath"-Lösung) und von diesem eingeschlossen. Der Druck der Trägerflüssigkeit fokussiert den Probenstrahl so, dass die Zellen den Laser einzeln durchqueren.

Bei der Messung des Streulichtes unterscheidet man zwei verschiedene Arten: das Seitwärtstreulicht (Side Scatter; SSC), welches in einem 90° Winkel zum Laser verläuft und annähernd proportional zur Granularität der Zelle ist; und das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter; FSC), welches in engem Winkel zum Laser verläuft und Auskunft über die Größe der Zelle gibt (Abbildung 1, rote Kästchen). Bereits mit diesen beiden Eigenschaften lassen sich Zelltypen einer heterogenen Population unterscheiden, wie Monozyten, Lymphozyten und Granylozyten.

Zur Identifizierung weiterer Subpopulationen nimmt man CD-Antigene zu Hilfe (Immunphänotypisierung). Hierbei ist eine eindeutige Beschreibung der Zellen wichtig, da viele Antigene auf mehreren Populationen von Zellen des Blutes exprimiert werden (Anhang II). Daher führt nur eine Kombination aus mehreren Antikörpern zu einer eindeutigen Beschreibung der Zellen[21].
Auf die Problematik der Messung und Auswertung wird ausführlich im Kapitel Materialien und Methoden, Punkt 2.2.2 Durchflusszytometrie, eingegangen.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Durch künftige Projekte wird ein hoher Durchsatz an durchflusszytometrisch zu untersuchenden CIK-Zellen erwartet. Hierfür sind Fluorochrom-gekoppelte Antikörper notwendig, die einen hohen Kostenfaktor darstellen.
Da Antikörper erfahrungsgemäß ausgehend von der Empfehlung des Herstellers noch verdünnt werden können, war das Ziel der hier vorgelegten Untersuchung, an verschiedenen Chargen von CIK-Zellen unterschiedliche Konzentrationen der routinemäßig zur Immunphänotypisierung im Labor eingesetzten Antikörper zu testen. Aufgrund der erlangten Ergebnisse sollte eine Festlegung getroffen werden, in welcher Konzentration diese Antikörper ohne Qualitätsverluste künftig eingesetzt werden können. Hierzu wurden die Verdünnungen 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 überprüft.
Die Arbeit sollte so zu einem ressourcensparenden Umgang mit den Antikörpern beitragen.

# 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

Es wurden Einwegmaterialien der Firmen Greiner bio-one, VWR und Corning verwendet.

### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 2. Liste der verwendeten Geräte sowie deren Hersteller.**

| Gerät | Firma |
|---|---|
| Zentrifuge 3S-R Heraeus | Thermo Scientific |
| Inkubator | Thermo Scientific |
| Sterile Werkbank Hera Cell 240 | Thermo Scientific |
| Wasserbad | CFL |
| Mikroskop Leica DMIL mit Kamera EC3 | Leica |
| Neubauer-Zählkammer | |
| FACS-Gerät FC500 | Beckman Coulter |

### 2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien

Für die Kultivierung der Zellen kam AIMV®-Medium (serumfrei, Invitrogen) zum Einsatz, dem 10% AB-Serum (Herstellung aus AB-Plasma) zugesetzt wurde.

Tiefgefrorenes AB-Plasma wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. Die sich anschließende Hitzeinaktivierung erfolgte bei 56°C für 30 Minuten ebenfalls im Wasserbad. Nach einmaliger Zentrifugation bei 600g und 10 min wurde der Überstand erneut zentrifugiert und das Pellet verworfen. Das AB-Serum wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Folgende Zusätze wurden zur Stimulierung der Zellen genutzt.

**Tabelle 3. CIK-Zell-Stimuli.**

| Reagenzien | Hersteller-bezeichnung | Konzentration | Firma |
|---|---|---|---|
| IL-2 | Proleukin S® | 18x10^6 IU | Novartis |
| INFγ | Imukin® | 2x10^6 IU | Boehringer Ingelheim |
| antiCD3-Antikörper | Okt3® | 1mg/ml | Janssen-Cilag |

Reagenzien, die während der Zellkulturarbeiten Anwendung fanden.

| | |
|---|---|
| PBS (1x) | Invitrogen |
| Lymphoprep® (Dichte 1,077) | Fresenius |
| Trypanblau (0,4%) | Invitrogen |
| DMSO (99,5%) | Sigma |

### 2.1.3 Antikörper

**Tabelle 4. Liste der verwendeten Antikörper. Antikörpermischungen sind mittels "/" dargestellt.**

| Antikörper | Isotyp (Maus) | Klon | Firma |
|---|---|---|---|
| **CD3-FITC/CD4-PE** | IgG1 | UCHT1/13B8.2 | BC |
| **CD3-FITC/CD8-PE** | IgG1 | UCHT1/B9.11 | BC |
| **CD3-FITC/CD19-PE** | IgG1 | UCHT1/J3-119 | BC |
| **CD3-FITC/CD16/56-PE** | IgG1 | UCHT1/3G8/N901 | BC |
| **CD45-ECD** | IgG1 | J33 | BC |
| **HLA-DR-PE-Cy5** | IgG2a | G46-6 | BD |
| **Isotyp IgG1-FITC** | IgG1 | 15H6 | BC |
| **Isotyp IgG1-PE** | IgG1 | 15H6 | BC |
| **7AAD** | - | - | BC |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### *2.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten aus Frischblut*

Die Zellisolierung erfolgte über eine Dichtegradienten-Zentrifugation. Heparinisiertes Vollblut eines gesunden Probanden wurde mit 1% AB-Serum/PBS zu gleichen Teilen verdünnt. Anschließend wurde in einem Zentrifugenröhrchen ein Teil des Trennmediums Lymphoprep® vorgelegt und vorsichtig mit zwei Teilen Blut überschichtet. Eine Phasenvermischung ist zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 800g für

30 Minuten ohne Bremse, woraufhin sich im Röhrchen vier unterschiedliche Phasen abzeichneten: eine obere Plasmaschicht; darunter eine abgegrenzte Bande, die die Lymphozyten enthält; nachfolgend das Trennmedium sowie am Röhrchenboden das Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten.
Die Lymphozyten-enthaltende Interphase wurde mittels Pasteurpipette abgesaugt und in ein neues Röhrchen überführt. Dieses wurde zweimal mit 1% AB-Serum/PBS aufgefüllt und für 10 min bei 200g zentrifugiert. Daran an schlossen sich die Resuspension des Zellpellet in Kulturmedium sowie die Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Kammer. Des Weiteren erfolgte eine Vitalitätsbestimmung mit Hilfe der Trypanblaufärbung. Trypanblau ist ein Lebendfarbstoff, der durch poröse Membranen in tote Zellen eindringt und dort mit der DNA interkaliert. So werden nur alle toten Zellen blau angefärbt.

#### *2.2.1.2 Generierung und Kultivierung von CIK-Zellen*

Nach der Isolierung der Lymphozyten wurden die Zellen mit einer Dichte von $3{,}0x10^6$/ml in T25-Flaschen in AIMV-Medium mit 10% AB-Serum ausgesetzt.
Die Lymphozyten wurden an Tag 0 durch Zugabe von 2000U/ml INF-γ stimuliert. An Tag 1 wurden 50ng/ml OKT3 und 1000U/ml IL-2 hinzu gegeben. Jeden 3.Tag erfolgte eine erneute Zugabe von IL-2 (1000U/ml). Die Zelldichte wurde im weiteren Verlauf durch regelmäßiges Splitten der Zellen konstant bei $0{,}5x10^6$ Zellen/ml gehalten.
Der gesamte Kultivierungszeitraum für CIK-Zellen betrug 14 Tage.

#### *2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von CIK-Zellen*

Kryokonservierung
Die Gesamtzellsuspension wurde bei 200g für 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Teil des Überstandes (konditioniertes Medium) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspension des Pellet in zuvor hergestelltem und gekühltem Einfriermedium (80% AB-Serum, 10% konditioniertes Medium, 10% DMSO). Je $4x10^7$ Zellen/ml wurden in Kryovials pipettiert und diese in eine vorgekühlte Einfrierbox über Nacht bei -80°C gelagert und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen

Da nicht immer ein Zugriff auf frische CIK-Zellen an Tag 14 bestand, wurde auf kryokonservierte Zellen zurückgegriffen. Die Arbeitsgruppe Schimmelpfennig leistete hier bereits Vorarbeit und konnte zeigen, dass die Kryokonservierung keinen negativen Einfluss auf die Eigenschaften und Immunphänotypisierung der Zellen hat[7].

Die Zellen wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein Röhrchen mit 10 ml PBS überführt. Zur Entfernung des bei höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkenden DMSO erfolgten zwei Waschgänge bei 200g für 5 min. Das Pellet wurde in 2 ml AIMV®-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden nachfolgend in T75-Flaschen mit $1x10^6$ Zellen pro Milliliter ausgesetzt und bei 37°C und 5% $CO_2$ kultiviert.

### 2.2.2 Durchflusszytometrie

Alle Messungen am Durchflusszytometer erfolgten ausschließlich mit humanen CIK-Zellen. Diese wurden einerseits frisch aus Vollblut isoliert, stimuliert und bis Tag 14 kultiviert (siehe 2.2.1.1 und 2.2.1.2). Andererseits wurden kryokonservierte Zellen (siehe 2.2.1.3) von Tag 14 nach zweitägiger Kultivierung genutzt. Diese zweitägige Kultivierung nach Auftauen kryokonservierter Zellen diente der Regenerierung der CIKs.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit oberflächenepitopspezifischen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern angefärbt. Ist das zu untersuchende Epitop vorhanden, bindet der Antikörper und die emitierte Fluoreszenz der durch einen Laser angeregten Fluorochrome wird mit dem Durchflusszytometer detektiert.

#### *2.2.2.1 Zellaufbereitung*

Es gibt drei Möglichkeiten, Zellen mit einem Fluorochrom zu markieren: 1) die direkte Methode, bei der ein Fluorochrom an einen Antikörper gekoppelt ist; 2) die indirekte Methode, bei der ein erster Antikörper (Primärantikörper) durch einen zweiten (Sekundärantikörper), an den ein Fluorochrom gekoppelt ist, detektiert wird und 3) die intrazelluläre Färbung, bei der zum Beispiel das Protein Green Fluorescent Protein intrazellulär exprimiert und detektiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die direkte Markierungsmethode angewendet, die den Vorteil geringer unspezifischer Bindungen hat.

#### *2.2.2.2 Fluorochrome*

Fluorochrome absorbieren das Licht einer bestimmten Wellenlänge (Absorptionsspektrum) und werden so auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen auf das Grundniveau emittieren sie Licht höherer Wellenlänge (Emissionsspektrum). Da sich die Spektren verschiedener Fluorochrome überlappen, setzt man zur Trennung der einzelnen Farbstoffe Farbteilerspiegel und Bandpassfilter ein. Die spektral unterschiedlichen Lichtsignale werden dann über so genannte Photomultiplier (PMT) detektiert, die das Licht in elektrische Signale umwandeln. Einer üblichen Nomenklatur folgend werden die Detektoren mit zunehmendem spektralem Abstand vom Anregungslicht nummeriert (FL1, FL2,…)[21]. In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome mit ihrer Anregungs- und Emissionswellenlänge dargestellt.

**Tabelle 5. Darstellung der genutzten Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionswellenlängen sowie dem Fluoreszenzkanal, von welchem sie detektiert werden.**

| Farbstoff | Abkürzung | Absorptions-wellenlänge | Emissions-wellenlänge | Kanal |
|---|---|---|---|---|
| Fluorescein isothiocyanate | FITC | 488 nm | 525 nm | FL1 |
| R Phycoerythrin | PE | 488 nm | 575 nm | FL2 |
| R Phycoerythrin-Texas Red-X | ECD | 488 nm | 613 nm | FL3 |
| 7-Aminoactinomycin | 7AAD | 488 nm | 655 nm | FL4 |
| R Phycoerythrin –Cyanine5 | PE-Cy5 (PC5) | 565 nm | 670 nm | FL4 |

#### *2.2.2.3 Einsatz der Antikörper*

Es wurde generell eine Dreifachfärbung der Zellen durchgeführt, d.h. in jedem Ansatz erfolgte die Detektion dreier verschiedener CD-Antigene. Gemeinsam war allen Ansätzen eine Färbung mit dem CD45-ECD-Antikörper, wobei CD45 den generellen Leukozyten-Marker darstellt. Die weiteren Antikörper (Tabelle 6) lagen, bis auf HLA-DR-PE-Cy5, bereits als Fluorochrom-konjugierte Antikörpermischungen – bestehend aus zwei Antikörpern - vor.

**Tabelle 6. Übersicht über die verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper mit ihren Konzentrationsangaben**

| Antikörper | Konzentration |
|---|---|
| **CD3-FITC/CD4-PE** | 20µl /$10^6$ Zellen* |
| **CD3-FITC/CD8-PE** | 20µl /$10^6$ Zellen* |
| **CD3-FITC/CD19-PE** | 20µl /$10^6$ Zellen* |
| **CD3-FITC/CD16/56-PE** | 20µl /$10^6$ Zellen* |
| **CD45-ECD** | 10µl /$10^6$ Zellen* |
| **HLA-DR-PE-Cy5** | 20µl/ $10^6$ Zellen* |
| **Isotyp IgG1-FITC** | 10µl (1mg/1ml)/$10^6$ Zellen |
| **Isotyp IgG1-PE** | 10µl (1mg/1ml)/ $10^6$ Zellen |
| **7AAD** | 10µl/$10^6$ Zellen |

*Da es sich hierbei um diagnostische Antikörper handelt, werden von Herstellerseite keine genaueren Angaben zur Konzentration der Antikörper gemacht.

### *2.2.2.4 Färbung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern*

Nach der Zellernte (Zentrifugation bei 200g; 5 min) und Resuspension des Zellpellet in PBS wurde die Gesamtzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für jede Färbung wurden $2x10^5$ Zellen in 100µl PBS eingesetzt. Entsprechend wurden für 10 Färbungen $2x10^6$ Zellen in 1 ml PBS vorgelegt. Dieser Gesamtansatz wurde mit humanem Fc-Block (10µl/$1x10^7$Zellen) behandelt und für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Die Vorbehandlung der Zellen mit Fc-Block führt zu einer starken Reduktion unspezifischer Bindungen im Rahmen der nachfolgenden Antikörper-Inkubation.

Die gewünschten Antikörper (Tabelle 6) wurden in die FACS-Röhrchen vorgelegt. Nach Zugabe der mit Fc-Block-behandelten Zellen (pro FACS-Röhrchen: 100µl mit $2x10^5$ Zellen) erfolgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei 4°C. Daran an schloss sich das Waschen der Zellen mit PBS bei 200g für 5 min. Das Zellpellet wurde nachfolgend in 500µl PBS aufgenommen und mit dem Farbstoff 7AAD (2µl/Ansatz) versetzt. 7AAD ist ein Zellfarbstoff, der tote Zellen markiert, indem er durch die poröse, nicht mehr intakte Zellmembran toter Zellen eindringt und mit der DNA interkaliert. Da tote Zellen Fluorochrom-konjugierte Antikörper unspezifisch binden, ist diese Färbung auch essentiell, um bei der Messung diese von lebenden und damit relevanten Zellen unterscheiden zu können. Es ist zu beachten, dass die Ansätze, die mit dem Antikörper HLA-DR-PE-Cy5 gefärbt wurden, keinen Zusatz von 7AAD erhielten, da beide Farbstoffe aufgrund ihrer

Emissionswellenlängen (Tabelle 5) im selben Fluoreszenzkanal detektiert werden und man aus diesem Grund die Fluoreszenzsignale nicht voneinander trennen kann.

Im Rahmen der durchgeführten Antikörpertitration wurden nachfolgend aufgeführte Antikörpermengen (Tabelle 7) eingesetzt. Eine Konzentrationsangabe ist an dieser Stelle nicht möglich, da diese von Herstellerseite bei diagnostischen Antikörpern nicht erfolgt.

Zusätzlich wurden Isotyp-Kontrollfärbungen für IgG1 (IgG1-FITC und IgG1-PE) zur Analyse unspezifischer Antikörperbindungen durchgeführt. Dieser Antikörper misst die unspezifische Bindung der jeweiligen Antikörperklasse an die zu untersuchende Zelle und wird daher Isotyp-Kontrolle genannt. Pro CIK-Charge erfolgten 26 Messungen, wobei ein Ansatz einem FACS-Röhrchen gleichzusetzen ist. Insgesamt sind vier verschiedene CIK-Zell-Chargen analysiert wurden.

**Tabelle 7. Die zur Antikörpertitration verwendeten Ansätze.**

| Ansatz Nr. | Antikörper | Verdünnung |
|---|---|---|
| **1** | **Isotyp-Kontrolle IgG1-FITC/ IgG1-PE** | Originalangabe |
| **2** | **CD3-FITC/CD4-PE** | Originalangabe |
| **3** | CD3CD4 | 1:2 |
| **4** | CD3CD4 | 1:5 |
| **5** | CD3CD4 | 1:10 |
| **6** | CD3CD4 | 1:20 |
| **7** | **CD3-FITC/CD19-PE** | Originalangabe |
| **8** | CD3CD19 | 1:2 |
| **9** | CD3CD19 | 1:5 |
| **10** | CD3CD19 | 1:10 |
| **11** | CD3CD19 | 1:20 |
| **12** | **CD3-FITC/CD8-PE** | Originalangabe |
| **13** | CD3CD8 | 1:2 |
| **14** | CD3CD8 | 1:5 |
| **15** | CD3CD8 | 1:10 |
| **16** | CD3CD8 | 1:20 |
| **17** | **CD3-FITC/CD16+56-PE** | Originalangabe |
| **18** | CD3CD16+56 | 1:2 |
| **19** | CD3CD16+56 | 1:5 |
| **20** | CD3CD16+56 | 1:10 |
| **21** | CD3CD16+56 | 1:20 |
| **22** | **HLA-DR-PE-Cy5** | Originalangabe |
| **23** | HLA-DR | 1:2 |
| **24** | HLA-DR | 1:5 |
| **25** | HLA-DR | 1:10 |
| **26** | HLA-DR | 1:20 |

*2.2.2.5 Datenerhebung*

Zur Qualitätssicherung erfolgte vor jeder Messung ein so genannter Flow Check. Hierbei werden mit fluoreszierenden-Referenz-Beads (= Fluorochrom-konjugierte Latexkügelchen, Beckman Coulter) die einzelnen Fluoreszenzkanäle mit Kalibrierungs-Plots auf ihre Genauigkeit hin geprüft und die Ergebnisse mit den Toleranzgrenzen verglichen. Starke Abweichungen lassen sich so erkennen und durch Neukalibrierung des Gerätes beheben, wodurch Schwankungen zwischen Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten minimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Geräte-spezifischen Aquisition-Software CXP (Version 2.2, 2006) von Beckman Coulter für alle Messungen eine Messvorlage (= Messprotokoll) erstellt, welches durchgängig Anwendung fand. Diese Messvorlage umfasste alle Geräteeinstellungen im Rahmen der Messungen. Außerdem wurden in ihr die zur Darstellung der analysierenden Zellpopulationen dazugehörigen so genannten Plots abgelegt und entsprechende Messparameter genau definiert.

Jeder Titrationsansatz verlief so, dass zunächst die Isotyp-Kontrollen (Negativ-Kontrolle) gemessen wurden. Es folgten die einzelnen Antikörpermischungen (Tabelle 7) beginnend mit dem Original. Die optimierten Einstellungen wurden für die sich anschließenden Verdünnungen beibehalten.

Die Darstellung der mit dem FACS gemessenen Zellen erfolgte in so genannten Plots. Es gibt verschiedene Plot-Arten, z.B.: 1) Histogramm: Häufigkeitsverteilung von Messwerten 2) Dot Plot: Punktauftragung 3) Density Plot: spezielle Form des Dot Plots 4) Overlay-Plot: Überlagerung verschiedener Histogramm-Plots 5) Contour Plot: Dreidimensionale Darstellung mittels Höhenlinien

In dieser Arbeit beschränkte sich die Nutzung auf Density-Plots, die eine Darstellung der Fluoreszenzen zweier unterschiedlicher Kanäle gegeneinander ermöglichen. Dabei erscheint jedes gemessene Ereignis als Punkt (= Dot). Anders als Dot-Plots, die zwar jede einzelne Zelle als Dot darstellen, dabei jedoch jene Zellen nicht detektieren, die dieselbe Fluoreszenzintensität besitzen, lässt sich dieses Problem mit Density-Plots über verschiedene Farben (rot: viele Zellen gleicher Intensität; blau: nur einzelne Zellen) lösen.

Des Weiteren erfolgte die Darstellung in Form von eindimensionalen Histogramm-Plots. Hier wird auf der X-Achse die Intensität einer spezifischen Fluoreszenz, auf der y- Achse die Zahl von Ereignissen aufzeigt, die mit einer bestimmten Intensität analysiert wurden[22].

In Abbildung 3 sind die beiden Arten an verwendeten Plots schematisch dargestellt.

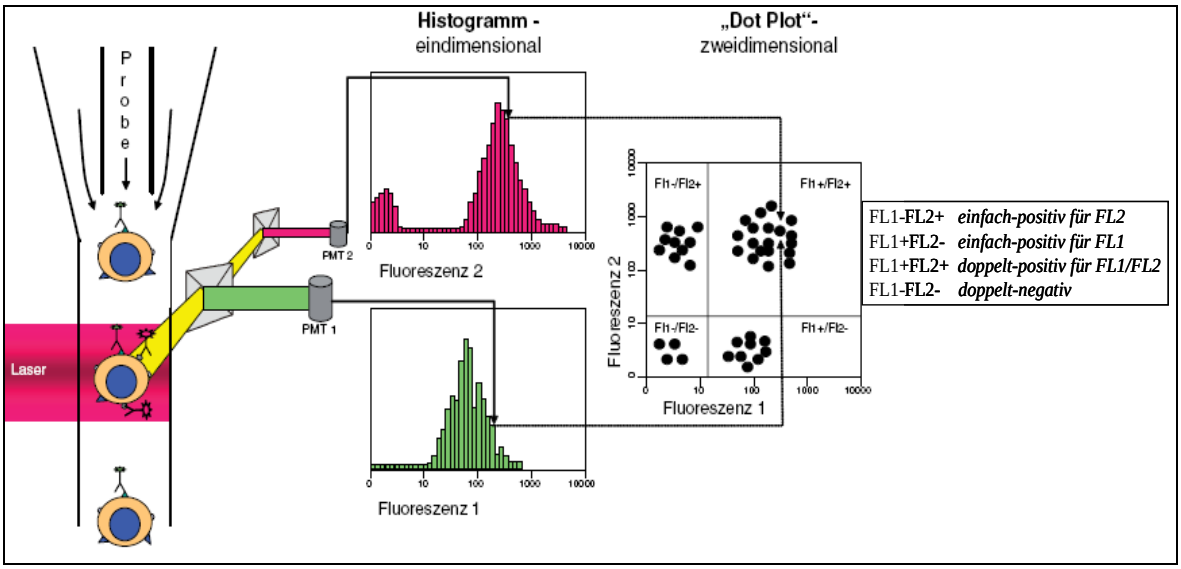


**Abbildung 3. Korrelierte Darstellung von Messergebnissen. Die Häufigkeit einzelner Fluoreszenzintensitäten wird mittels eines Histogramm-Plots (links) dargestellt, während Dot-Plots (rechts) erlauben, den Zusammenhang von Fluoreszenzsignalen darzustellen.[21]**

Nach abgeschlossener FACS-Messung erfolgte die Analyse der Daten, um Zellpopulationen zu identifizieren und diese anschließend in Hinblick auf ihren Anteil an den gemessenen Zelloberflächenmarkern, absolute Zellzahlen, das Muster der Expression der verschiedenen gemessenen Parameter und ihre Heterogenität zu beschreiben[22].

### *2.2.2.6 Datenanalyse*

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit der Analysis-Software CXP (Version 2.2, 2006) von Beckman Coulter.

Ein wichtiger Bestandteil der Analyse umfasst die Kompensation der gemessenen Daten, denn trotz eingesetzter Farbteilerspiegel und Bandpassfilter gelingt es nicht, die spektralen Überlappungen der einzelnen Fluorochrome ganz zu verhindern. Dies beeinträchtigt die Beurteilung der Ergebnisse dahingehend, dass man bei Mehrfarbanalysen nicht erkennen kann, welches Fluorochrom das Signal des Detektors verursacht hat (Abbildung 4).

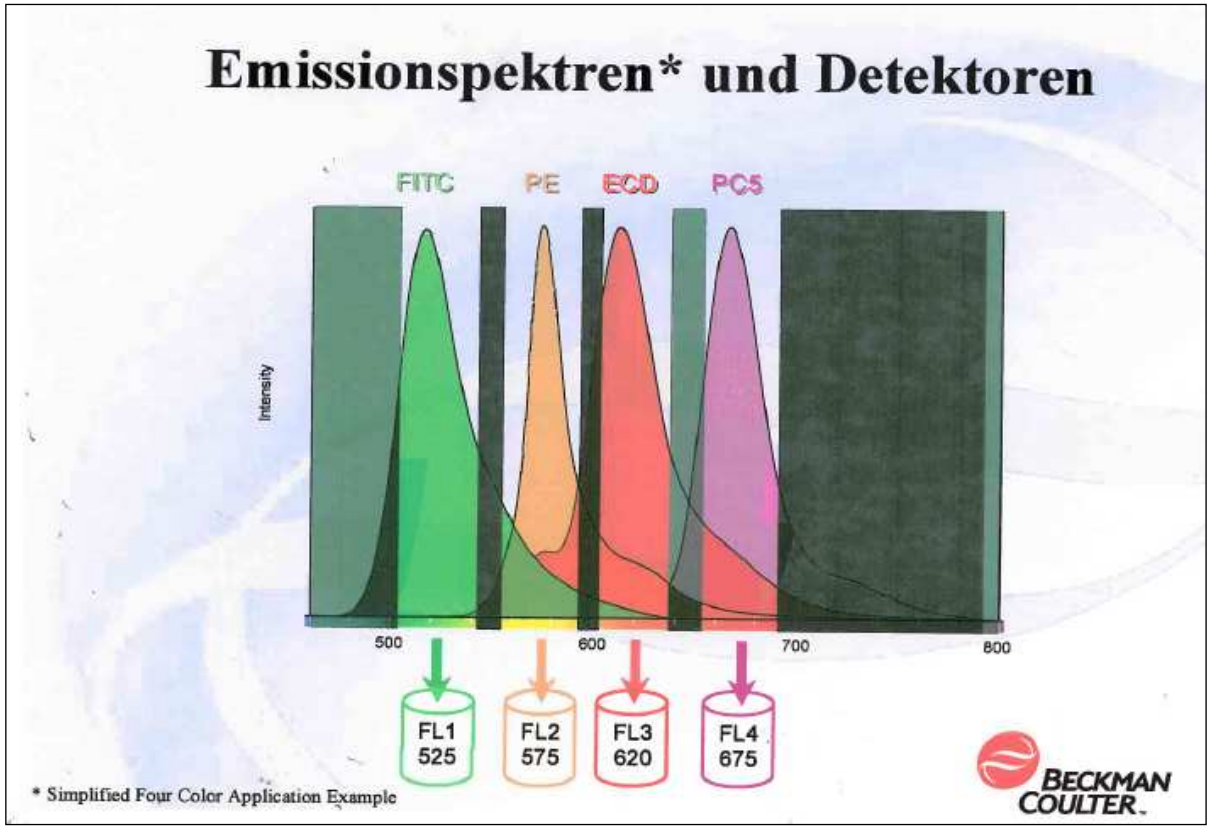


**Abbildung 4. Darstellung der Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome sowie deren Überlappung. FL1, FL2, FL3 und FL4 bezeichnen die Detektoren für die einzelnen Farbstoffe.**
**Quelle: Beckman Coulter**

Unter Kompensation versteht man die rechnerische Korrektur um den prozentualen Anteil benachbarter Fluorochrome. Da man z.B. weiß, dass FITC (FL1) auch in den PE-Kanal (FL2) strahlt (Abbildung 4), muss vom gemessenen PE-Signal der Teil subtrahiert werden, der vom FITC-Emissionsspektrum stammt. Eine fehlerhafte Kompensation während der FACS-Messung lässt sich nur schwer im Rahmen der eigentlichen Analyse korrigieren.

Wie bereits unter Punkt 2.2.2.5 erläutert, ist es sinnvoll, sich für FACS-Messungen spezifische Messprotokolle zu erstellen, die jeder Messung zu Grunde gelegt werden können. Die entsprechende Analyse-Software ermöglicht die Erstellung eines so genannten Analyseprotokolls, welches Histogramm- und Density-Plots enthält.
Zunächst erfolgte die Selektion der CIK-Zellen aus einer heterogenen Population über die Größe (FS) und Granularität (SS). Weitergehende Analysen von Zellen, die über mehr als diese zwei Parameter definiert werden, sind über die Verknüpfung von Regionen in «Gates» möglich. Hierbei werden nach den Regeln der Booleanschen Algebra Regionen mit den Funktionen «Und», «Oder» oder «Nicht» miteinander zu «Gates» verknüpft[21].

So gelang die Selektion der lebenden von toten Zellen mittels 7AAD. Zusätzlich erfolgte die Auswahl der CD45-positiven Zellen.
In weiteren Density-Plots ist es dann möglich, sich nur die Zellen aus dieser vorab definierten Region anzeigen zu lassen, wobei durch Variation der ausgewählten Fluoreszenzkanäle an X- und Y-Achse rein theoretisch alle verfügbaren Fluorochrome und damit Zelloberflächenmarker gegeneinander dargestellt werden können.
In die verwendeten Density-Plots wurde im Falle der Analyse der Fluoreszenzen (FL1 bis FL4) Regionen in Form einer Quadrantenanalyse derart eingefügt, dass sich doppelt-positiv-markierte Zellen von einfach-positiv- bzw. nicht gefärbten Zellen diskriminieren ließen. Die Einheit der Skalen war hierbei logarithmisch, um die Ergebnisse anschaulich darzustellen.
Des Weiteren erfolgte die Analyse der Titrationsansätze durch Nutzung so genannter Overlay-Plots. Die im Rahmen der FACS-Messung für jede einzelne Antikörpermenge generierten und nachfolgend übereinander gelagerten Histogramm-Plots für einen spezifischen Zelloberflächenmarker ergaben einen Overlay-Plot. Der Einsatz dieser Plotart ermöglichte eine optimale Darstellung der Veränderung der Fluoreszenzintensität eines definierten Zelloberflächenmarkers im Rahmen der Antikörpertitration.

Für eine numerische Bewertung wurden die Beträge der Differenz zwischen Original und jeweiligem Quadranten einer Verdünnung addiert (= Gesamtdifferenz). Hierzu erfolgte nach der Auswertung der Daten mittels CXP-Software (Version 2.2, 2006, Beckman Coulter) der Transfer nach Microsoft Excel. Dies wurde durch die Software CXP automatisch vorgenommen. So lagen für jede Antikörpertitrationsreihe die prozentualen Werte der einzelnen Quadranten der Density-Plots vor.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Generierung von CIK-Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus humanem Vollblut gesunder Probanden Lymphozyten über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, die unter Zusatz von IFN-γ, Okt3 und IL-2 (siehe Punkt 2.2.1.2) über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen zu CIK-Zellen ausdifferenziert wurden. Im Verlauf dieser Differenzierung entwickelten sich aus ursprünglich kleinen, kompakten und gering granulierten Einzelzellen große, granulierte und vakuolisierte CIK-Zellen, die durch die Bildung von Zellclustern gekennzeichnet waren (Abbildung 5).

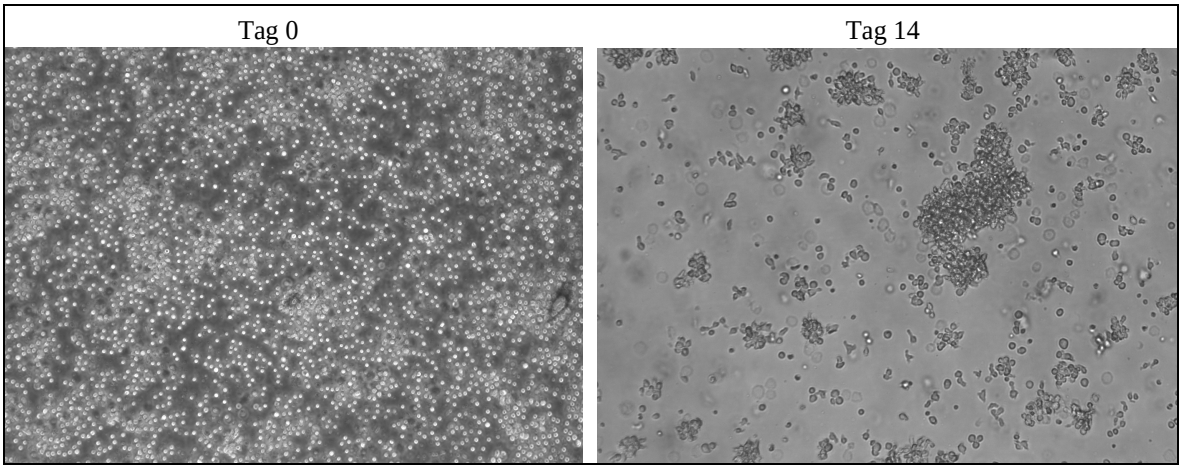


**Abbildung 5. Entwicklung von CIK-Vorläuferzellen (Tag 0) zu differenzierten CIK-Zellen (Tag 14); Vergrößerung 10fach.**

Die Vitalität der Zellen wurde nach Trypanblau-Färbung mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und betrug 95%+/- 2%. Die generierten CIK-Zellen wurden an Tag 14 entweder kryokonserviert bzw. direkt für nachfolgende FACS-Analysen genutzt. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Schimmelpfennig zeigten, dass die Kryokonservierung keinen negativen Einfluss auf die Vitalität und funktionelle Eigenschaften wie Immunphänotyp und Zytotoxizität der CIK-Zellen hat[7].

## 3.2 FACS-Analyse von CIK-Zellen

Ein Verfahren, um Zellen zu charakterisieren, ist die Untersuchung mit Hilfe eines Durchflusszytometers, in diesem Falle vom Typ FC 500 von Beckmann Coulter.
Die nach Zytokinstimulation generierten CIK-Zellen können durch Markierung mit entsprechenden Antikörpern (siehe 2.2.2.3) immunphänotypisch genau charakterisiert werden. Antikörper werden häufig vom Hersteller in einer sehr hohen Konzentration geliefert, sodass eine Verdünnung des Antikörpers nicht unbedingt zu einer Verschlechterung des FACS Ergebnisses führt, dadurch aber nicht selten in erheblichen Maß eine Reduktion der Kosten erzielt werden kann.
Das Ziel der hier vorgelegten Untersuchungen war es, an verschiedenen kryokonservierten oder frisch expandierten CIK-Zell-Chargen, unterschiedliche Konzentrationen von routinemäßig im Labor eingesetzten Antikörpern zu untersuchen und aufgrund der erlangten Ergebnisse eine Festlegung zu treffen, in welcher Konzentration diese Antikörper künftig eingesetzt werden sollten.
In dieser Arbeit sind die Resultate vier verschiedener CIK-Chargen aufgezeigt.

### 3.2.1 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse von CIK-Zellen aus einer heterogenen Zellpopulation

Die Zellen wurden zunächst alle in einem zweidimensionalen Density-Plot dargestellt, der auf der X-Achse (Side Scatter, SS) die Granularität der Zellen angibt und auf der Y-Achse (Forward Scatter, FS) ihre Größe (Abbildung 6. A). Das polygonale Gate A grenzte jene Zellpopulation ein, die CIK-Zellen mit den genannten Eigenschaften (groß und granuliert) entsprechen könnten. “Dots“, die durch das Gate A ausgeschlossen wurden, stellen Zelltrümmer und tote Zellen dar, die durch ihre Autofluoreszenz das Ergebnis beeinflussen würden. Die Festlegung und Beibehaltung des Gate A über den Verlauf der Messreihen ermöglichte eine Aussage darüber, inwieweit die per Forward und Side Scatter definierten Kriterien Größe und Granularität für CIK-Zellen eingehalten wurden. Abbildung 6.A zeigt das für die hier gezeigten Untersuchungen definierte Gate. Über den gesamten Messzeitraum entsprachen 87%+/-3% der Zellen CIK-Zellen entsprechend Gate A.

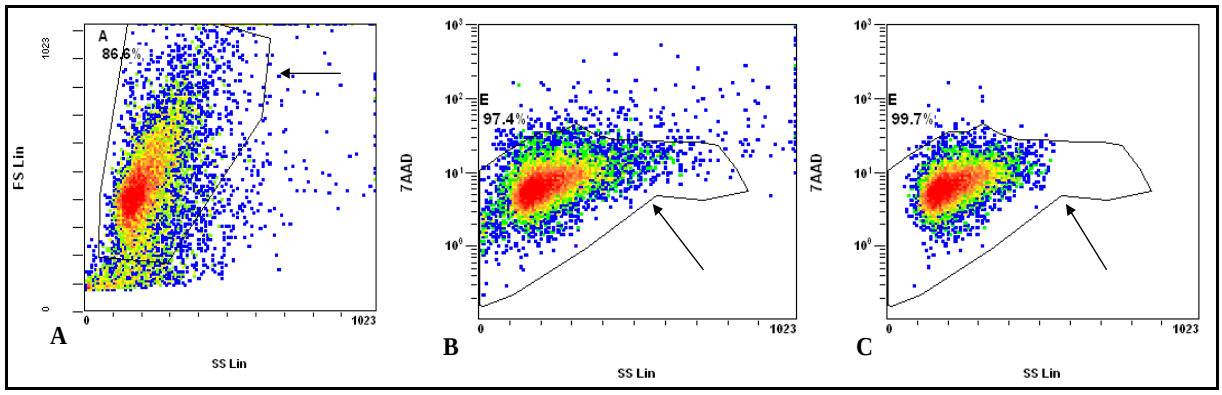


**Abbildung 6. A) Die Darstellung FS gegen SS erfolgte zur empirischen Eingrenzung der Zellen nach Größe und Granularität B) Der Plot 7AAD gegen SS zeigt die Selektion von lebenden Zellen aus der Gesamtzellpopulation („Ungated"). C) Im Vergleich zu B) wurden hier nur Zellen aus „Gate A" berücksichtigt und analysiert.**

Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Vitalität unter Einbeziehung aller Zellen (Abbildung 6 B). Der Farbstoff 7AAD markiert tote Zellen, in dem er mit der DNA der toten Zellen interkaliert; während lebende Zellen nicht angefärbt werden. Bei Berücksichtigung aller Zellen aus Abbildung 6. A („Ungated") zeigte sich neben kleineren höher fluoreszierenden Populationen eine große definierte und polygonal gut abgrenzbare Zellpopulation (Gate E; Abbildung 6. B). Alle Zellen in Gate E sind lebende Zellen. Die Vitalität betrug nach 7AAD-Färbung in diesem Beispiel 97,4%.

Abbildung 6. C zeigte demgegenüber nur die Zellen nach 7AAD-Färbung an, die sich in Gate A (Abbildung 6**.** A) befinden. Bei Auswertung des Density-Plots und Zugrundelegung des selben polygonalen Gates wie in Abbildung 6. B wird deutlich, dass 99,7% der Zellen aus Gate A (Abbildung 6. A) vital sind.

Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei den Zellen in Gate A ausschließlich um Leukozyten handelte, erfolgte eine weitere Analyse mittels einer Markierung mit CD45-ECD-Antikörper. CD45 ist ein Pan-Leukozytenmarker und wurde wie erwartet auf allen Zellen aus Gate A exprimiert (Abbildung 7). Es zeigt sich eine definierte polygonal abgrenzbare Zellpopulation. Die Färbung der Zellen mit CD45-Antikörper diente in allen Analysen als Positivkontrolle und zum Ausschluss eventueller nicht leukozytärer Zellen. Für die weitere Analyse wurden nur CD45-positive Zellen aus Gate J (Abbildung 7) herangezogen. Mit jeder Titrationsmessung wurde als Negativkontrolle die Antikörpermischung IgG1-FITC/IgG1-PEmitgeführt ( Abbildung 8). Dieser Antikörper misst die unspezifische Bindung der jeweiligen Antikörperklasse an die zu

untersuchende Zelle und wird daher Isotyp-Kontrolle genannt, die wie erwartet zu nahezu 100% negativ war.

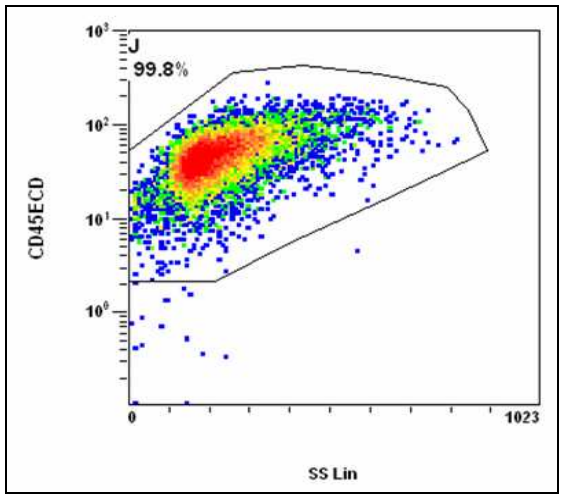


**Abbildung 7. Färbung der Zellen mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45. Die dargestellte Zellpopulation umfasste alle Zellen von Gate A aus Abbildung 2.A. Nahezu alle Zellen aus GateA (in diesem Beispiel 99,8%) sind CD45-positiv.**

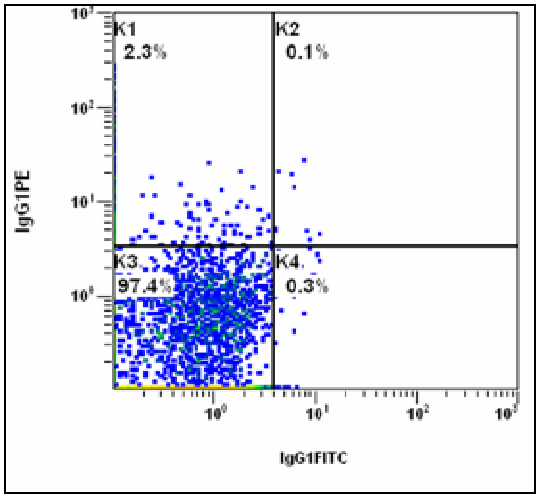


**Abbildung 8. Isotypkontrolle IgG1-FITC/IgG1-PE. Der geringe prozentuale Anteil von 2,3% in dem Quadranten K1 ist durchflusszytometrisch nicht relevant und daher zu vernachlässigen.**

Um eine konkrete Aussage hinsichtlich der immunphänotypischen Eigenschaften der selektierten Zellpopulation (Abbildung 7) treffen zu können, erfolgte eine detaillierte FACS-Analyse der Antikörper-gefärbten Zellen.

### 3.2.2 Immunphänotypische Charakterisierung der CIK-Population

Bedeutsame Oberflächenmarker für die Immunphänotypisierung von CIK-Zellen sind CD3 (T-Zellen), CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen), CD16 und CD56 (natürliche Killerzellen), HLA-DR (MHC-Klasse-II-Moleküle) sowie CD19 (B-Zellen), der zum Ausschluss von B-Zellen diente.

Zur prozentualen Auswertung der Ergebnisse wurden so genannte Density-Plots verwendet. Die Quadrantenanalyse diente hierbei als Hilfsmittel, um doppelt-positive von einfach-positiven bzw. doppelt-negativen Populationen zu trennen. Der Vorteil bei der Verwendung eines Density-Plots liegt darin, dass die Anzahl an Zellen, die für die gleiche

Fluoreszenzintensität positiv oder negativ sind, über verschiedene Farben (rot: viele Zellen, blau: einzelne Zellen) dargestellt werden können.
Sowohl die Quadrantenanalyse als auch die Kompensation der Daten erfolgte jeweils mit der Originalkonzentration des Antikörpers und wurde für die Verdünnungen beibehalten, um eine Vergleichsbasis zu erhalten.
Zusätzlich erfolgte für jede einzelne Antikörpermischung die Darstellung der Titrationsergebnisse in Form von Histogramm-Plots. Bei dieser Art von Plot steht die Höhe eines definierten Peaks für die Zellzahl, die mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität (=X-Achse) gemessen wurde. Nachfolgend wurden Histogramm-Plots für einen spezifischen Zelloberflächenmarker übereinander gelagert. Der daraus resultierende Overlay-Plot ermöglichte eine optimale Darstellung der Veränderung der Fluoreszenzintensität eines Zelloberflächenmarkers im Rahmen der Antikörpertitration. Die verschieden farbigen Peaks symbolisieren die Antikörper-Verdünnungen: orange – Original; pink – Verdünnung 1:2; hellblau – Verdünnung 1:5; dunkelblau – Verdünnung 1:10; grün – Verdünnung 1:20.
Dargestellt wurden jeweils drei unabhängig voneinander generierte CIK-Chargen.

#### *3.2.2.1 Färbung mit CD3-FITC/CD4-PE/CD45-ECD-Antikörpern*

Die Antikörpermischung CD3-FITC/CD4-PE (Abbildung 9) diente der Abklärung des prozentualen Anteils von CD3/CD4-doppelt-positiven T-Helferzellen innerhalb des CD3-positiven Gesamt-T-Zell-Pools.
Die Titration der Antikörper ausgehend vom Original (Empfehlung von Herstellerseite) über die Verdünnungsstufen 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 zeigte in allen drei analysierten CIK-Chargen (CIK1, 2 und 3), dass sich die doppelt-positive CD3/CD4-Population aus dem rechten oberen Quadranten in Richtung des linken unteren Quadranten – hin zu geringeren Fluoreszenzintensitäten - verschob, in dem normalerweise die Negativkontrolle dargestellt wird. Bei einer Antikörper-Verdünnung von 1:20 erschien die gesamte CD3/CD4-Zellpopulation als negativ. Eine klare Abgrenzung der drei vorliegenden Subpopulationen - CD3/CD4-doppelt positiv, CD3-einfach positiv und CD3/CD4-doppelt negativ, wie sie bei Einsatz des Originals auszumachen war, stellte sich bereits bei einer Verdünnung von 1:5 als kritisch dar. Weniger auffallend war dieser Effekt nur bei der Charge CIK3, wobei auch in diesem Fall die doppelt positive Zellpopulation eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität gegenüber dem Original und der 1:2-Verdünnung aufwies.

Da allen FACS-Ansätzen im Rahmen der Dreifachfärbung eine Detektion von CD45-ECD gemeinsam war, erfolgte in einer weiteren Density-Plotreihe die Analyse von CD4-PE gegen CD45-ECD (Abbildung 10). Wie bereits in Abbildung 7 eindeutig gezeigt werden konnte, waren alle analysierten Zellen CD45-positiv. Der prozentuale Anteil an CD4/CD45-doppelt positiven Zellen war vergleichbar der CD3/CD4-doppelt-positiven Zellpopulation in Abbildung 9. Eine Verdünnung des originalen Antikörpers auf 1:5 führte hier ebenfalls zu einer Verschiebung der Populationen hin zum Negativ-Quadranten, d.h. zu scheinbar verringerten Fluoreszenzwerten der CD4/CD45 stark exprimierenden Zellen.

Abschließend erfolgte eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Density-Plots in Overlay-Plots (Abbildung 11). Die Fluoreszenzpeaks für alle drei Zelloberflächenmarker (CD3-FITC, CD4-PE, CD45-ECD) verschoben sich im Vergleich zum original eingesetzten Antikörper bei Einsatz der Antikörper-Verdünnungen nach links. Demzufolge kam es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität (X-Achse) bei Verringerung der Antikörperkonzentration. Dies korrelierte mit den Beobachtungen in den Abbildung 9 und 10. Auffallend war, dass sich die Peakhöhe der Charge CIK3 bei Betrachtung der CD4-PE-Färbung von denen der CIK-Charge 1 und 2 unterschied. Dieses Resultat spiegelte den Befund aus den Abbildung 9 und 10 wider. Bereits in den Density-Plots wurde eine Diskrepanz hinsichtlich der CD4-Expression zwischen den Chargen CIK1 und 2 gegenüber CIK3 sichtbar.

Unter Einbeziehung der Tatsache, dass es bereits bei einer 1:2-Verdünnung der vorliegenden Antikörpermischung zu einer detektierbaren Abnahme des Fluoreszenzsignals kam und dass minimale Pipettierunterschiede von Ansatz zu Ansatz berücksichtigt werden müssen, sollte bei der Verwendung des CD3 und CD4 Antikörpers mit der von Herstellerseite empfohlenen Antikörpermenge (=Original) gearbeitet werden.

## CD3-FITC/CD4-PE

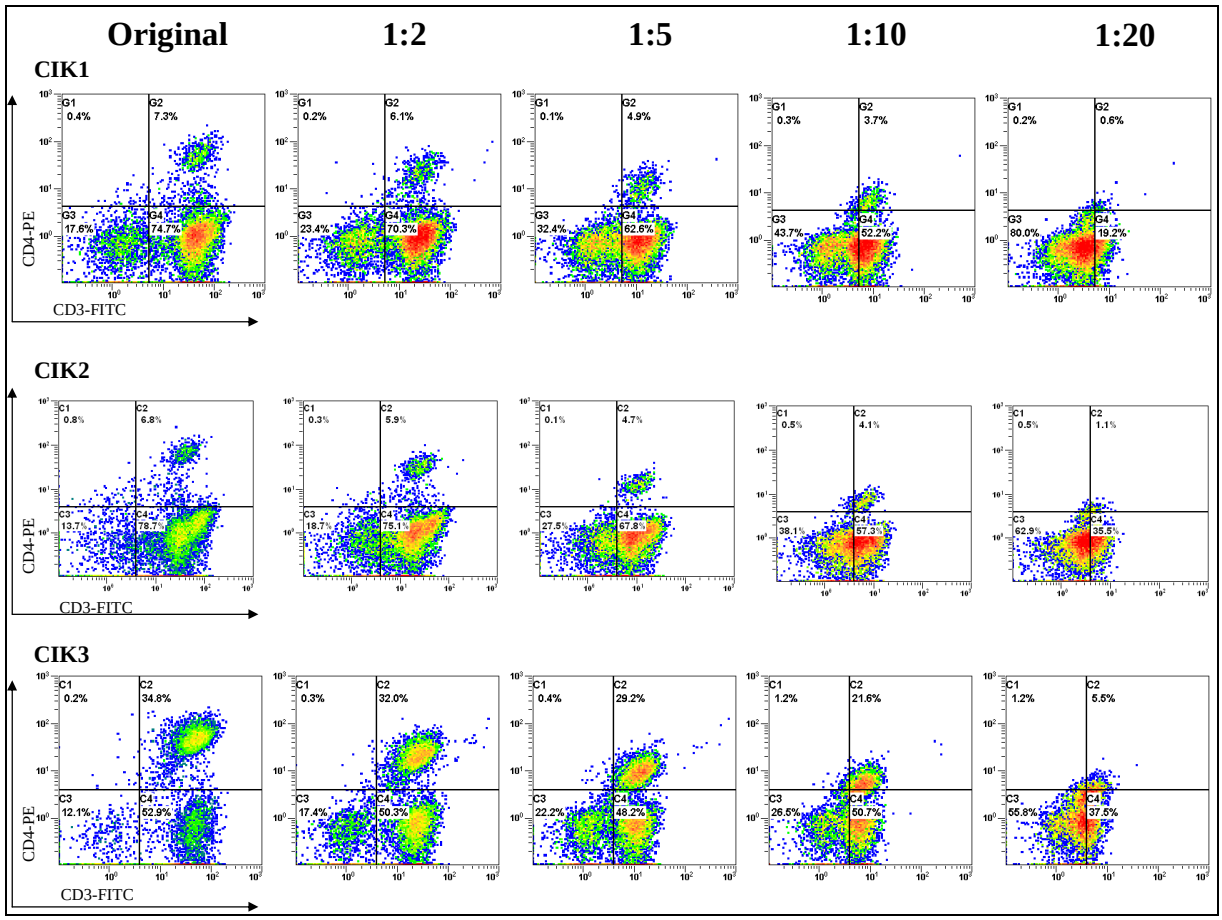


**Abbildung 9. Darstellung der Antikörpertitration CD3-FITC/CD4-PE. Die Verschiebung der CD3/CD4 doppelt-positiven Zellpopulation von erwarteten hohen Fluoreszenzsignalen (oberer rechter Quadrant) hin zu falsch-negativen niedrigen Fluoreszenzsignalen (unterer linker Quadrant) mit zunehmender Antikörper-Verdünnung ist bei allen drei CIK-Chargen in vergleichbarem Umfang zu beobachten.**

## CD4-PE/CD45-ECD

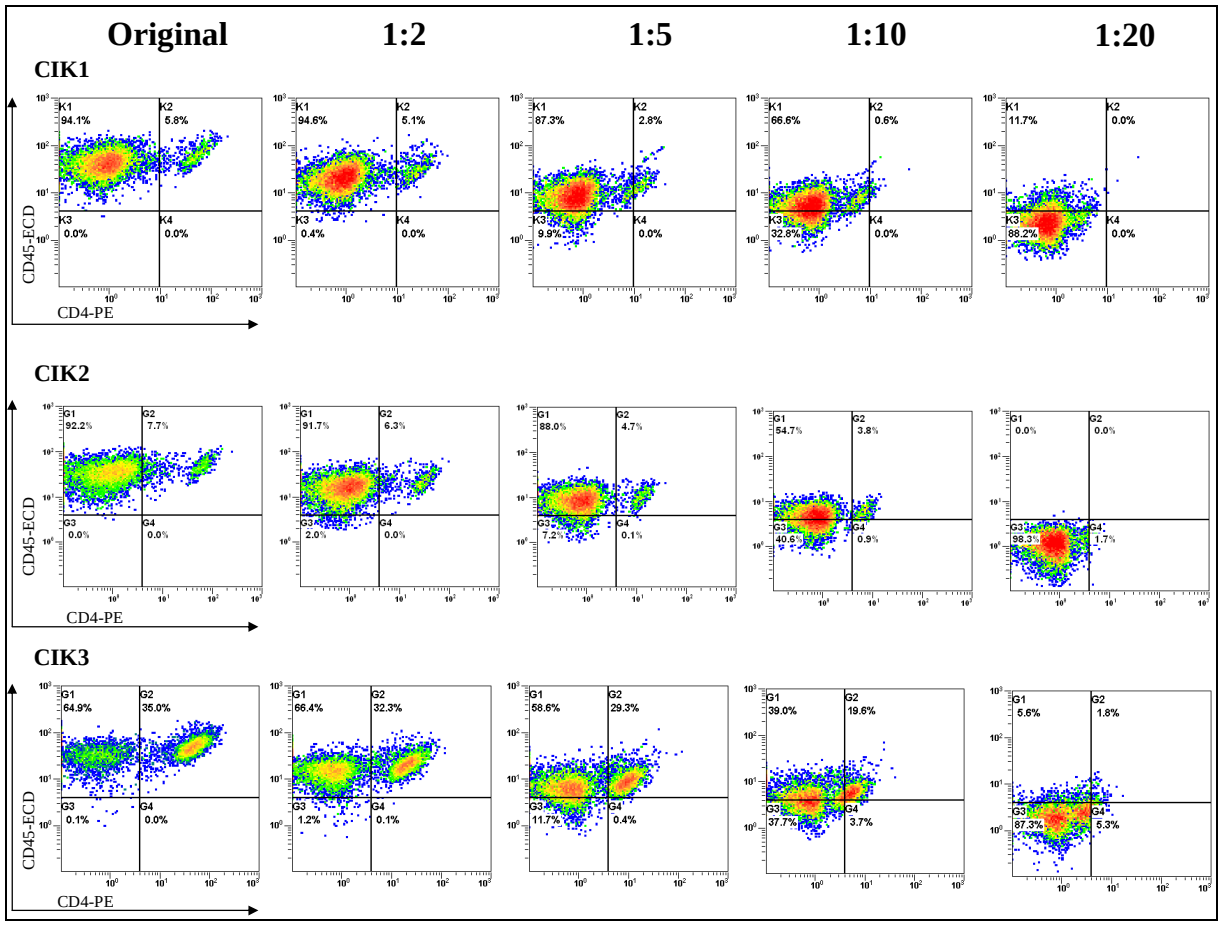


**Abbildung 10. Darstellung der Antikörpertitration CD4-PE/CD45-ECD. Die Verschiebung der CD4/CD45 doppelt-positiven und CD45-einfach positiven Zellpopulation von erwarteten hohen Fluoreszenzsignalen (obere Quadranten) hin zu falsch-negativen niedrigen Fluoreszenzsignalen (unterer linker Quadrant) mit zunehmender Antikörper-Verdünnung ist bei allen drei CIK-Chargen in vergleichbarem Umfang zu beobachten.**

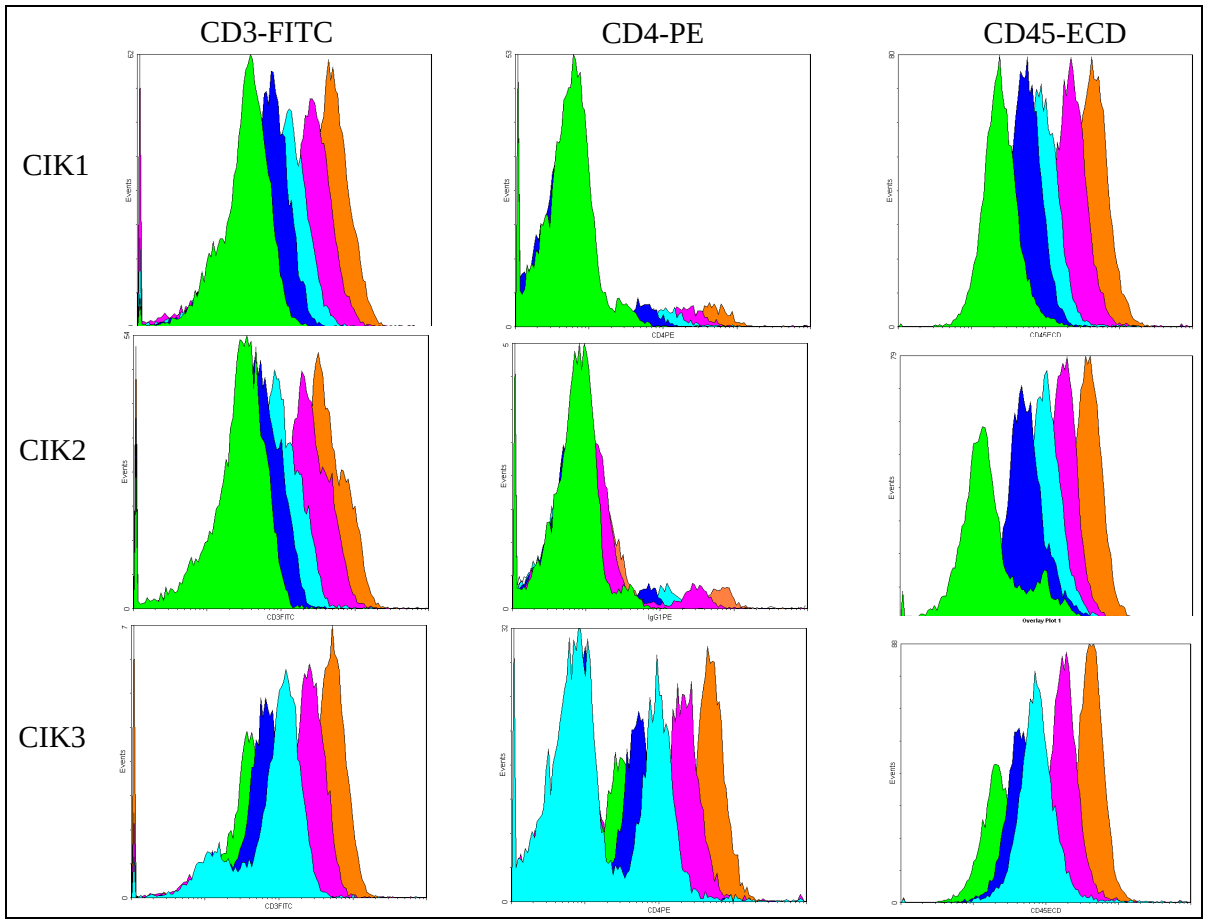


**Abbildung 11. Overlay-Plots der Antikörpertitration von CD3-FITC/CD4-PE/CD45-ECD. Ausgehend von der von Herstellerseite empfohlenen Konzentration (orange) erfolgte eine Verdünnung der Antikörper entsprechend der oberen Farbskala. Dabei konnte für alle drei CIK-Chargen bei Einzelbetrachtung der Zelloberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD45 eine schrittweise Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe beobachtet werden.**

### *3.2.2.2 Färbung mit CD3-FITC/CD8-PE/CD45-ECD-Antikörpern*

Ein hoher prozentualer Anteil (70-80%) an CD3/CD8-positiven Zellen ist ein phänotypisches Merkmal ausdifferenzierter CIK-Zellen. Wie in Abbildung 12 sichtbar wurde, ist in allen drei CIK-Chargen eine fluoreszierende CD3/CD8-doppelt-positive Zellpopulation nachweisbar. Zusätzlich zeigte sich in allen drei untersuchten CIK Zelllinien eine CD8-positiv und CD3-negativ schwierig abgrenzbare Population. Dieser Befund korrelierte mit der Beobachtung unter Punkt in Abbildung 9. Die dort detektierte und schwer

zuzuordnende CD3/CD4-doppelt-negative Population entspricht der hier nachgewiesenen CD8-positiven/CD3-negativen Zellpopulation. Laut Definition handelte es sich um NK-Zellen (siehe 1.2.2). Ähnlich wie bei der Titration von CD3/CD4 kam es auch hier zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität der interessierenden Hauptpopulation CD3/CD8 bereits bei einer Antikörperverdünnung von 1:5, die sich mit größer werdenden Verdünnungsstufen abzeichnete. Aus einer anfangs klar doppelt-positiven Zellpopulation „entwickelte“ sich mit zunehmender Verdünnung eine negative. Wie sich besonders für Charge CIK2 bei der Darstellung der Ergebnisse für die CD3/CD8-Färbung in Density-Plots zeigte, ist eine Quadrantenanalyse nicht in jedem Fall günstig und anwendbar.

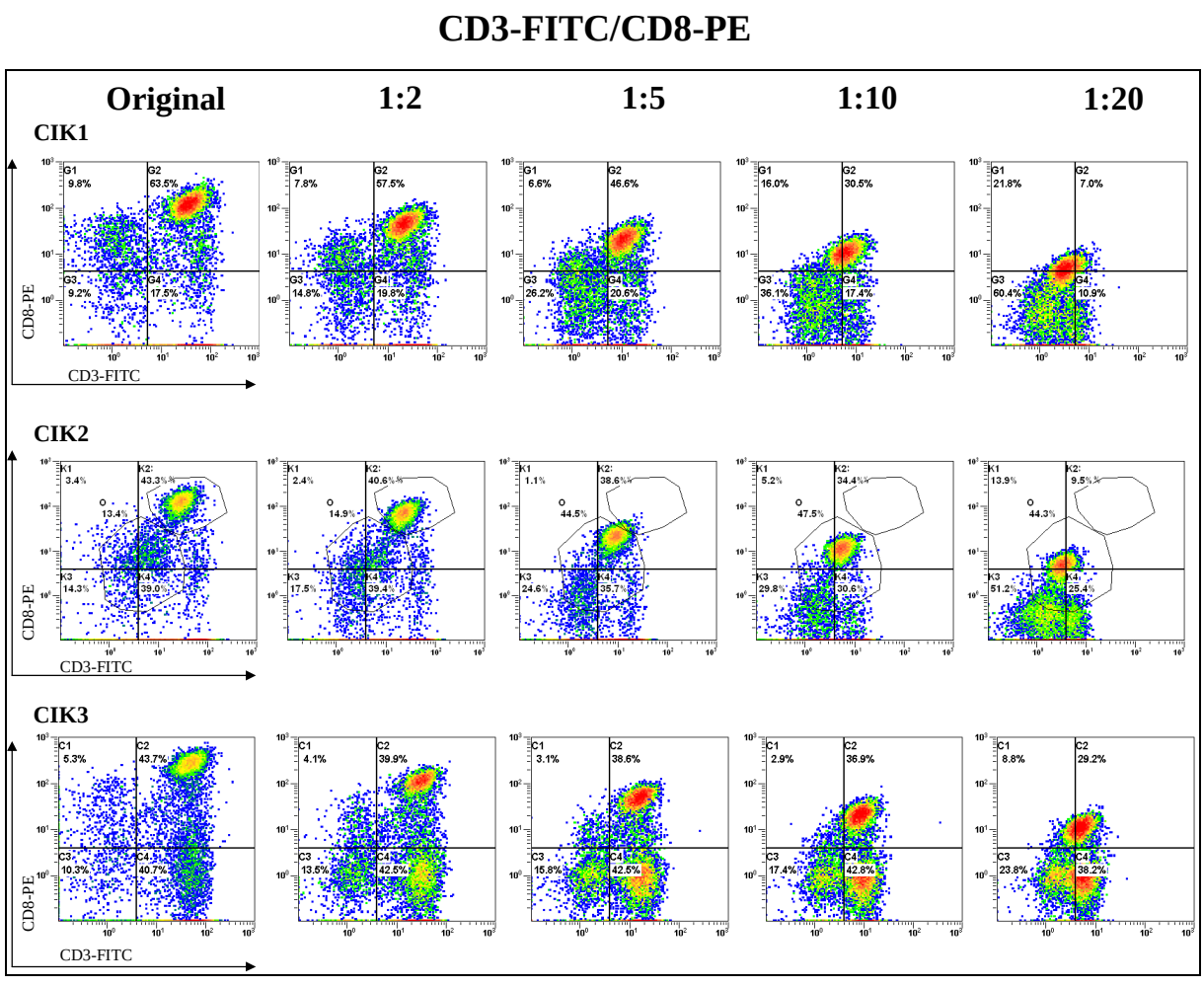


**Abbildung 12. Darstellung der Antikörpertitration CD3-FITC/CD8-PE. Die Verschiebung der CD3/CD8 doppelt-positiven Zellpopulation von erwarteten hohen Fluoreszenzsignalen (oberer rechter Quadrant) hin zu falsch-negativen niedrigen Fluoreszenzsignalen (untere Quadranten) mit zunehmender Antikörper-Verdünnung ist bei allen drei CIK-Chargen in vergleichbarem Umfang zu beobachten.**

Abbildung 13 zeigt die Verteilung der Fluoreszenzsignale für die Zelloberflächenmarker CD8/CD45. Alle Zellen sind wie erwartet CD45-positiv. Der prozentuale Anteil der CD8/CD45-doppelt-positiven Zellen korreliert mit den beobachteten CD3/CD8-doppelt-positiven Zellzahlen in Abbildung 12.

Bei Charge CIK2 zeigte sich das gleiche Phänomen wie in Abbildung 12 hinsichtlich der Zuordnung der Zellpopulationen in die Quadranten.

Die Analyse von Charge CIK1 in Abbildung 13 (Schweifbildung der CD8/CD45-doppelt-positiven Population) verdeutlichte die bereits erläuterte notwendige Kompensation der Fluoreszenzsignale auf Grund der Abstrahlung der Fluorochrome in benachbarte Fluoreszenzkanäle.

Um einen direkten Vergleich der Daten über den Gesamtzeitraum der Messungen zu gewährleisten, war es allerdings essentiell, die zu Beginn der Messungen definierte Kompensationsmaske beizubehalten.

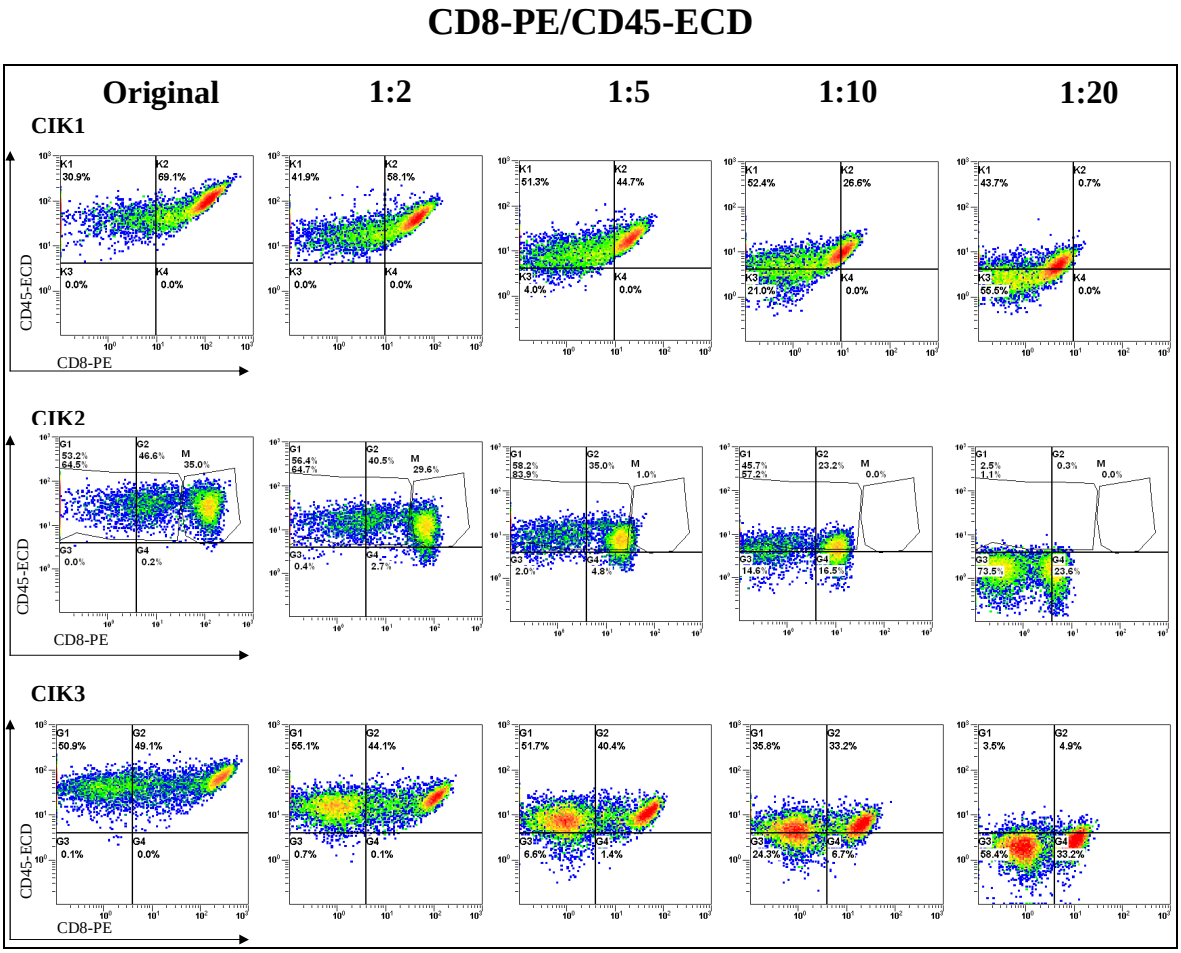


**Abbildung 13. Darstellung der Antikörpertitration CD8-PE/CD45-ECD. Die Verschiebung der CD8/CD45 doppelt-positiven Zellpopulation ist bei allen drei CIK-Chargen in vergleichbarem Umfang zu beobachten.**

Bestätigt wurden die Befunde der Density-Plots durch Overlay-Plots (Abbildung 14). Die Linksverschiebung der Peaks der Verdünnungen von denen des Original in den Plots PE und ECD deckten sich in ihrer Eindeutigkeit mit der nach unten-links Verschiebung der doppelt-positiven CD8CD45 Population aus den Density-Plots (Abbildung 13). Wie auch schon bei der Antikörpermischung CD3-FITC/CD4-PE, zeigten die Ergebnisse, dass eine Verdünnung der Antikörper mit einem Verlust an Signalsensitivität einhergeht.

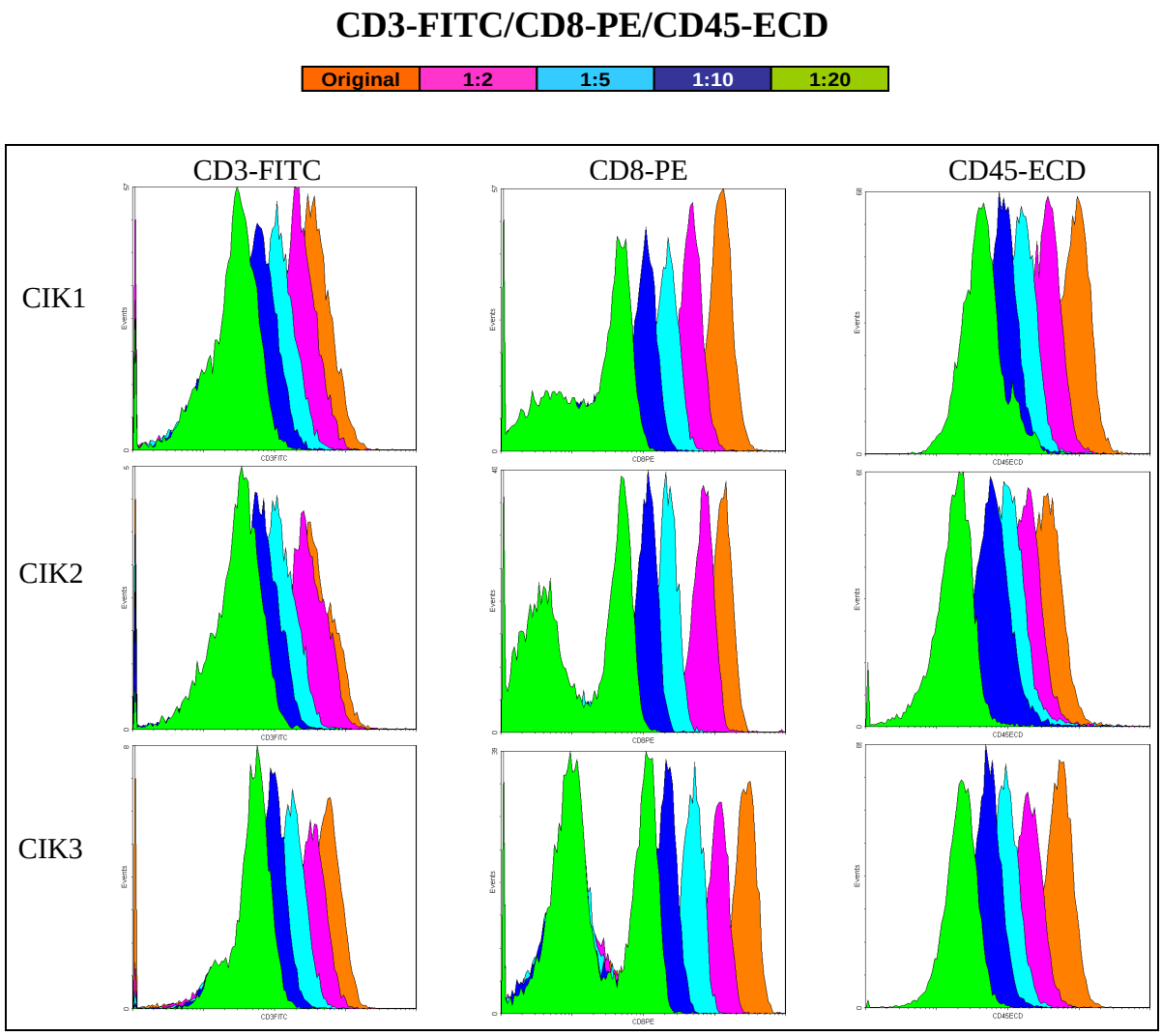


**Abbildung 14. Overlay-Plots der Antikörpertitration von CD3-FITC/CD8-PE/CD45-ECD. Ausgehend von der von Herstellerseite empfohlenen Konzentration (orange) erfolgte eine Verdünnung der Antikörper entsprechend der oberen Farbskala. Dabei konnte für alle drei CIK-Chargen bei Einzelbetrachtung der Zelloberflächenmoleküle CD3, CD8 und CD45 eine schrittweise Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe beobachtet werden.**

### *3.2.2.3 Färbung mit CD3-FITC/CD19-PE/CD45-ECD-Antikörpern*

Der Zelloberflächenmarker CD19 charakterisiert B-Zellen. Die hier vorliegende Gesamtzellpopulation sollte durchgängig CD19-negativ sein. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse eindeutig bestätigt (Abbildung 15). In allen drei CIK-Chargen war eine CD3-positive/CD19-negative Zellpopulation zu erkennen, die bei Einsatz der originalen Antikörperkonzentration klar abzugrenzen war von doppelt-negativen Zellen. Wiederum kam es bei den Verdünnungen zu einer Verschiebung der Fluoreszenz hin zu schwächeren Signalen. Bei Analyse der Zellfärbung mit CD19-PE/CD45-ECD (Abbildung 16) zeigte sich eine definierte CD19-negative und CD45-positive Population. Die Antikörperverdünnung 1:2 führte nur zu einer geringen Verschiebung der Zellpopulation hin zu niedrigeren Fluoreszenzwerten; erst bei der 1:5 Verdünnung ist die Abnahme der Fluoreszenz signifikant.

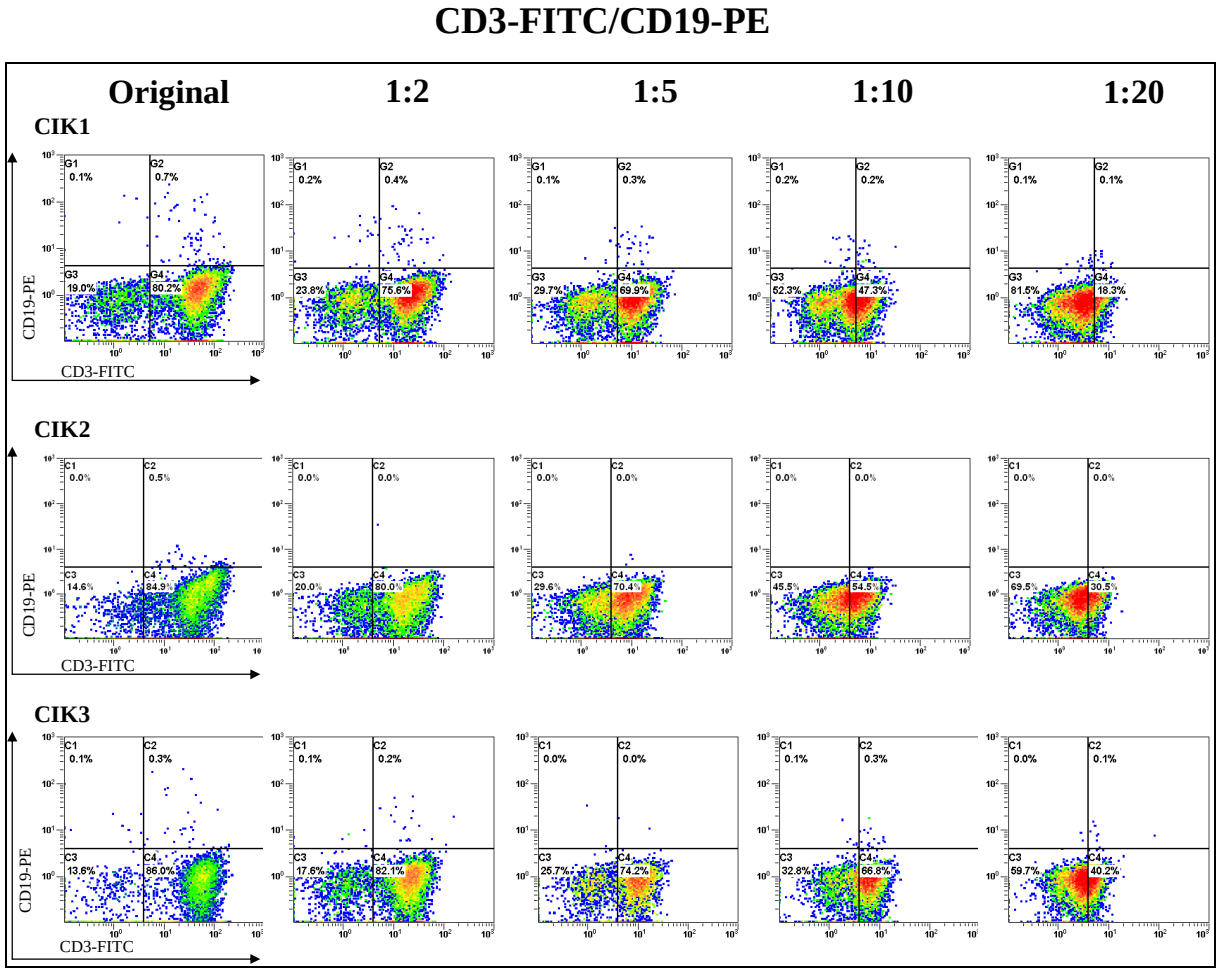


**Abbildung 15. Darstellung der Antikörpertitration CD3-FITC/CD19-PE. Die Verschiebung der CD3-positiven CD19-negativen Zellpopulation ist auch hier sichtbar.**

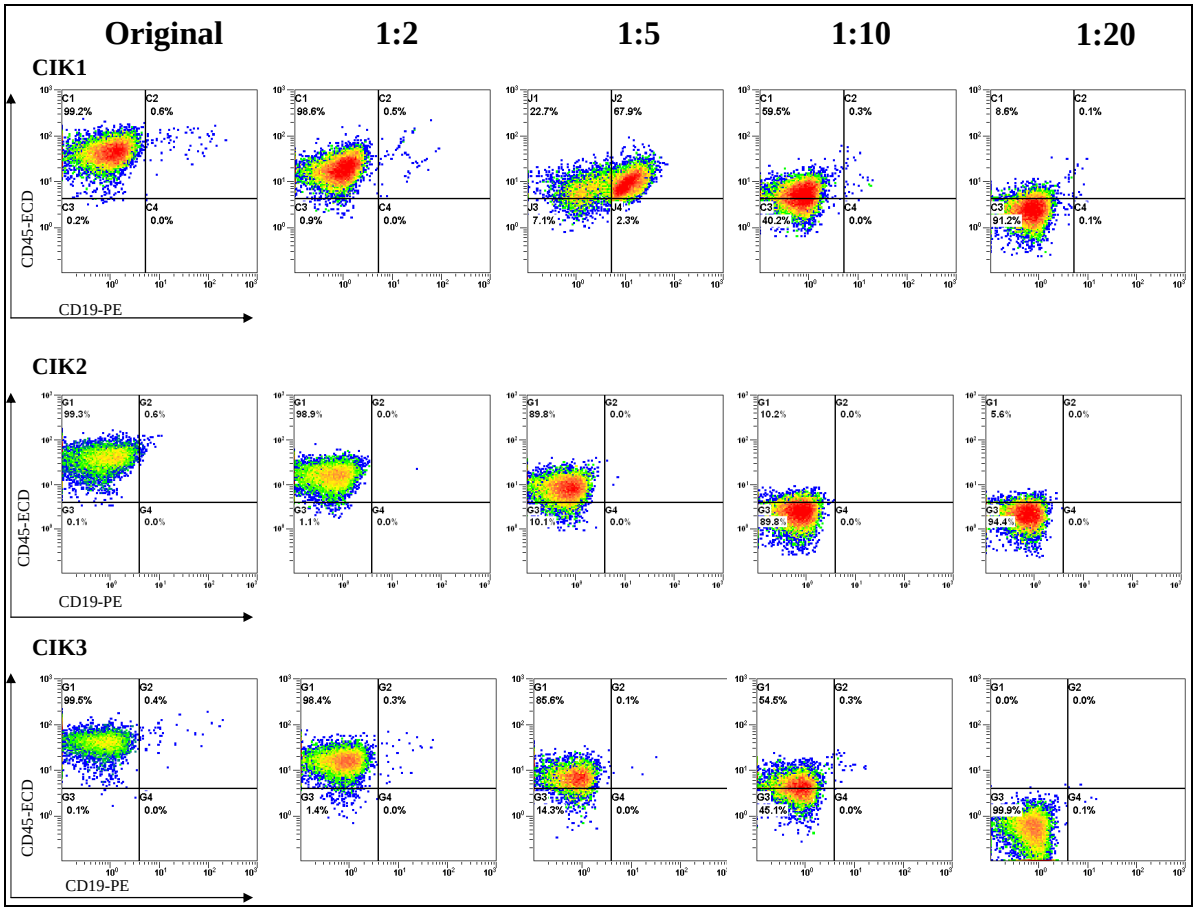


**Abbildung 16. Darstellung der Antikörpertitration CD19-PE/CD45-ECD. Die Verschiebung der CD19/CD45 doppelt-positiven Zellpopulation von erwarteten hohen Fluoreszenzsignalen (oberer linker Quadrant) hin zu falsch-negativen niedrigen Fluoreszenzsignalen (unterer linker Quadrant) mit zunehmender Antikörper-Verdünnung ist bei allen drei CIK-Chargen in vergleichbarem Umfang zu beobachten.**

Die Overlay-Plots (Abbildung 17) des PE-gefärbten CD19-Antikörpers wurden in diesem Fall in einer Darstellung gewählt, die sich „Galery Mode“ nennt, also nur eine Übereinanderlagerung von definierter Kontrolle (= das Original) und einer Verdünnung. Dies war notwendig, da durch die vorliegende CD19-negative Population kein positives PE-Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Die Peaks der Verdünnungen sind nur sehr schwer mit minimalen Abweichungen zu erkennen, da sie ebenso ein negatives Signal liefern wie das Original. Die Plots CD3-FITC und CD45-ECD betrachtend war ein ähnliches Bild erkennbar wie bereits bei den zuvor analysierten Antikörpermischungen CD3/CD4/CD45 und CD3/CD8/CD45; es zeigte sich eine sichtbare Linksverschiebung der Peaks und damit Abnahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Antikörperverdünnung.

Unter Einbeziehung der Density-Plots kann man auch für die Antikörpermischung für CD3-FITC/CD19-PE/CD45-ECD keine Empfehlung für eine Verdünnung geben, da die Abnahme der Fluoreszenzintensität bereits bei einer 1:5 Verdünnung signifikant ist.

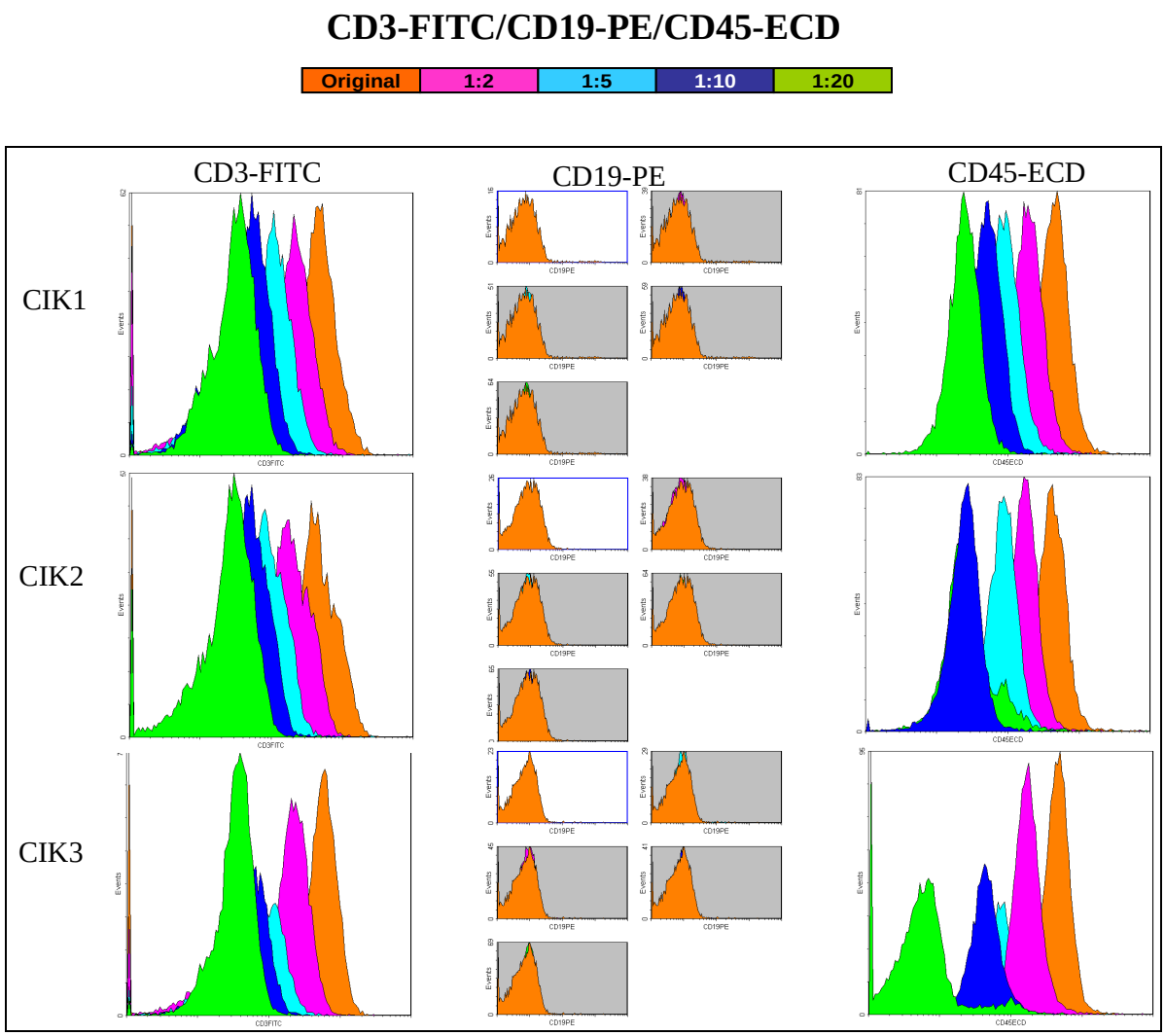


**Abbildung 17. Overlay-Plots der Antikörpertitration von CD3-FITC/CD19-PE/CD45-ECD. Ausgehend von der von Herstellerseite empfohlenen Konzentration (orange) erfolgte eine Verdünnung der Antikörper entsprechend der oberen Farbskala. Dabei konnte für alle drei CIK-Chargen eine schrittweise Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe beobachtet werden. CD19-PE wurde im so genannten „Galery Mode“ dargestellt, da keine PE-Signal detektierbar war.**

### *3.2.2.4 Färbung mit CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-ECD-Antikörpern*

CD3/CD16/CD56-positive Zellen stellen neben den CD3/CD8-positiven klassischen zytotoxischen T-Zellen eine weitere Subpopulation innerhalb des CIK-Gesamtzellpools dar. Der prozentuale Anteil beträgt auch im ausdifferenzierten Stadium nur 10-15%.

In Abbildung 18 wurde ersichtlich, dass sich in allen drei CIK-Chargen eine kleine, klar definierte CD3-negative, CD16+56-positive Population abgrenzte, die einer NK-Zellpopulation entspricht. Eine Auswertung der Daten unter Nutzung der Quadrantenanalyse schien hier nicht ausreichend. Auch eine Abgrenzung durch polygonale Gates scheiterte, da kein Anhaltspunkt zur Definition einzelner Populationen vorhanden war, anders als bei CD-FITC/3CD8-PE (Abbildung 12 und 13).

Dieses Phänomen wurde auch bei der Auswertung der Färbung der Zellen mit CD45-ECD beobachtet (Abbildung 19). Eine Verdünnung der Antikörpermischung von 1:5 und höher ist bei Betrachtung der Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten für alle drei Zelloberflächenmarker nicht mehr akzeptabel.

Da auch hier wie bei allen vorangegangenen Titrationsexperimenten mit zunehmender Verdünnung der Antikörper eine Verschiebung der Zellpopulationen hin zu niedrigeren Fluoreszenzsignalen erfolgte, wurde von einer Verdünnung abgeraten.

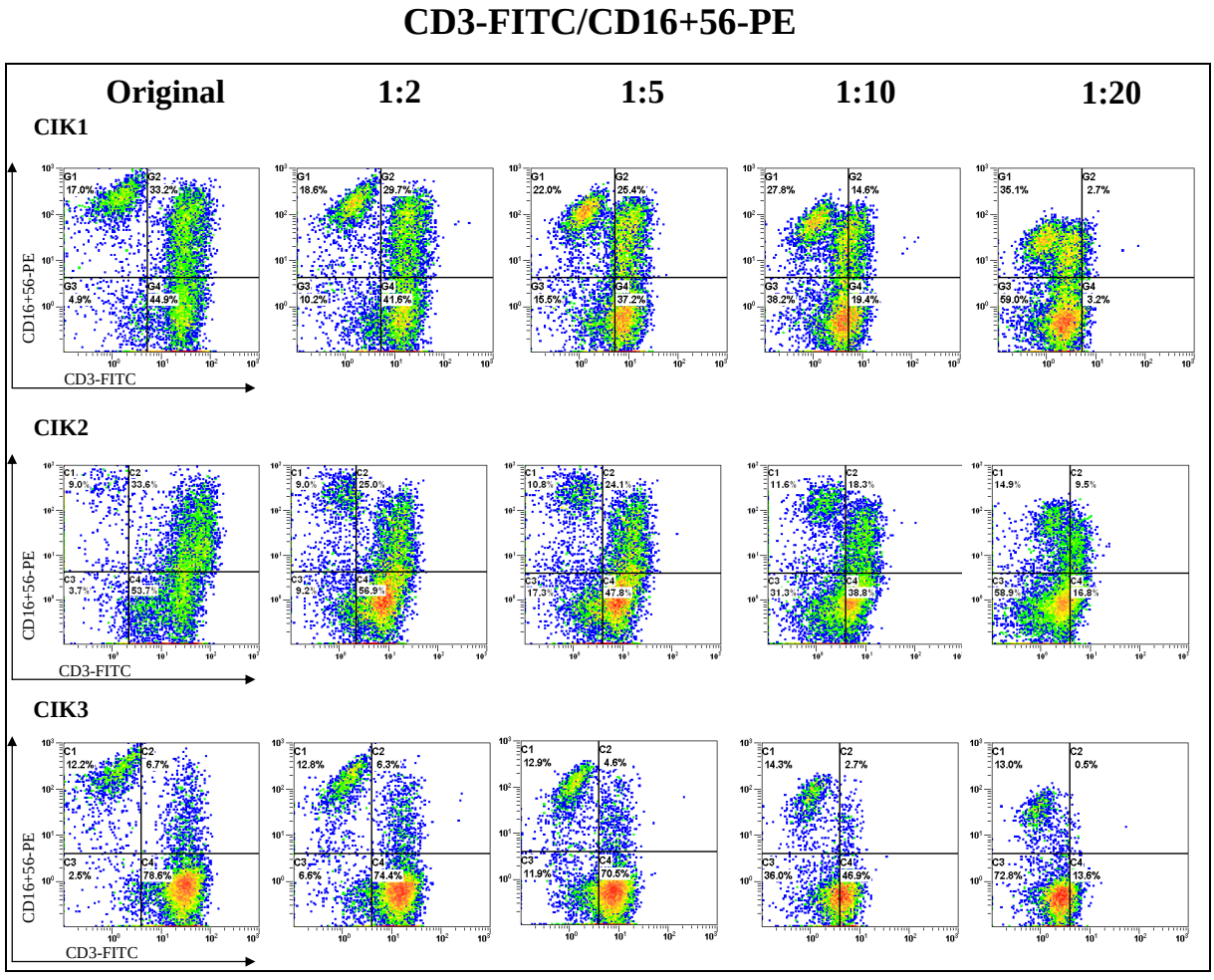


**Abbildung 18. Darstellung der Antikörpertitration CD3-FITC/CD16+56-PE. Die Verschiebung der Gesamtzellpopulation hin zu falsch-negativen niedrigen Fluoreszenzsignalen mit zunehmender Antikörper-Verdünnung ist bei allen drei CIK-Chargen in vergleichbarem Umfang zu beobachten.**

## CD16+56-PE/CD45-ECD

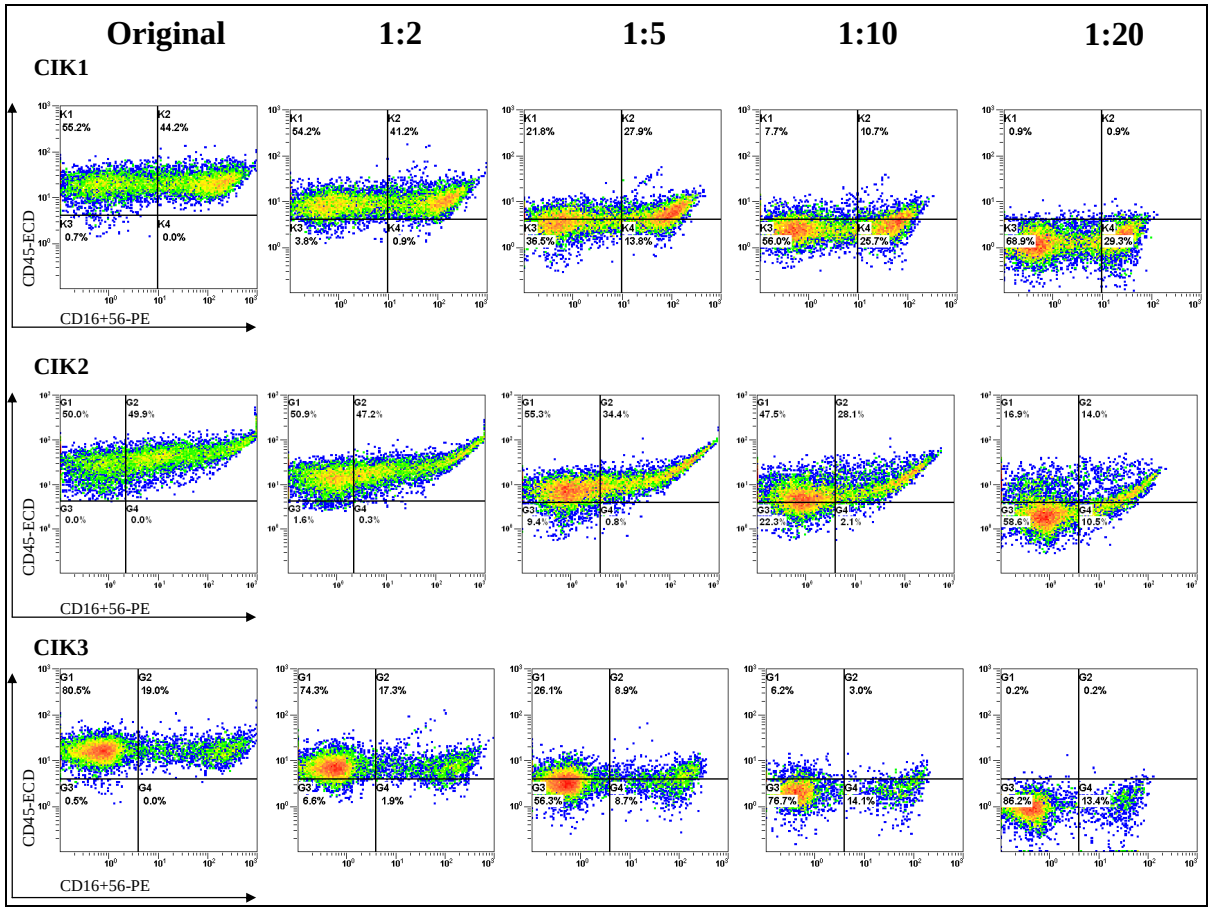


**Abbildung 19. Darstellung der Antikörpertitration CD16+56-PE/CD45-ECD. Die Verschiebung der Gesamtzellpopulation hin zu falsch-negativen niedrigen Fluoreszenzsignalen mit zunehmender Antikörper-Verdünnung war auch hier wieder bei allen drei CIK-Chargen ausgeprägt.**

Die Darstellung der Ergebnisse in Overlay-Plots (Abbildung 20) bestätigte die Befunde der Messungen in Density-Plots. Die Linksverschiebung der Peaks der Verdünnungen von denen des Originals in allen drei Plots deckte sich in ihrer Eindeutigkeit mit der nach unten-links Verschiebung der Gesamtzellpopulation aus den Density-Plots. Zudem war der Unterschied der Abgrenzung der CD3-einfach positiven von der CD3/CD16+56 doppelt-positiven Population der einzelnen CIK-Chargen anhand der unterschiedlichen Höhe und Abgrenzung der Peaks in dem Plot CD16+56-PE gut erkennbar.

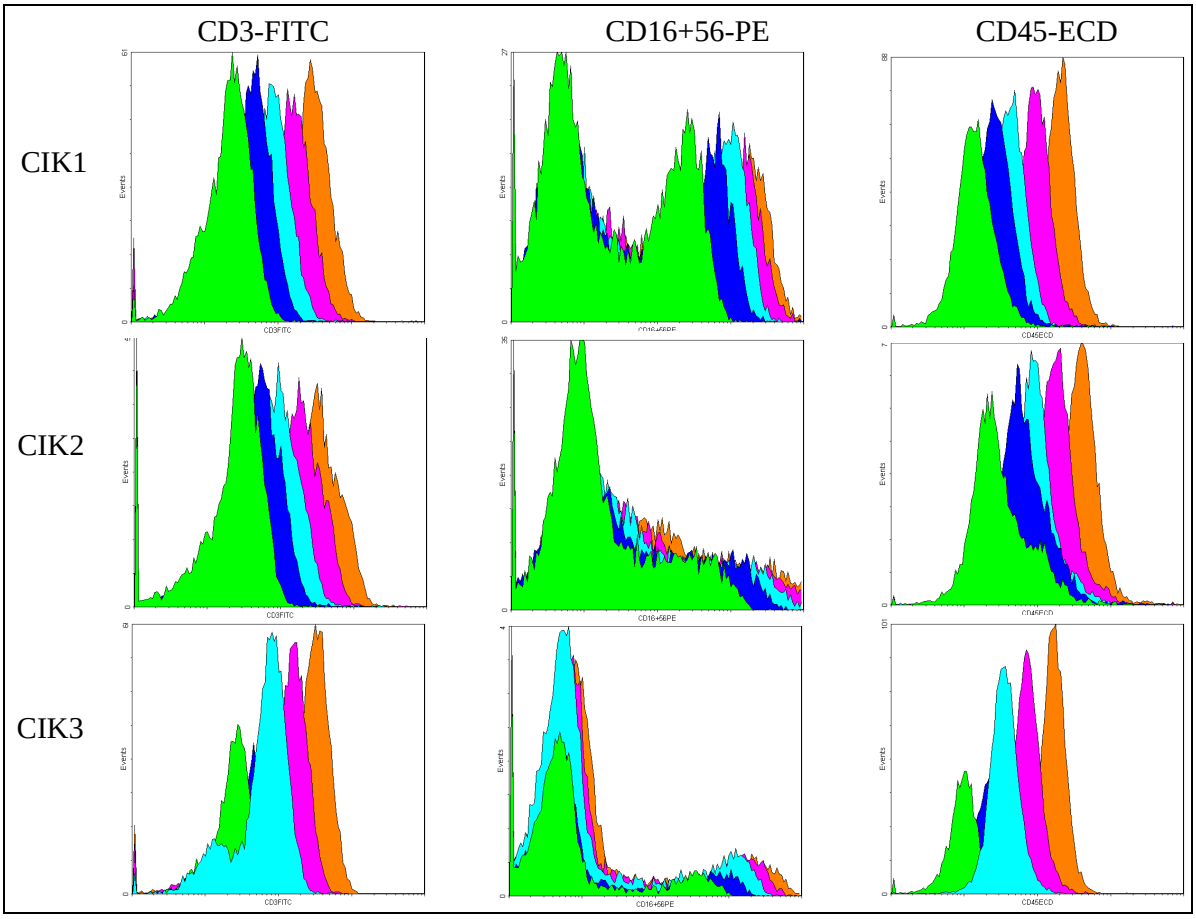


**Abbildung 20. Overlay-Plots der Antikörpertitration von CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-ECD. Ausgehend von der von Herstellerseite empfohlenen Konzentration (orange) erfolgte eine Verdünnung der Antikörper entsprechend der oberen Farbskala. Dabei konnte für alle drei CIK-Chargen bei Einzelbetrachtung der Zelloberflächenmoleküle CD3, CD16+56 CD45 eine schrittweise Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe beobachtet werden. Der Plot Cd16+56-PE verdeutlicht bei CIK 1 und 2 durch die breiten Peaks die Schwierigkeit der Abgrenzung einzelner Populationen.**

### *3.2.2.5 HLA-DR-PE-Cy5/CD45-ECD*

Der HLA-DR-Antikörper erkennt alle Zellen mit einem Rezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle, sodass die vorliegende Population in ihrer Gesamtheit positiv sein sollte, was sich in Abbildung 21 zeigte. Es zeichnete sich eine HLA-DR/CD45 doppelt-positive Zellpopulation ab. Wie bei Betrachtung aller drei CIK-Chargen deutlich wurde, liegt eine kleine etwas schwächer fluoreszierende HLA-DR-Population unmittelbar neben der dominanten stärker fluoreszierenden Zellpopulation. Mit steigender Antikörperverdünnung

verschmolzen diese zu einer Gesamtpopulation. Bereits bei einer 1:2-Verdünnung der Antikörper kam es zu einer signifikanten Verringerung der Fluoreszenzsignale.

Dieser Befund wurde durch die Overlay-Plots (Abbildung 22) für alle drei CIK-Chargen bestätigt. Von einer Verdünnung des Antikörpers wurde daraus resultierend in diesem Fall abgeraten.

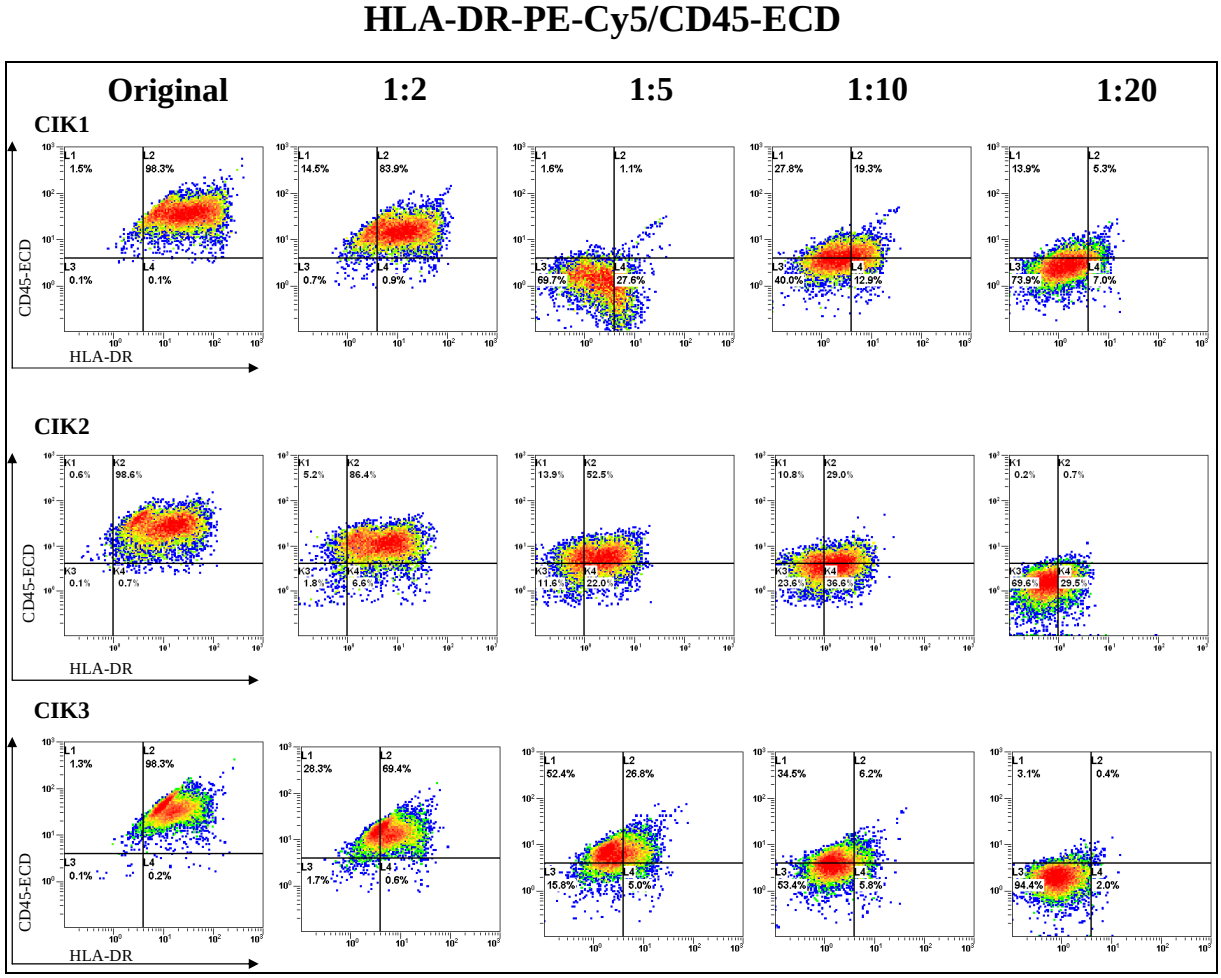


**Abbildung 21. Darstellung der Antikörpertitration HLA-DR-PE-CY5/CD45-ECD Es zeichnete eine HLA-DR/CD45 doppelt-positive Zellpopulation ab. Neben dieser liegt eine kleine etwas schwächer fluoreszierende HLA-DR-Population. Die Verschiebung der Gesamtzellpopulation hin zu falsch-negativen niedrigen Fluoreszenzsignalen (unterer linker Quadrant) mit zunehmender Antikörper-Verdünnung war auch hier wieder bei allen drei CIK-Chargen ausgeprägt.**

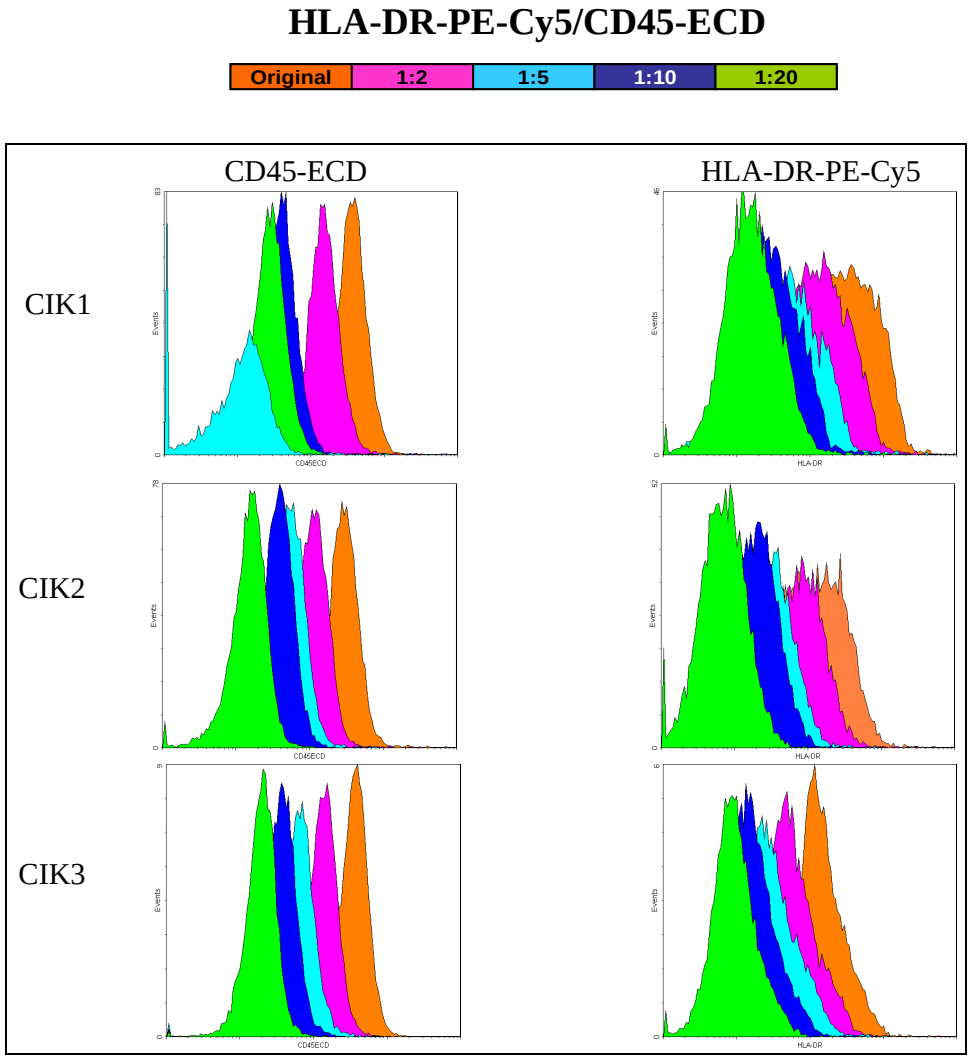


**Abbildung 22. Overlay-Plots der Antikörpertitration von HLA-DR-PE-Cy5/CD45-ECD. Ausgehend von der von Herstellerseite empfohlenen Konzentration (orange) erfolgte eine Verdünnung der Antikörper entsprechend der oberen Farbskala. Dabei konnte für alle drei CIK-Chargen bei Einzelbetrachtung der Zelloberflächenmoleküle HLA-DR und CD45 eine Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe beobachtet werden. Der Peak der Verdünnung 1:5 aus dem Plot CD45-ECD von CIK 1 nimmt korrelierend zu den Density-Plots, eine andere Position ein.**

Bei Betrachtung der ermittelten Daten war für keine der Antikörpermischungen eine Empfehlung zur Verdüngung möglich, da die Abnahme der Fluoreszenzintensität bereits bei einer Verdüngung von 1:2 eine qualitative Verschlechterung der Ergebnisse zur Folge hat und zu Fehlinterpretationen führen kann.

### 3.2.3 Titration der Antikörpermischungen CD3/CD4; CD3/CD8; CD3/CD19; CD3/CD16+56 und des Antikörpers HLA-DR bei Einsatz des unverdünnten CD45-Antikörpers

Ausgehend von den Ergebnissen der Antikörpertitrationsexperimente der vorangegangenen Kapitel 3.2.2.1 bis 3.2.2.5 wurden weitergehende Überlegungen hinsichtlich der Verdünnung der eingesetzten Antikörper angestellt.

Da alle Antikörper, bis auf CD45-ECD und HLA-DR-PE-Cy5, als kommerziell erhältliche Mischungen (mit CD3-FITC) vorlagen, bestand keine Möglichkeit, diese Antikörper gegeneinander zu titrieren. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung, in einem weiteren Ansatz lediglich diese Antikörpermischungen CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD19, CD3/CD16+56 sowie HLA-DR entsprechend den bereits durchgeführten Testreihen zu verdünnen und die Konzentration des CD45-Antikörpers im Verlauf einer Messreihe nicht zu verändern.

In den nachfolgenden Abbildungen sind jeweils drei Messungen gegenübergestellt. In der oberen Reihe sind zum Vergleich jeweils Zellen der Charge CIK1 dargestellt, wobei hier alle Antikörper – inklusive CD45-ECD - entsprechend der vorangegangenen Experimente verdünnt wurden. Die mittlere Reihe zeigt Charge CIK1; allerdings entsprach die Konzentration von CD45 konstant der von Herstellerseite empfohlenen Menge; verdünnt wurden lediglich die Antikörpermischungen. Die untere Reihe zeigt den gleichen Ansatz unter Nutzung einer weiteren CIK-Charge – 4.

Wie erwartet zeigte die Darstellung der Density-Plots gegen CD45-ECD in allen Abbildungen bei Einsatz des unverdünnten Antikörpers für beide CIK-Chargen 1 und 4 (mittlere und untere Reihe der Abbildungen) im Vergleich zum verdünnten CD45-Antikörper (obere Reihe) keine Veränderung der Population hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten.

Bei Auswertung der CD3/CD4/CD45-Färbung der Zellen (Abbildung 23 und 24) lassen sich Verbesserungen bei Einsatz von CD45-unverdünnt in Kombination mit den Verdünnungen der Antikörpermischung CD3/CD4 (mittlere und untere Reihe) gegenüber dem Einsatz von in gleichem Maße titriertem CD45-Antikörper (obere Reihe) ausmachen.

Gleiches gilt auch für alle weiteren Antikörperkombinationen: CD3/CD8/CD45 (Abbildung 25 und 26); CD3/CD19/CD45 (Abbildung 27 und 28); CD3/CD16+56/CD45 (Abbildung 29 und 30).

Bei dem Antikörper HLA-DR-PE-Cy5 konnte erneut keine Empfehlung für eine Verdünnung ausgesprochen werden.

In Abbildung 26 (CD8/CD45) ist auffällig, dass in Charge CIK 1 – CD45-unverdünnt (mittlere Reihe) die CD8/CD45-doppelt-positive Zellpopulation mit zunehmender Verdünnung des PE-Antikörpers auch für CD45-ECD schwächere Fluoreszenzsignale aufweist und die Population ihr Aussehen ändert.

Die Ursache hierfür war sehr wesentlich in einer unzureichenden Kompensation des PE-Signals zu suchen. CD8-PE strahlte massiv in den 3. Fluoreszenzkanal, in dem ECD detektiert wird. d.h. ein Teil des scheinbaren CD45-ECD-Signals stammt von der CD8-PE-Färbung und demzufolge verschiebt sich dieses dann auch mit zunehmender Verdünnung des CD8-PE-Antikörpers.

**CD3-FITC/CD4-PE**

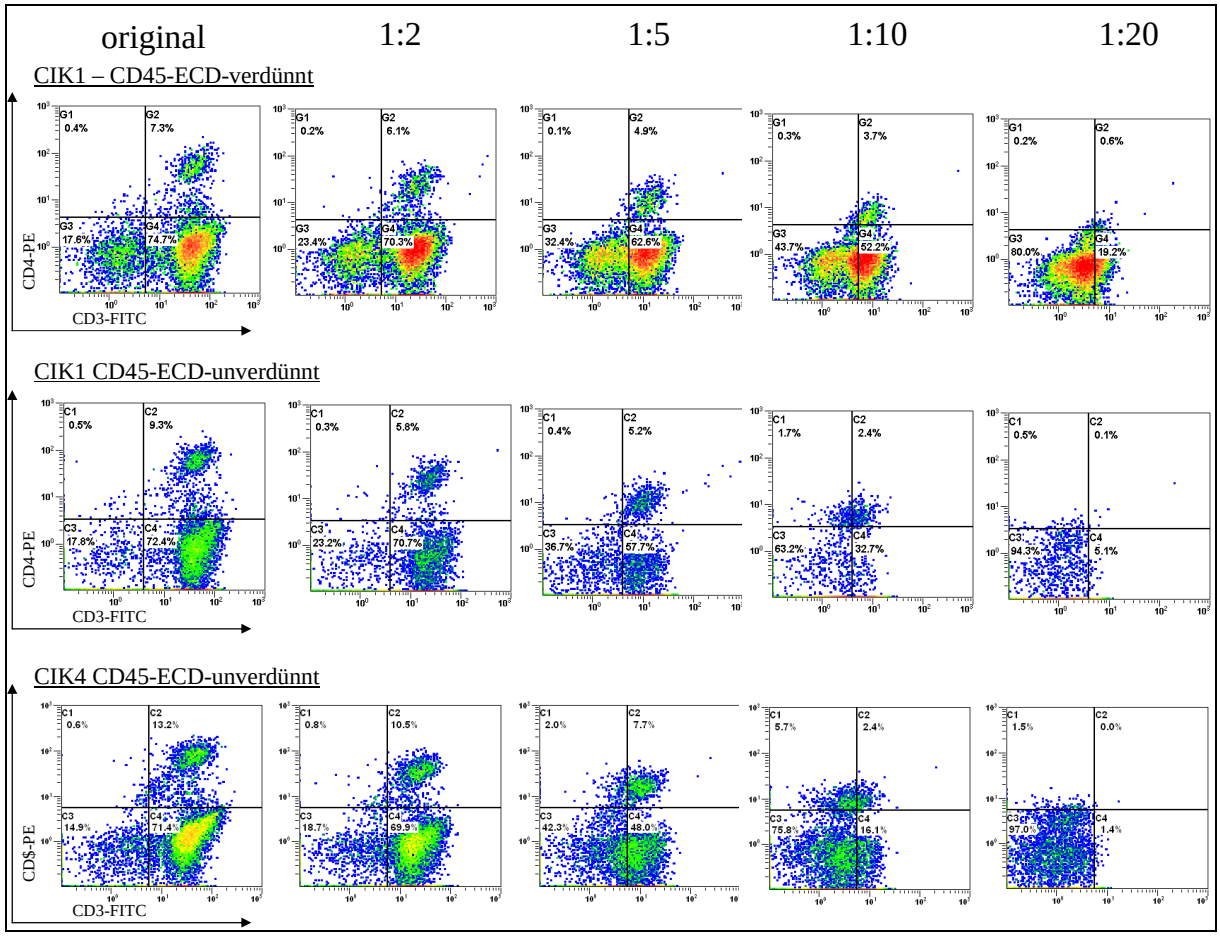


**Abbildung 23. Vergleich der Antikörpermischungen CD3-FITC/CD4-PE zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Die CIK-Chargen CIK1-CD45-ECD unverdünnt und CIK4 weisen dieselbe Verschiebung auf, wie auch CIK1-CD45-ECD verdünnt; die doppelt-positiv CD3CD4 Population bewegt sich in den unteren linken Quadranten sodass bei der Verdünnung 1:20 das falsch-negative Ergebnis einer doppelt-negativen Population vorliegt. Eine geringfügige Verbesserung konnte höchstens für die Verdüngung 1:2 festgestellt werden.**

**CD4-PE/CD45-ECD**

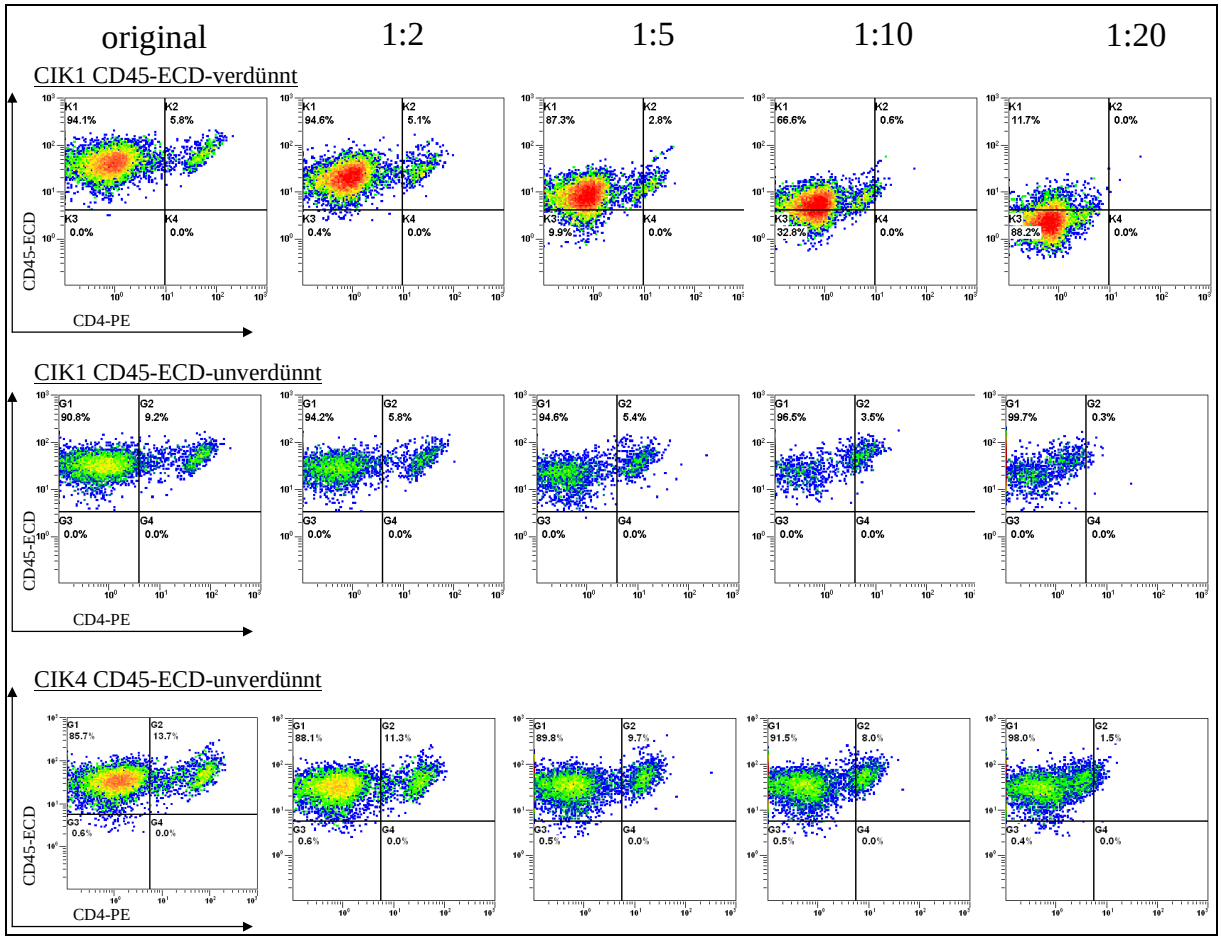


**Abbildung 24. Vergleich der Antikörpermischung CD4-PE/CD45-ECD zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Bei den CIK-Chargen 1-CD45-ECD unverdünnt und CIK4 trat zwar keine Verschiebung der beiden Populationen nach unten auf, jedoch erfolgte ebenso eine Bewegung in den schwächer fluoreszierenden PE-Bereich nach links. Es ist maximal eine Verdüngung von 1:2 möglich.**

**CD3-FITC/CD8-PE**

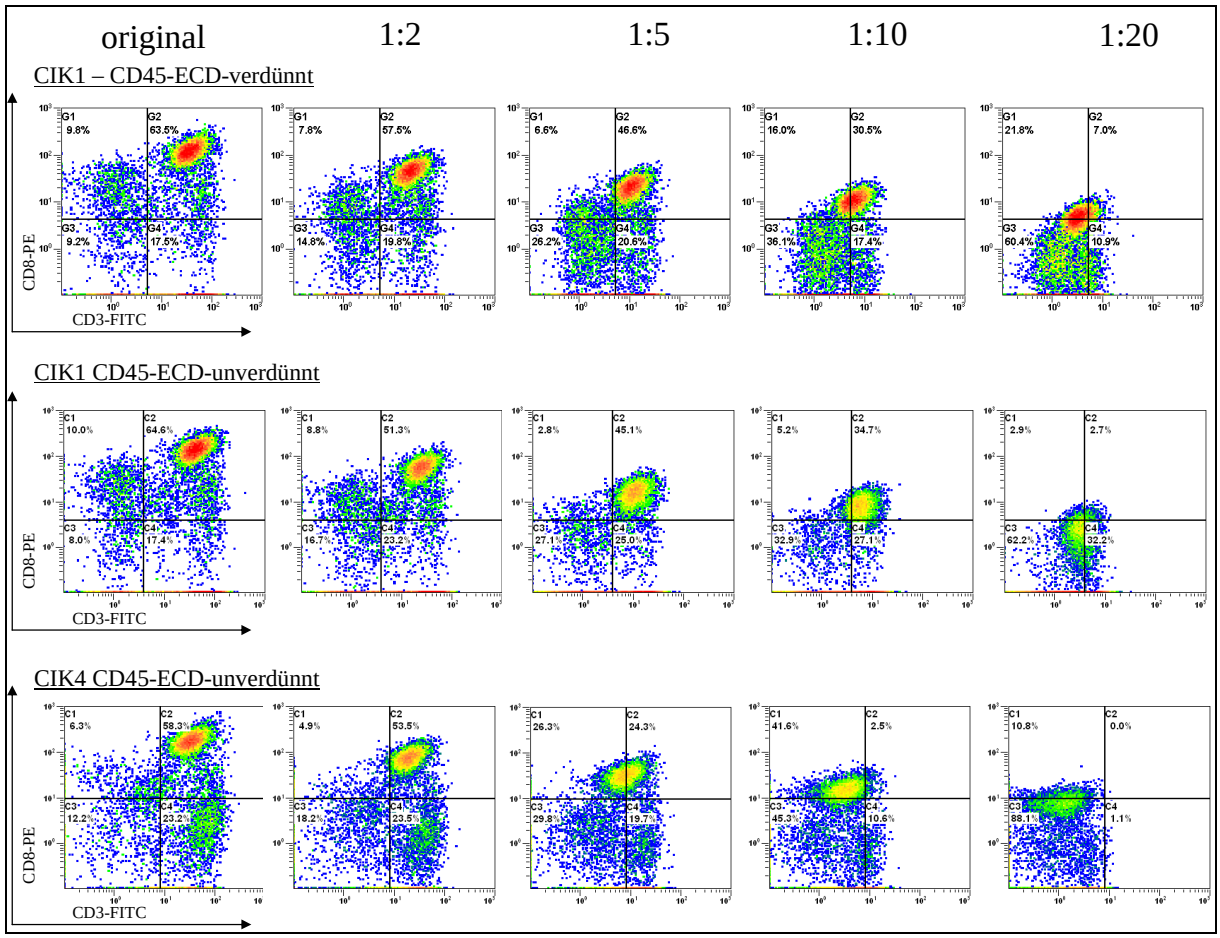


**Abbildung 25. Vergleich der Antikörpermischungen CD3-FITC/CD8-PE zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Auch hier zeigten die Experimente mit CD45-ECD-unverdünnt (Mitte, Unten) keine Verbesserung der Titrationsergebnisse. Die Verschiebung der doppelt-positiven Populationen in den falsch-negativen Bereich fand in demselben Maße statt wie bei CIK 1-CD-45-ECD verdünnt.**

**CD8-PE/CD45-ECD**

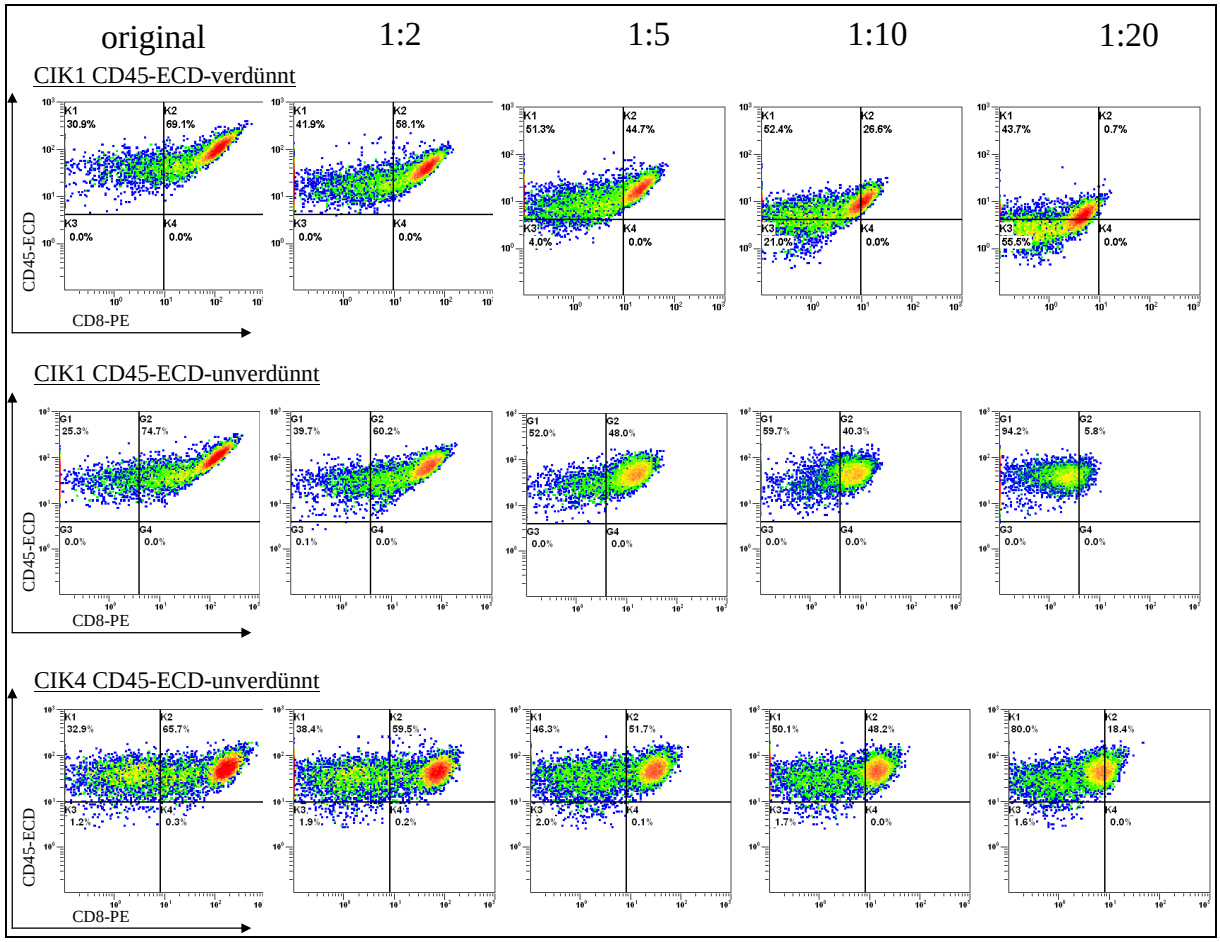


**Abbildung 26. Vergleich der Antikörpermischungen CD8-PE/CD45-ECD zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Bei CIK 1 CD45-ECD unverdünnt verbessert sich das Aussehen der Population mit zunehmender Verdünnung, jedoch war auch die Linksverschiebung sehr ausgeprägt. Auch bei CIK 4 war die Abnahme der Fluoreszenzintensität von CD8-PE zu beobachten.**

**CD3-FITC/CD19-PE**

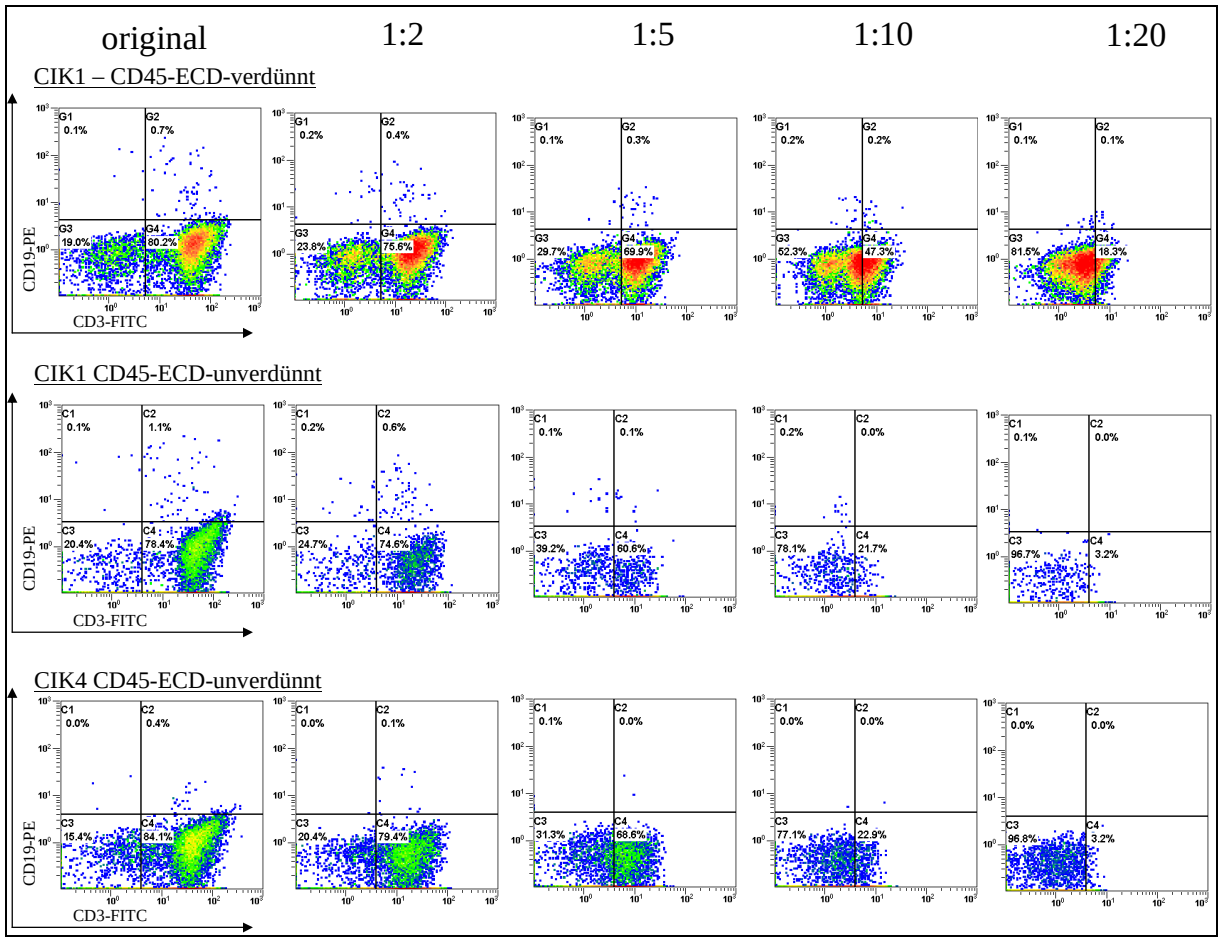


**Abbildung 27. Vergleich der Antikörpermischungen CD3CD19 zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Hier liegt der Fall vor, dass die CD3-negative Population nur bei CIK 1 CD45-ECD verdünnt gut abgegrenzt erkennbar war. Es fand eine Verschiebung nach unten-links bei allen drei CIK-Chargen statt, nicht nur bei CIK1 CD45-ECD unverdünnt.**

**CD19-PE/CD45-ECD**

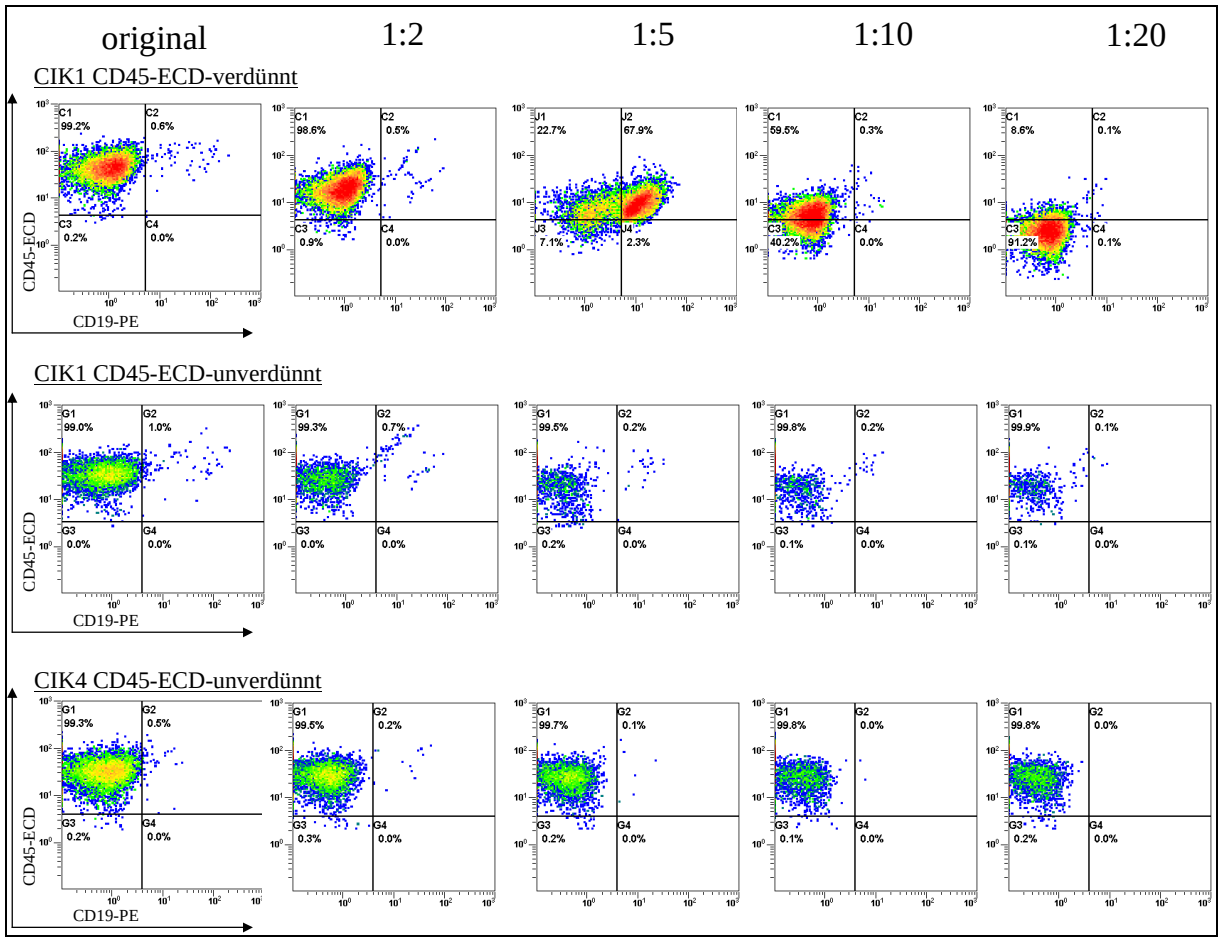


**Abbildung 28. Vergleich der Antikörpermischungen CD19CD45 zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Die Populationen sind durchgehend gut erkennbar. Ab einer Verdünnung 1:5 ist der Unterschied bei CIK 1 CD45-ECD unverdünnt und CIK4 nur minimal.**

**CD3-FITC/CD16+56-PE**

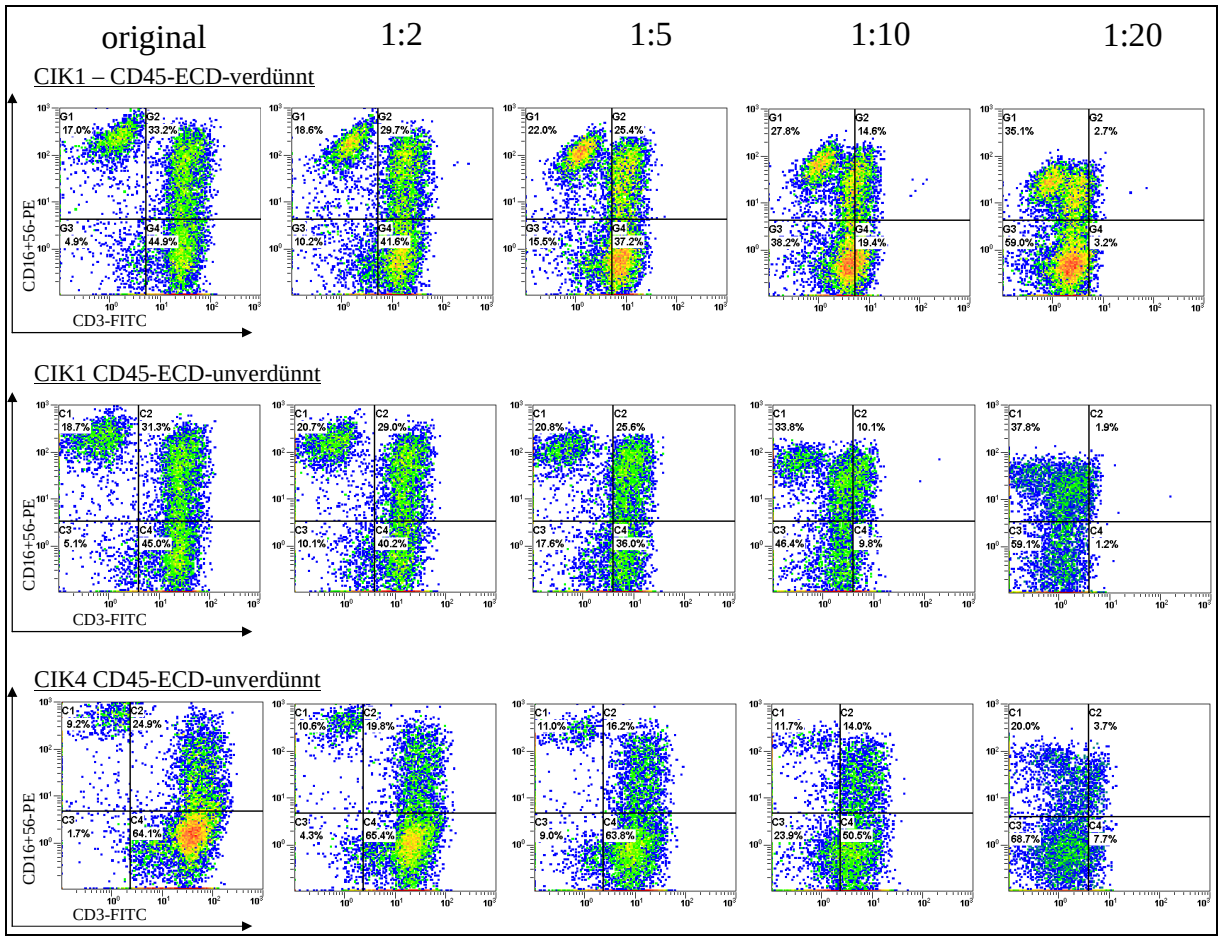


**Abbildung 29. Vergleich der Antikörpermischungen CD3/CD16+56 zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Bei den beiden CIK-Chargen, wo der Antikörper CD45-ECD nicht verdünnt wurde (Mitte und Unten), ergab sich ein ähnliches Bild wie bei CIK1 CD45-ECD verdünnt. Bei CIK 1 CD45-ECD unverdünnt konnte auch keine Verbesserung der Abgrenzung der Population festgestellt werden.**

## CD16+56-PE/CD45-ECD

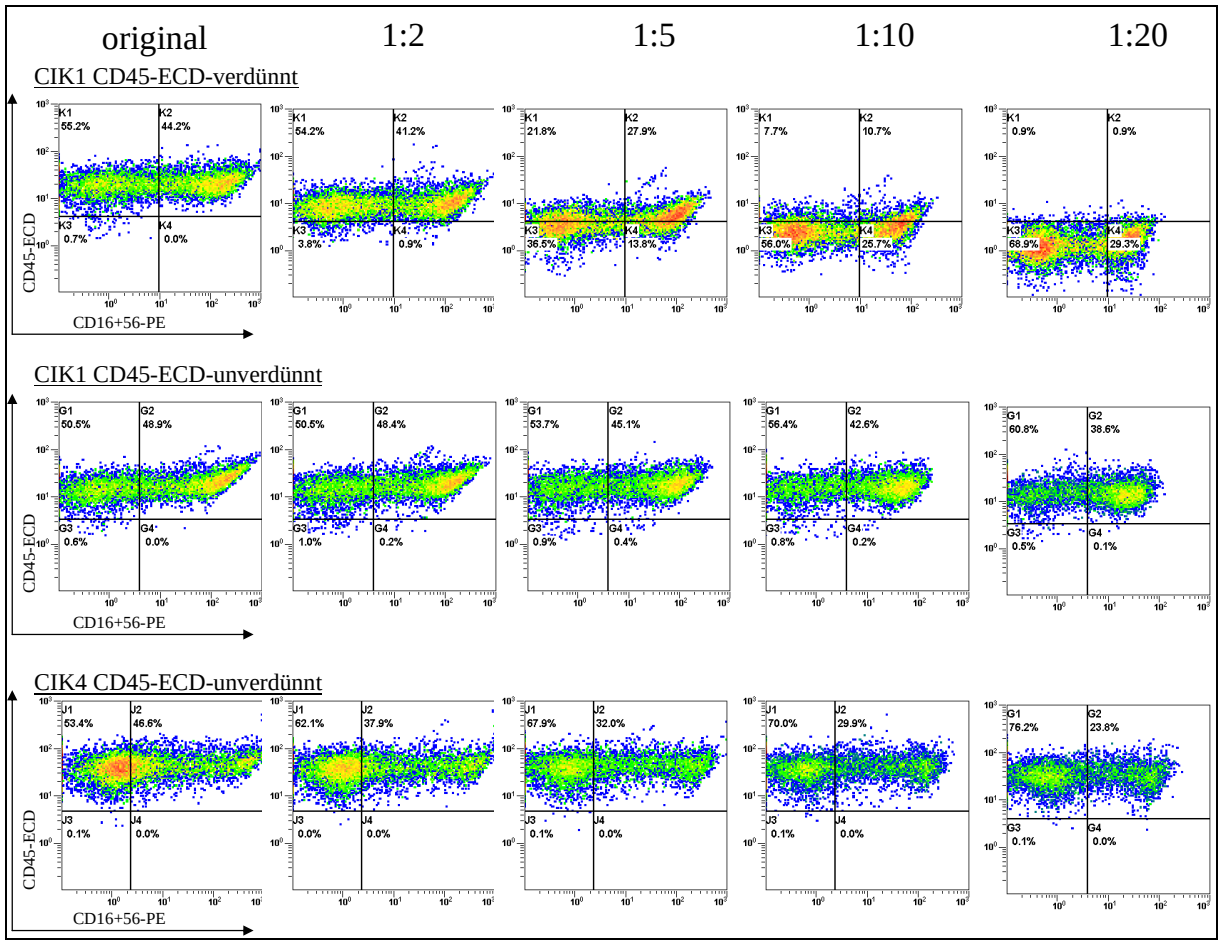


**Abbildung 30. Vergleich der Antikörpermischungen CD16+56CD45-ECD zwischen CD45-ECD verdünnt (Oben) und unverdünnt (Mitte und Unten). Es ist festzustellen, dass sich die doppelt positive Population im oberen rechten Quadranten mit zunehmender Verdünnung besser abgrenzt; Die Verschiebung in den schwächer fluoreszierenden PE- Bereich (linker Quadrant) ist jedoch ebenso unübersehbar.**

## HLA-DR-PE-CY5/CD45-ECD

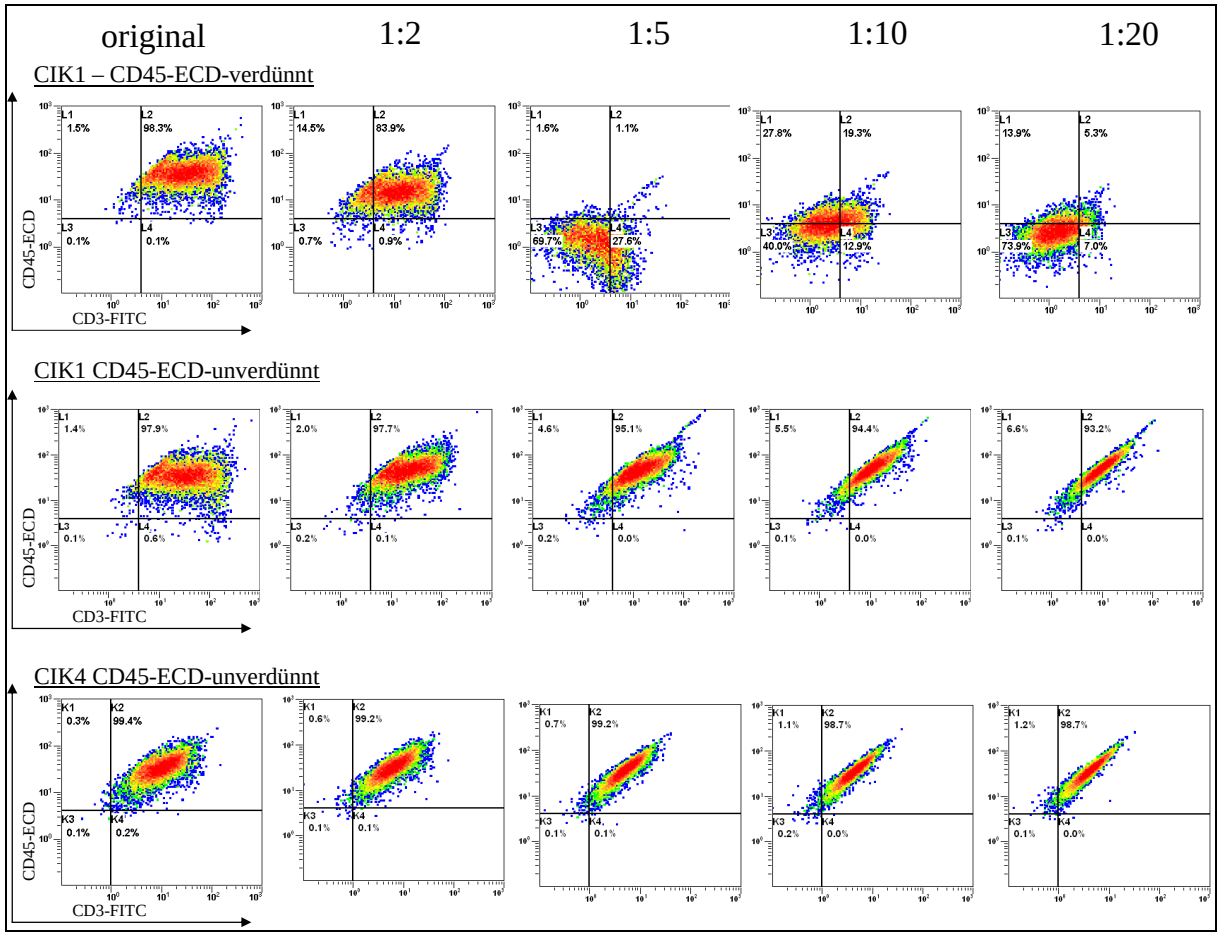


**Abbildung 31. Vergleich der Antikörpermischungen HLA-DR-PE-Cy5/CD45-ECD. Hier ist eine Verschlechterung der Population bei den beiden Chargen CIK 1 CD45-ECD unverdünnt und CIK4 zu erkennen.**

Unter Einbeziehung dieser Daten scheint es möglich, bei gleich bleibender CD45-ECD-Konzentration (unverdünnt, entsprechend der Herstellerempfehlung) die Antikörpermischungen CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD19-PE und CD3/CD16+56-PE mit einer Verdünnung von 1:2 einzusetzen.
Eine Überprüfung dieser Annahme erfolgte mit Hilfe der Berechnung der prozentualen Gesamtdifferenz der Verdünnung zum jeweiligen Original (Differenzsumme).

### 3.2.4 Auswertung der Berechnung der Gesamtdifferenz der Verdünnungen zur Originalkonzentration

Die Gesamtdifferenz wurde für alle Antikörpermischungen der vier CIK-Chargen beider experimenteller Ansätze, CD45-ECD verdünnt und CD45-ECD unverdünnt, wie im Teil „Materialien und Methoden“ beschrieben, durchgeführt.Das Ergebnis ist in Tabelle 8 dargestellt.
Der obere Abschnitt der Tabelle stellt die Ergebnisse dar, bei denen der Antikörper CD45-ECD nicht verdünnt wurde (uv), der untere Abschnitt die Ergebnisse, bei denen CD45-ECD titriert wurde. X und Y bezeichnen den Antikörper, der in den Density-Plots die jeweilige Position auf der X- bzw. Y-Achse innehatte. CIK kennzeichnete die jeweilige Charge. Die Anordnung der Antikörper erfolgte mit Zunahme der Abweichung zum Original. Die farbliche Abstufung war durch den Wert der Abweichung definiert, sodass grün für kleine Abweichungen (bis 20%) und rot für große Abweichungen (über 50%) stand. Die zuvor getroffene Annahme, dass eine Verdünnung von 1:2 stattfinden kann, wenn CD45-ECD konstant gehalten wird, fand Bestätigung. Vor allem bei Betrachtung der höheren Verdünnung war ein Unterschied zwischen beiden experimentellen Ansätzen klar zu erkennen.

**Tabelle 8. Darstellung der Ergebnisse aus der Berechnung der Differenzsumme geordnet nach der kleinsten Abweichung für jede Verdünnung (V_2 bis V_20). Der obere Abschnitt stellt Daten aus den Experimenten dar, bei denen der Antikörper CD45-ECD nicht verdünnt wurde (uv), der untere Abschnitt die Werte der Experimente, bei denen CD45-ECD verdünnt wurde (v). Die farbliche Abstufung (grün: Werte<20% gelb: Werte<50% rot: Werte >50%) erfolgte je nach Betrag der Abweichung.**

| | | | | Differenzsumme | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CIK | V_UV | X | Y | V_2 | V_5 | V_10 | V_20 |
| 3 | uv | CD19PE | CD45ECD | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 1 | uv | CD19PE | CD45ECD | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 4 | uv | CD19PE | CD45ECD | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | uv | HLA-DR | CD45ECD | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 1 | uv | CD16+56PE | CD45ECD | 1 | 8 | 13 | 21 |
| 1 | uv | CD3FITC | CD45ECD | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 1 | uv | HLA-DR | CD45ECD | 2 | 7 | 8 | 11 |
| 3 | uv | HLA-DR | CD45ECD | 2 | 3 | 3 | 4 |
| 3 | uv | CD16+56PE | CD45ECD | 2 | 4 | 1 | 8 |
| 3 | uv | CD4PE | CD45ECD | 4 | 4 | 16 | 56 |
| 4 | uv | CD4PE | CD45ECD | 5 | 8 | 12 | 25 |
| 1 | uv | CD4PE | CD45ECD | 7 | 8 | 11 | 18 |
| 4 | uv | CD3FITC | CD4PE | 8 | 58 | 132 | 166 |
| 1 | uv | CD3FITC | CD19PE | 9 | 38 | 116 | 153 |
| 3 | uv | CD3FITC | CD4PE | 9 | 14 | 27 | 131 |
| 4 | uv | CD3FITC | CD19PE | 10 | 32 | 123 | 163 |
| 1 | uv | CD3FITC | CD4PE | 11 | 38 | 93 | 153 |
| 4 | uv | CD3FITC | CD16+56PE | 11 | 18 | 49 | 155 |
| 3 | uv | CD3FITC | CD19PE | 12 | 18 | 85 | 164 |
| 4 | uv | CD3FITC | CD8PE | 13 | 75 | 137 | 161 |
| 4 | uv | CD8PE | CD45ECD | 13 | 28 | 36 | 95 |
| 1 | uv | CD3FITC | CD16+56PE | 14 | 29 | 113 | 146 |
| 3 | uv | CD8PE | CD45ECD | 15 | 17 | 26 | 60 |
| 3 | uv | CD3FITC | CD16+56PE | 15 | 46 | 136 | 168 |
| 4 | uv | CD16+56PE | CD45ECD | 18 | 29 | 33 | 46 |
| 3 | uv | CD3FITC | CD8PE | 19 | 37 | 127 | 169 |
| 1 | uv | CD8PE | CD45ECD | 29 | 53 | 69 | 138 |
| 1 | uv | CD3FITC | CD8PE | 29 | 54 | 69 | 138 |
| | | | | | | | |
| 1 | v | CD19PE | CD45ECD | 1 | 18 | 80 | 182 |
| 1 | v | CD4PE | CD45ECD | 2 | 20 | 66 | 176 |
| 2 | v | CD19PE | CD45ECD | 2 | 20 | 179 | 189 |
| 3 | v | CD19PE | CD45ECD | 3 | 28 | 90 | 200 |
| 2 | v | CD4PE | CD45ECD | 4 | 15 | 83 | 200 |
| 3 | v | CD4PE | CD45ECD | 5 | 24 | 83 | 185 |
| 3 | v | CD3FITC | CD45ECD | 5 | 44 | 121 | 192 |
| 2 | v | CD3FITC | CD8PE | 7 | 21 | 35 | 95 |
| 1 | v | CD16+56PE | CD45ECD | 8 | 99 | 162 | 195 |
| 3 | v | CD3FITC | CD19PE | 8 | 24 | 38 | 92 |
| 2 | v | CD8PE | CD45ECD | 9 | 60 | 73 | 195 |
| 3 | v | CD3FITC | CD16+56PE | 9 | 20 | 71 | 142 |
| 1 | v | CD3FITC | CD19PE | 10 | 21 | 67 | 125 |
| 3 | v | CD3FITC | CD8PE | 10 | 15 | 18 | 34 |
| 3 | v | CD8PE | CD45ECD | 10 | 17 | 62 | 183 |
| 2 | v | CD3FITC | CD4PE | 10 | 28 | 49 | 98 |
| 2 | v | CD3FITC | CD19PE | 10 | 30 | 61 | 109 |
| 3 | v | CD3FITC | CD4PE | 11 | 21 | 31 | 89 |
| 1 | v | CD3FITC | CD4PE | 12 | 29 | 52 | 125 |
| 1 | v | CD3FITC | CD16+56PE | 14 | 31 | 88 | 145 |
| 2 | v | HLA-DR | CD45ECD | 15 | 72 | 128 | 197 |
| 1 | v | CD3FITC | CD8PE | 16 | 40 | 66 | 126 |
| 3 | v | CD16+56PE | CD45ECD | 16 | 129 | 181 | 198 |
| 2 | v | CD3FITC | CD16+56PE | 17 | 31 | 60 | 122 |
| 1 | v | CD8PE | CD45ECD | 22 | 49 | 85 | 137 |
| 2 | v | CD16+56PE | CD45ECD | 23 | 31 | 49 | 138 |
| 1 | v | HLA-DR | CD45ECD | 29 | 194 | 158 | 186 |
| 3 | v | HLA-DR | CD45ECD | 58 | 143 | 184 | 196 |

# 4 Diskussion

Die Aufgabenstellung der hier vorgelegten Bachelorarbeit war es, Titrationsexperimente für bestimmte im Labor der AG Schimmelpfennig routinemäßig in der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper durchzuführen, um so gegebenenfalls Kosteneinsparungen zu erzielen. Hintergrund ist, dass viele Antikörper in sehr hohen Konzentrationen ausgeliefert werden und eine Verdünnung des Antikörpers nicht zwangsläufig zu einem Qualitätsverlust führen muss.

Diese Titrationsexperimente wurden mit *ex vivo* expandierten Cytokin-induzierten Killerzellen durchgeführt. CIK-Zellen stellen eine T-Zellpopulation dar, die über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen aus frisch isolierten Lymphozyten unter Zusatz der Cytokine INF-γ und IL-2 sowie dem Antikörper Okt3 induziert wurden. Die Kultivierung, Expansion und Kryokonservierung der Zellen erfolgte problemlos, so dass für die immunphänotypische Charakterisierung mittels FACS stets genügend Zellen zur Verfügung standen.

Zur immunphänotypischen Charakteristisierung der CIK-Zellen wurden die Fluorochrom-konjugierten Antikörpermischungen CD3-FITC/CD8-PE und CD3-FITC/CD16+56-PE eingesetzt; CD3-FITC/CD4-PE definierte den prozentualen Anteil an T-Helferzellen und CD3-FITC/CD19-PE diente dem Ausschluss von B-Zellen. Das Vorhandensein der Zelloberflächenmarker HLA-DR-PE-Cy5 und CD45-ECD war der Nachweis dafür, dass die besagten Zellen in ihrer Gesamtheit Leukozyten darstellen.

Die im FACS gemessenen Daten wurden in Density-Plots und Histogramm-Plots dargestellt, die auch Anwendung in der nachfolgenden Datenanalyse fanden.
Bei Einsatz der Antikörpermischung CD3-FITC/CD4-PE/CD45-ECD zeigten sich einzelne Populationen, die exakt voneinander zu trennen waren. Zu einer Verdünnung von 1:2 konnte jedoch nicht geraten werden, da die Abnahme der Fluoreszenzintensität bereits ab einer Verdünnung von 1:5 zu groß ist. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Antikörpermischung CD3-FITC/CD8-PE/CD45-ECD. In diesem Fall kann die Antikörpermischung ebenfalls nicht weiter verdünnt werden. Auch bei CD3-FITC/CD19-PE/CD45-ECD gelingt keine Verdünnung. Bei den Antikörpermischungen HLA-DR–PE-Cy5/CD45-ECD und CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-ECD muss ebenso von einer Verdüngung abgeraten werden, da

die Abnahme der Fluoreszenzintensität vom Original zu den Verdünnungen zu groß ist und damit die Ergebnisse beeinträchtigt.

Betrachtet man demgegenüber die Titrationsergebnisse, bei denen CD45-ECD entsprechend der Herstellerempfehlung eingesetzt wurde und konstant blieb, ist eine Verbesserung dahingehend zu erkennen, als dass ein Einsatz der Verdünnung 1:2 für alle betrachteten Antikörpermischungen außer HLA-DR möglich ist.

Die statistische Analyse bestätigte dies. Problematisch bei der ausschließlichen Betrachtung war jedoch, dass hier die phänotypische Veränderung der Populationen bei Darstellung in Density-Plots – zum Beispiel eine schweifartige Ausbildung (bei HLA-DR) oder eine schwere Abgrenzbarkeit der Populationen (bei CD16+56) - nicht mit einfloss. So wären nach Auswertung der Gesamtdifferenz die Antikörper CD19-PE und HLA-DR bis zu einer Verdünnung von 1:20 stabil, was sich mit den Analysen der Density-Plots nicht deckte. Ein anderes Beispiel ist, dass CD3-FITC/CD8-PE und CD8-PE/CD45-ECD bei CD45-ECD unverdünnt bereits bei einer Verdünnung von 1:5 große Abweichungen aufweist, die visuell so nicht erkennbar sind. Diese Art der Auswertung kann demzufolge nicht als alleinige Grundlage zur Fällung der Entscheidung herangezogen werden, sie stellt jedoch eine Ergänzung zur ausschließlich visuellen Analyse der Zellpopulationen in Density- und Overlay-Plots dar.

Bei der Messung wie auch bei der Auswertung der FACS-Daten in Density-Plots wurde eine Quadrantenanalyse zu Grunde gelegt wurde, die jedoch nicht immer eine exakte Abgrenzung der Einzelpopulationen voneinander ermöglichte. Besonders schwierig gestaltete sich dies bei den Antikörpermischungen CD3-FITC/CD8-PE/CD45-ECD sowie CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-ECD.
Des Weiteren gelang es nicht, für eine Antikörpermischung bei Analyse aller drei CIK-Chargen die vorab definierten Quadranten in jedem Fall beizubehalten.

Aufgrund der Dreifachfärbung der Zellen war es im Verlauf der Messungen nötig, die Daten zu kompensieren, um keine falsch-positiven- bzw. negativen Fluoreszenzintensitäten zu erhalten. Die Kompensation stellt damit eine rechnerische Korrektur der Streuung der verschiedenen Fluorochrome in benachbarte Fluoreszenzkanäle dar. Gelang es während der Messung nicht, die Kompensation optimal einzustellen, so bot die nachfolgende Analyse der Messdaten kaum Möglichkeiten, diese Fehler auszugleichen. Wesentliche Voraussetzungen

sind ausreichende Erfahrungen über die vorliegenden Zellpopulationen und die eingesetzten Antikörper. Da Erkenntnisse darüber erst im Verlauf der Messungen gewonnen werden konnten, sind die vorliegenden Ergebnisse zwischen den jeweils drei analysierten CIK-Chargen nicht in jedem Fall stimmig. Eine Verbesserung der Datenauswertung aufgrund einer optimalen Kompensation konnte so z.B. für die Antikörpermischungen CD8/CD45 CD16+56/CD45 erreicht werden.

## Ausblick

In den letzten Jahren wurden vor allem technische Fortschritte im Bereich der Durchflusszytometrie gemacht. Probleme gibt es jedoch noch immer bei der Software. Diese fordert in künftigen Entwicklungen die größten Anstrengungen, denn je mehr Daten in kürzerer Zeit generiert werden können, umso größer ist deren Komplexizität[14] und umso schwieriger wird die korrekte Analyse. So kann Software der limitierende Punkt sein, denn trotz neu entwickelter Software-Pakete gibt es noch Probleme mit fehlender Standardisierung bei der Auswertung der Daten[14].

Die bereits erwähnte problematische Eingrenzung von Populationen mittels polygonaler Gates oder Quadrantenanalyse durch den Anwender führt zu subjektiven Ergebnissen, die sich dann in Unterschieden der Ergebnisse zwischen Laboren oder sogar innerhalb eines Labors widerspiegeln können[22]. Sinnvoll erscheint hier die Entwicklung von Software, die die automatische Generierung der Daten mittels zuvor festgelegter Kriterien übernimmt. Herzenberg schlägt im Hinblick auf die Weiterentwicklung der Software vor, die Kompensation und Kalibrierung zu automatisieren, Unterstützung bei der Entwicklung von Protokollen zu liefern sowie das Problem der Datenspeicherung- und Verwaltung zu lösen[20].

Trotz dieser Probleme wird die Durchflusszytometrie aufgrund der Weitläufigkeit ihrer Anwendungen und der Weiterentwicklung an Soft- und Hardware in Forschung und Medizin in den kommenden Jahren weiterhin einen hohen Stellenwert einnehmen.

# I Literaturverzeichnis


[1] http://www.rki.de, zuletzt besucht am 19.09.2008

[2] Weinberg R: **The biology of cancer.** *Garland Science* 2007

[3] Lewin B: **GenesVII Oxford.** *University Press* 2000, 875-876

[4] http://www.krebsinformationsdienst.de/ (Deutsches Krebsforschungszentrum) zuletzt besucht am 19.08.2008

[5] Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, Fan ZP, Xu DP, Wang FS: **Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma.** *World J Gastroenterol*. 2004, 10:1146-51

[6] Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS.: **A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005, 11:181-7

[7] Schimmelpfennig C, Shurawel N, Schmiegel W: **Generierung und Anwendung von ex vivo expandierten CIK-Zellen bei Patienten mit malignen gastrointestinalen Tumoren.** *Posterausstellung Ruhr-Universität Bochum*, 2006

[8] Schmidt-Wolf, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG and Weissman IL**: Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity.** *Journal of Experimental Medicine* 1991, 174:139-149

[9] Introna M, Borleri G, Conti E, Franceschetti M, Barbui AM, Broady R, Dander E, Gaipa G, D'Amico G, Biagi E, Parma M, Pogliani EM, Spinelli O, Baronciani D, Grassi A, Golay J, Barbui T, Biondi A, Rambaldi A: **Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study.** *Haematologica.* 2007, 92:952-9

[10] Köhler G, Milstein C: **Continous Cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity** *The Journal of Immunology* 1975, *Nature* 256: 495–497

[11] Janeway CA, Travers P: **Immunologie.**
*Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford* 1997, 559

[12] Schabath R, Ratei R, Ludwig WD: **The prognostic significance of antigen expression in leukaemia.**
*Best Pract Res Clin Haematol*. 2003, 16:613-28

[13] Janeway CA, Travers P: **Immunologie.**
*Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford* 1997, 541-544

[14] Eisenstein M: **Divide and conquer.**
*Nature* 2006, 441: 1179-1185

[15] Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA: **Modern flow cytometry: a practical approach.**
*Clin Lab Med*. 2007, 27:453-68

[16] Prince HE, Arens L, Kleinman SH.: **CD4 and CD8 subsets defined by dual-color c ytofluorometry which distinguish symptomatic from asymptomatic blood donors seropositive for human immunodeficiency virus.**
*Diagn Clin Immunol.* 1987, 5:188–193

[17] Giorgi JV, Fahey JL, Smith DC, Hultin LE, Cheng HL, Mitsuyasu RT, Detels R.: **Early effects of HIV on CD4 lymphocytes in vivo.**
*J Immunol.* 1987, 138:3725–3730

[18] Pozarowski P, Grabarek J, Darzynkiewicz Z.: **Flow cytometry of apoptosis.**
*Curr Protoc Cytom*. 2003, Kapitel 7: Einheit 7.19.

[19] Darzynkiewicz Z, Huang X.: **Analysis of cellular DNA content by flow cytometry.**
*Curr Protoc Immunol*. 2004, Kapitel 5: Einheit 5.7.

[20] Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA: **The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford.**
*Clinical Chemistry.* 2002; 48:1819-1827

[21] Rothe G (2007): **Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie**. In: Sack U, Tarnok A, Rothe G (Hrsg): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.
*Verlag Karger, Basel*, S. 27–70

[22] Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR: **Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed.**
*Nat Immunol.* 2006, 7:681-5.

# II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers. ..... 6

Abbildung 2. Durchflusszytometer FC 500 von Beckman Coulter. ..... 7

Abbildung 3. Korrelierte Darstellung von Messergebnissen. ..... 17

Abbildung 4. Darstellung der Emmisionsspektren der verwendeten Fluorochrome ..... 18

Abbildung 5. Entwicklung von CIK-Vorläuferzellen ..... 20

Abbildung 6. A) Die Darstellung FS gegen SS B) Der Plot 7AAD gegen SS C) Der Plot 7AAD gegen SS - hier wurden nur Zellen aus „Gate A“ berücksichtigt und analysiert. ..... 22

Abbildung 7. Färbung der Zellen mit CD45. ..... 23

Abbildung 8. Isotypkontrolle IgG1-FITC/IgG1-PE. ..... 23

Abbildung 9. Darstellung von CD3-FITC/CD4-PE. ..... 26

Abbildung 10. Darstellung von CD4-PE/CD45-ECD. ..... 27

Abbildung 11. Overlay-Plots von CD3-FITC/CD4-PE/CD45-ECD. ..... 28

Abbildung 12. Darstellung von CD3-FITC/CD8-PE. ..... 29

Abbildung 13. Darstellung von CD8-PE/CD45-ECD. ..... 30

Abbildung 14. Overlay-Plots von CD3-FITC/CD8-PE/CD45-ECD. ..... 31

Abbildung 15. Darstellung von CD3-FITC/CD19-PE. ..... 32

Abbildung 16. Darstellung von CD19-PE/CD45-ECD. ..... 33

Abbildung 17. Overlay-Plots von CD3-FITC/CD19-PE/CD45-ECD. ..... 34

Abbildung 18. Darstellung von CD3-FITC/CD16+56-PE. ..... 35

Abbildung 19. Darstellung von CD16+56-PE/CD45-ECD.. ..... 36

Abbildung 20. Overlay-Plots von CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-ECD. ..... 37

Abbildung 21. Darstellung von HLA-DR-PE-CY5/CD45-ECD ..... 38

Abbildung 22. Overlay-Plots von HLA-DR-PE-Cy5/CD45-ECD. ..... 39

Abbildung 23. Vergleich CD3-FITC/CD4-PE zwischen CD45-ECD verdünnt und unverdünnt. ..... 42

Abbildung 24. Vergleich CD4-PE/CD45-ECD zwischen CD45-ECD verdünnt und unverdünnt ..... 43

Abbildung 25. Vergleich der CD3-FITC/CD8-PE zwischen CD45-ECD verdünnt und unverdünnt..... 44

Abbildung 26. Vergleich CD8-PE/CD45-ECD zwischen CD45-ECD verdünntund unverdünnt..... 45

Abbildung 27. Vergleich CD3CD19 zwischen CD45-ECD verdünnt und unverdünnt..... 46

Abbildung 28. Vergleich der Antikörpermischungen CD19CD45 zwischen CD45-ECD verdünnt und unverdünnt..... 47

Abbildung 29. Vergleich CD3/CD16+56 zwischen CD45-ECD verdünnt und unverdünnt.. ..... 48

Abbildung 30. Vergleich CD16+56CD45-ECD zwischen CD45-ECD verdünnt und unverdünnt..... 49

Abbildung 31. Vergleich der Antikörpermischungen HLA-DR-PE-Cy5/CD45-ECD verdünnt und unverdünnt..... 50

# III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. CD-Antigene für die Immunphänotypisierung von CIK-Zellen. ..... 4

Tabelle 2. Liste der verwendeten Geräte. ..... 9

Tabelle 3. CIK-Zell-Stimuli. ..... 9

Tabelle 4. Liste der verwendeten Antikörper. ..... 10

Tabelle 5. Darstellung der genutzten Fluorochrome. ..... 13

Tabelle 6. Übersicht über die verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper..... 14

Tabelle 7. Die zur Antikörpertitration verwendeten Ansätze..... 15

Tabelle 8. Darstellung der Ergebnisse aus der Berechnung der Differenzsumme. ..... 52

# Anhang I

Technische Spezifikationen des analytischen Beckmann-Coulter-Durchflusszytometers FC500 nach Herstellerangaben[21].

| Parameter | BC Cytomics FC 500 |
|---|---|
| Laser | 20-mW-Argon-Laser 488 nm und optional 25-mW-Red-Solid-State-Diode 635 nm |
| Anregung | entfällt im Falle der Ein-Laser-Konfiguration; kolineare Laser-Konfiguration im Falle der Zwei-Laser-Konfiguration |
| Detektoren | FSC (zwei verschiedene Winkel anwählbar), SSC, 5 Fluoreszenzen |
| Standardfilter | FITC 525BP; PE 575BP, ECD 620BP; PC5 675BP, PE-Cy7 755BP, dichroitische LP: 488, 550, 600, 710, dichroitische SP: 615, 645 LP: 500, SP: 620 |
| Standardfluoro-chrome | FITC, PE, PE-TexasRed (ECD), PE-Cy5 (Ein-Laser-Konfiguration) oder APC (Zwei-Laser-Konfiguration), PE-Cy7 |
| Sensitivität Fluoreszenz | PE < 300 MESF, FITC < 600 MESF |
| Auflösung Streulicht | FSC 0,5 µm, SSC < 0,5 µm |
| Signalverarbeitung | digital, 20 bit |
| Kompensation | Inverted Matrix, on- und offline |
| Maximale Ereignisrate | 3300 Ereignisse/s voll kompensiert |
| Datenauflösung | 1 048 576 Kanäle |
| Datenformat | FCS 3.0, abwärts kompatible Auswertung möglich |
| Computer/ Betriebssystem | PC/Microsoft Windows 2000 |
| Probenzuführung | Karussellzuführung für 32 Röhrche und Einzelzuführungsposition mit integriertem Vortex (MCL) oder Multi Plate Loader für Röhrchen und Mikrotiterplatten (MPL) |

Fortsetzung der technischen Spezifikation des analytischen Beckmann-Coulter-Durchflusszytometers FC500 nach Herstellerangaben.

| Parameter | BC Cytomics FC 500 |
|---|---|
| Medienversorgung | integrierte Medienversorgung für «Sheath»- und Reinigungsflüssigkeit, externer Abfallbehälter. |
| Flussrate | 10, 30 oder 60 µl Probe/min |
| Probenverschleppung | <1,0 % |
| Stromanschluss | 220/240 V, 16 A |

APC=Allophycocyanin; BP=BandPass; LP=LongPass
MESF=molecule equivalent soluble fluorochrome; SP=ShortPass

# Anhang II

Antigene Koexpression von Leukozyten des Blutes[21].

| Marker | T-Zellen | B-Zellen | NK-Zellen | Monozyten |
|---|---|---|---|---|
| FS | + | + | + | ++ |
| SS | + | + | + | ++ |
| CD1a | − | − | − | − |
| CD2 | ++ | − | (+) | − |
| CD3 | ++ | − | − | − |
| CD4 | (++) | − | − | + |
| CD5 | ++ | (+) | − | − |
| CD7 | (++) | − | (++) | − |
| CD8 | ++ | − | (+) | − |
| CD10 | − | − | − | − |
| CD13 | − | − | − | ++ |
| CD14 | − | (+) | − | ++ |
| CD15 | − | − | − | + |
| CD16 | (+) | − | (+) | (+) |
| CD19 | − | ++ | − | (+) |
| CD20 | − | ++ | − | − |
| CD22 | − | ++ | − | − |
| CD25 | (+) | (+) | − | (+) |
| CD33 | − | − | − | ++ |
| CD45 | +++ | +++ | +++ | ++ |
| CD56 | − | − | (+) | − |
| CD57 | (+) | − | ++ | − |
| CDw65 | − | − | − | + |
| CD79a | − | + | − | − |
| CD103 | − | − | − | − |
| CD117 | − | − | − | − |
| HLA-DR | (+) | + | (+) | ++ |
| TdT | − | − | − | − |
| MPO | − | − | − | + |
| GpA | − | − | − | − |

+, ++, +++ = Relative Expressionsdichten; (+) oder (++): Expression nur auf Subpopulationen oder unter pathologischen Bedingungen.

## *Danksagung*

Mein Dank gilt all jenen, ohne deren Hilfe diese Arbeit in so kurzer Zeit nicht zustande gekommen wäre.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Schimmelpfennig für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit, in dieser Arbeitsgruppe unter hervorragenden Bedingungen tätig sein zu dürfen und mich in die Methode der Durchflusszytometrie einzuarbeiten.

Frau Dr. Anett Schmiedeknecht gilt mein besonderer Dank für die außergewöhnlich gute und sehr intensive Betreuung der Arbeit.

Die gesamte Arbeitsgruppe, vor allem Katja Landgraf, Natalia Shurawel und Ulrike Ehlert, stand mir bei Fragen und Problemen immer helfend zur Seite, wofür ich Ihnen ausdrücklich danke.

Meinen beiden Gutachtern der Hochschule Anhalt (FH), Herrn Prof. Dr. Mägert und Herrn Prof. Dr. Junghannß, möchte ich ganz besonders für die Bewertung der Arbeit in sehr kurzer Zeit danken, womit Sie mir den Beginn meines Masterstudiums ermöglichen.

Meinem lieben Schatz, der mir in den letzten drei Jahren, und vor allem in den letzten zwölf Wochen mit aller Geduld und Liebe zur Seite stand und mir immer wieder Mut machen konnte, danke ich von Herzen.

Ich danke auch meiner lieben Familie, die immer hinter mir stand, mit ihrer Herzlichkeit und Liebe für mich da war, und mich in 22 Jahren stets unterstützte und ermutigte, meinen Weg zu gehen.

## *Eidesstattliche Erklärung*

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

*Ort, Datum, Unterschrift*